

## ラット肝細胞の多層立体培養による肝細胞分化形質の維持に関する研究

山口 貴嗣

札幌医科大学皮膚科学講座 (主任 高橋 誠 教授)

飛岡 弘敏 澤田 典均

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

### Studies on Differentiated Phenotypes of Rat Hepatocytes in Spheroid Culture

Takashi YAMAGUCHI

*Department of Dermatology, Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. M. TAKAHASHI)*

Hirotooshi TOBIOKA and Norimasa SAWADA

*Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. M. MORI)*

**ABSTRACT** In order to examine the expression of differentiated phenotypes of hepatocytes in spheroid culture, we established a primary culture of rat hepatocytes on P-N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide (PVLA)-coated dishes and observed changes in cytoskeletal organization and intercellular junctions with use of fluorescent microscope and confocal laser scanning microscope (LSM).

Rat hepatocytes on PVLA-coated dishes formed spheroids in serum-free medium containing insulin, transferrin, dexamethasone and epidermal growth factor (EGF) by the 48th hr after plating. Thus, the culture conditions resulted in the hepatocytes forming spacial organoids nearly identical to those *in vivo*. Fluorescent examination of spheroids by rhodamine-phalloidin revealed that the network of bile canalicular structures (BC) was reorganized in the spheroids. Alkaline phosphatase activity and bile canalicular membrane specific protein were demonstrated in the BC. It was also shown that the fluorescein Na added to the culture medium was secreted into the BC, indicating that the reconstructed BC is functional in the spheroids.

Immunohistochemical examinations of the spheroids by desmoplakin antibody and  $\alpha$ -tubulin antibody showed that desmosomes were present until 48 hrs after culture, and that the microtubules were localized mostly along the plasma membrane of each hepatocyte composing the spheroids.

These results suggested that rat hepatocytes cultured on PVLA-coated dishes not only maintain their cuboidal shape, but also reorganize functional BC and maintain cell-cell junctions. Thus, this culture system, allowing cells to reorganize spacial cell-cell interaction, was shown to yield similar conditions to those of hepatocytes *in vivo*. (Received July 15, 1991 and accepted July 30, 1991)

**Key words:** Rat hepatocyte, Spheroid culture, Cytoskeleton, Desmoplakin, Confocal laser scanning microscope

## 1 緒 言

血液中への血漿蛋白等の放出と、導管を介した胆汁の排泄という二つの機能を同時に行っている肝臓では、その重要な構成要素である個々の肝細胞もまた、これらの二つの機能を有している。従って、肝細胞は生体内ではこれらの機能に見合った類洞膜 (sinusoidal)、毛細胆管膜 (bile canalicular)、側面膜 (lateral) の3種の異なる膜ドメインを持っている。これまでの肝細胞の培養の多くは、コラーゲン等を基質とした単層培養法であり、基質の種類により、ある程度肝細胞の分化や増殖を誘導することが可能ではある。しかし、一般にこれらの培養条件下では、肝細胞は上記の三つの膜ドメインの極性や分化機能を急速に失う。その一つの理由として、肝細胞は生体内と異なり、単層で扁平になることが挙げられる。最近、肝細胞の分化機能を維持する目的で、多層立体培養法の重要性が示唆されている。この培養法では肝細胞の立体化あるいは spheroid 形成を認め、アルブミン産生能等の肝特異機能が、単層培養より長く保持されることが明らかにされている<sup>1)</sup>。しかし、これまでの spheroid 培養はいずれも基質と肝細胞が接着しない条件を作り、肝細胞を浮遊状態にすることによって spheroid を形成しており、培養液交換、形態観察、組織化学的検索等が非常に困難であるという短所を合わせ持っている。

そこで我々は、基質と接着することによって肝細胞が多層立体化すると報告されている P-N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide (PVLA)<sup>2,3)</sup> を基質として、肝細胞の初代培養を試みた。次に、得られた肝細胞 spheroid について観察を行い、特に肝細胞の特異機能である、胆汁分泌と密接な関係を持つ毛細胆管のネットワークと、肝細胞の分化形質の一つと考えられる細胞間接着装置の発現について検討を加えた。

## 2 材料・実験方法

### 2.1 肝細胞の分離及び培養

#### 2.1.1 肝細胞の分離

体重 200-250 g の雌 Sprague-Dawley (SD) ラットを用い、コラゲナーゼ肝灌流法<sup>4,5)</sup> により肝細胞を分離した。得られた肝細胞は、100 units/ml ペニシリン G、0.1 mg/ml ストレプトマイシン (以上 Gibco 社, USA)、0.5 µg/ml インシュリン (Ins)、0.5 mg/ml ウシアルブミン (Fraction V, Sigma 社, USA) を含む L-15 medium (極東) に浮遊させ、62 µm 径のナイロンフィルターで濾過し、50×g、1 分間の遠心分離を 2

回洗い洗浄した。続いて Kremer *et al.*<sup>6)</sup> の isodensity percoll centrifugation 法を用いて生存肝細胞を得た。トリパンブルー法にて算定した、肝細胞の viability は、約 95% であった。

#### 2.1.2 培 養

培養液組成については、Ins、デキサメサゾン (Dex)、上皮成長因子 (EGF) の各々の有無による spheroid 形成の状態を検討し、5 µg/ml Ins、5 µg/ml トランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸、20 ng/ml EGF (以上 Collaborative Research 社, USA)、10<sup>-7</sup>M Dex、100 units/ml ペニシリン G、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、0.5 mg/ml ウシアルブミンを含む高グルコース含有 Dulbecco's modified Eagle medium と Ham F 12 medium (共に極東) の等量混合液を用いた。分離肝細胞をこの培養液で洗浄・希釈し、0.001~0.2% の各濃度に調整した PVLA で被った 60 mm 径のプラスチック培養皿に約 2×10<sup>6</sup> 個播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C の培養装置内に静置し、播種 6 時間後に培養液交換、その後 24 時間毎に培養液交換を行い、位相差顕微鏡で経時的に観察した。培養 48 時間目で検討したところ、0.01% 以上の PVLA 濃度において、同程度に spheroid の形成を認めたので、以後の実験は、PVLA 濃度を 0.01% に設定して行った。

また、後述する免疫組織化学及びローダミン・ファロイジンによる検索を行うため、予め滅菌した 18 mm×24 mm のカバーガラスを入れ、0.01% PVLA で被った 35 mm 径のプラスチック培養皿に、約 8×10<sup>5</sup> 個の肝細胞を播種し、前述と同様に培養を行った。

対照として、20 µg type I コラーゲンで被った 35 mm 径のプラスチック培養皿による培養を同一条件下で施行した。

### 2.2 免疫組織化学及びローダミン・ファロイジンによる検索

#### 2.2.1 材 料

2.1 で得られた初代培養 48 時間の肝細胞をアクチン、チューブリン及び、高坂と小川<sup>7)</sup> により作製された抗毛細胆管膜抗体 (2D2) の観察に使用した。デスモソーム関連蛋白であるデスモプラキンの観察には播種後 1~48 時間の培養肝細胞を使用した。

#### 2.2.2 固定及び反応

2D2 の観察には -20°C の 95% エタノールで、他の観察には -20°C のアセトンで、カバーガラス上の培養肝細胞を固定し、リン酸緩衝液 (phosphate buffer saline; PBS) で 2 回洗浄後、以下の観察に用いた。アクチンの観察には F-アクチンに特異的に結合するロー

ダミン・ファロイジン (Molecular Probes 社, USA) を反応させ、蛍光標識を行った。チュブリン, 2D2, デスモプラキンの観察には1次抗体としてそれぞれマウス抗 $\alpha$ -チュブリン単クローン抗体 (Amersham 社, UK), 2D2 抗体, マウス抗デスモプラキン単クローン抗体 (Boehringer Mannheim 社, Germany) を, 2次抗体として FITC 結合ウサギ抗マウス IgG (DAKO 社, Denmark) 反応させた。PBS で洗浄後, 1 mg/ml パラフェニレンジアミンを含む 90% グリセリン液で封入し, 以下の観察を行った。

### 2・2・3 蛍光顕微鏡及びレーザ共焦点走査顕微鏡 (confocal laser scanning microscope; LSM) による観察

上記のように作成した標本について, 蛍光顕微鏡 (Nikon FX) で観察した。更に, アクチン, チュブリン, 2D2 の spheroid 内の 3 次元的構造の観察のため, LSM (MRC-500, Bio-Rad 社, UK) を用い, 上下方向における光学的連続断面像及び重ね合わせ画像を得た。

### 2・3 透過型電子顕微鏡による観察

培養肝細胞を, 0.1 M カコジル酸緩衝液で pH を 7.4 に調整した 1% グルタルアルデヒド, 4% ホルムアルデヒドで 1 時間固定し, PBS で洗浄後, 1% オスミウム酸で 30 分間固定した。PBS 洗浄後, エタノール系列で脱水, エボン包埋, 超薄切片作成, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を行い, 観察した。

### 2・4 アルカリフォスファターゼ (ALP) 酵素組織化学

PVLA で被ったプラスチック培養皿より搔爬, 収集した初代培養 48 時間の肝細胞を 100×g, 10 分間の遠心分離にて沈澱させ, 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液で pH を 7.2 に調整した 4% パラホルムアルデヒドで 4℃, 10 時間浸漬固定を行った。次に 5  $\mu$ m の凍結連続切片を作製し, クエン酸鉛法<sup>8)</sup>に準じて, 37℃, 30 分間浸漬反応を行った。蒸留水で水洗後, 1% 黄色硫化アンモニウム液にて発色させ, 脱水封入し, 光学顕微鏡を用いて観察した。

### 2・5 Na-fluorescein による検索

2・1 で得られた初代培養 48 時間の肝細胞について, 0.5 mM Na-fluorescein を含んだ培養液で 37℃, 10 分間 incubate し, 培養液で十分に洗浄した後, 倒立型蛍光顕微鏡で観察した。

## 3 結 果

### 3・1 PVLA を基質とした初代培養肝細胞の条件設定

始めに, 培養条件を設定するため, 培養液に加え

たホルモン等の, 培養 48 時間目での spheroid 形成への影響を比較した。Ins のみの添加では spheroid 形成, 伸展傾向共にみられず, Dex のみの添加では, spheroid 形成と, わずかな伸展傾向を認めた。Ins 及び Dex の添加では, spheroid 形成の頻度は高くなるが, 伸展傾向は Dex のみと差はなかった。また, EGF の添加は spheroid 形成の頻度を著明に増大させた。以上の結果より, spheroid 形成の頻度を高くし, 細胞の伸展を抑制する培養条件を得るためには, 培養液に Ins, Dex, EGF を添加し, PVLA 濃度を 0.01% とすることが, 至適と考えられたので, 以後の実験はこれらの条件で行った。

分離した肝細胞は播種後 10~20 分で PVLA で被ったプラスチック培養皿またはカバーガラスに接着された。コラーゲンを基質とした培養肝細胞は播種 2 時間後より明らかに伸展し始め, 24 時間後には連続した単層を形成するのに対し, 0.01% PVLA を基質とした培養肝細胞は 24 時間後でもほとんど伸展せず, 球形の状態で細胞・基質間, 細胞・細胞間の接着が起り, 培養 48 時間後には spheroid を形成した (Fig. 1)。

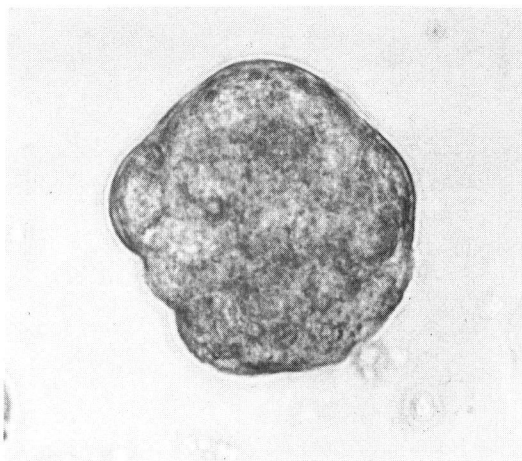
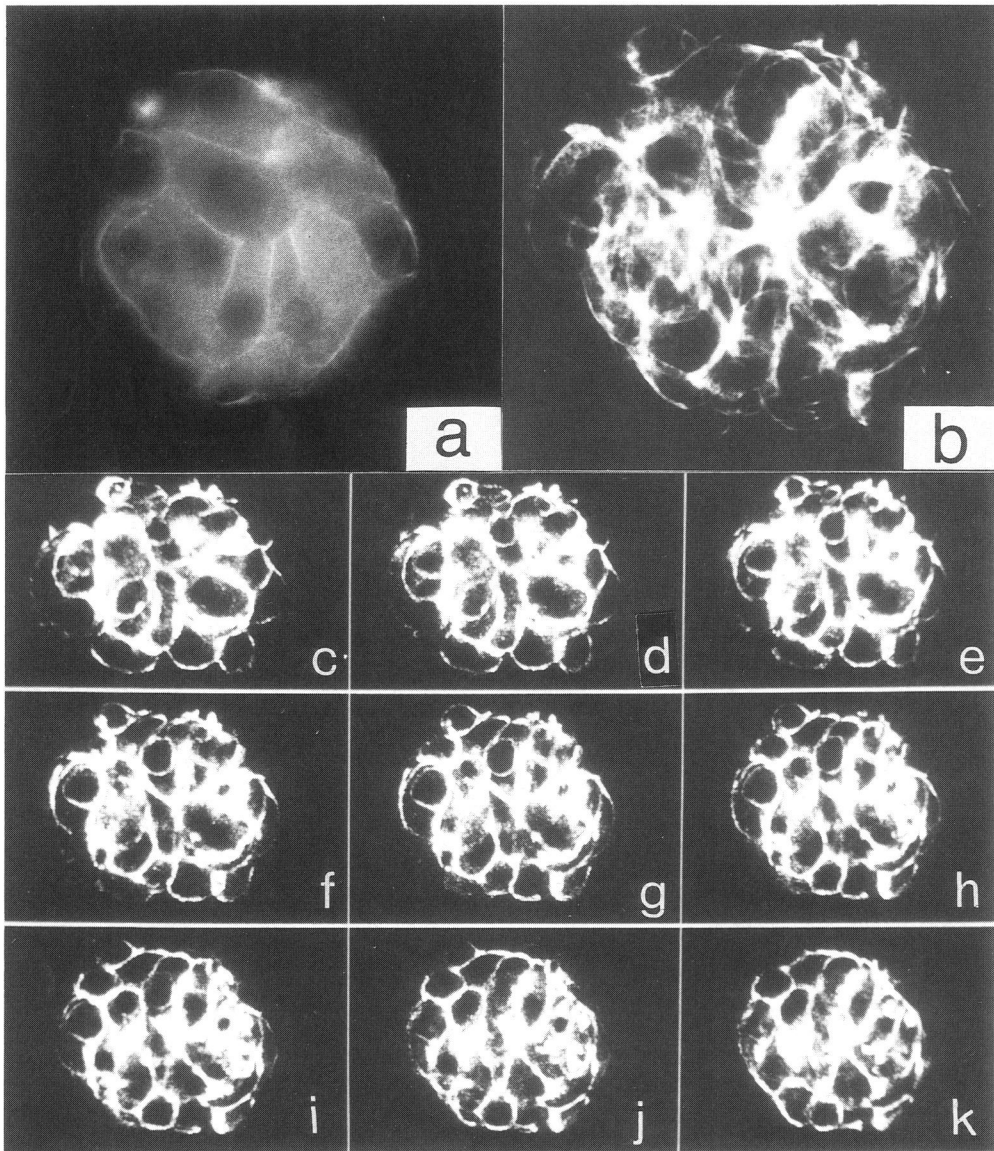


Fig. 1 Phase-contrast micrograph of 48-hr cultured rat hepatocytes on PVLA-coated dishes ( $\times 470$ ).

### 3・2 肝細胞 spheroid における細胞骨格の観察

#### 3・2・1 アクチン

培養 48 時間後の肝細胞 spheroid での蛍光顕微鏡による観察では, 細胞接着面及び細胞自由縁に沿う強い局在がみられた (Fig. 2a)。しかし, 細胞の重なり合いがあるため, spheroid の中心に近い部位での局在は不明瞭であった。そこで, LSM を用い, spheroid の basal 側より apical 側に 2  $\mu$ m 間隔で共焦点面を移動



**Fig. 2** Fluorescent micrographs of rhodamine-phalloidin stained 48-hr cultured rat hepatocytes on PVLA-coated dishes. a: An image obtained by conventional epifluorescence microscopy ( $\times 470$ ). c-k: Images of serial optical sections by LSM at  $2\mu\text{m}$  intervals from the basal (c) to the apical (k) region of the spheroid ( $\times 370$ ). b: An image formed by "merge" command of LSM from (c) to (k), ( $\times 700$ ).

させながら走査すると、spheroidの内部においても、細胞接着面に強い局在を示す、連続した管腔様構造が認められた (Fig. 2c-k)。また、連続断層像及びそれらの重ね合わせ画像において、管腔様構造の上下方向での連続性を示唆する所見を得た (Fig. 2b-k)。

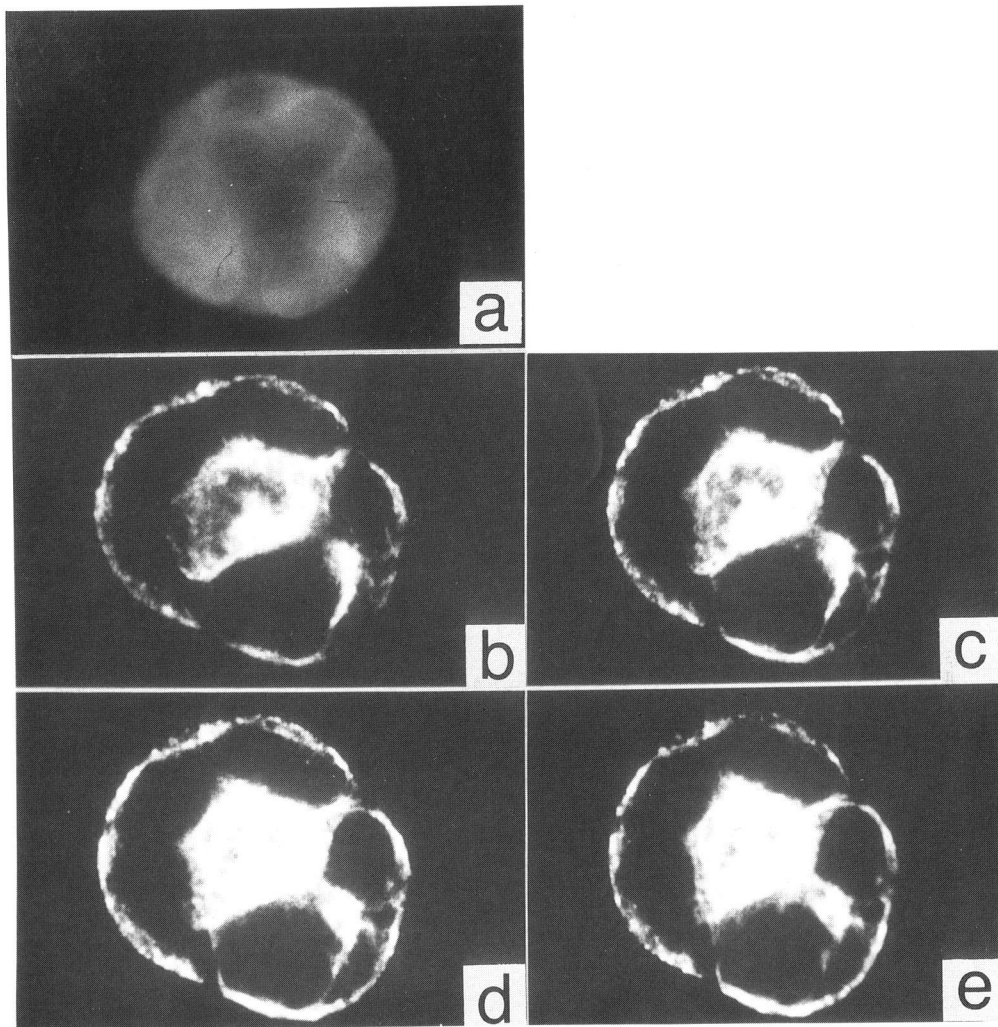
### 3・2・2 チュブリン

蛍光顕微鏡では細胞膜に沿った蛍光を示す細胞と、細胞内に網状に蛍光を示す細胞が観察されたが、詳細を

捉えることは困難であった (Fig. 3a)。しかし、LSMによる観察では、微小管の局在はspheroidの辺縁に全周にわたって強く認められた (Fig. 3b-e)。

### 3・3 PVLAを基質とする培養肝細胞における細胞間接着装置の観察

デスモソームの裏打ち蛋白として知られるデスマブラキンをを用いて、PVLA及びコラーゲンを基質とする培養肝細胞を経時的に観察、比較した。播種1時間後



**Fig. 3** Immunofluorescent micrographs of 48-hr cultured rat hepatocytes on PVLA-coated dishes labeled with anti- $\alpha$ -tubulin antibody. a: An image obtained by conventional epifluorescence microscopy ( $\times 470$ ). b-e: Images of serial optical sections by LSM at  $2\ \mu\text{m}$  intervals from the basal (b) to the apical (e) region of the spheroid ( $\times 470$ ).

及び2時間後では、基質に関わらず、細胞接着面や細胞表面の hemicanaliculus に沿った分布がみられた (Fig. 4a, d). コラーゲン基質の場合、播種2時間目以降、デスモプラキンは消失 (Fig. 4e) し、24, 48時間目に細胞接着面に再び出現する傾向がみられる (Fig. 4f) のに対し、PVLA 基質の培養肝細胞では、播種48時間後まで、観察した全ての時点で細胞接着面に点状または線状のデスモプラキンを認められた (Fig. 4b, c).

### 3.4 肝細胞 spheroid における毛細胆管ネットワークの機能に関する検索

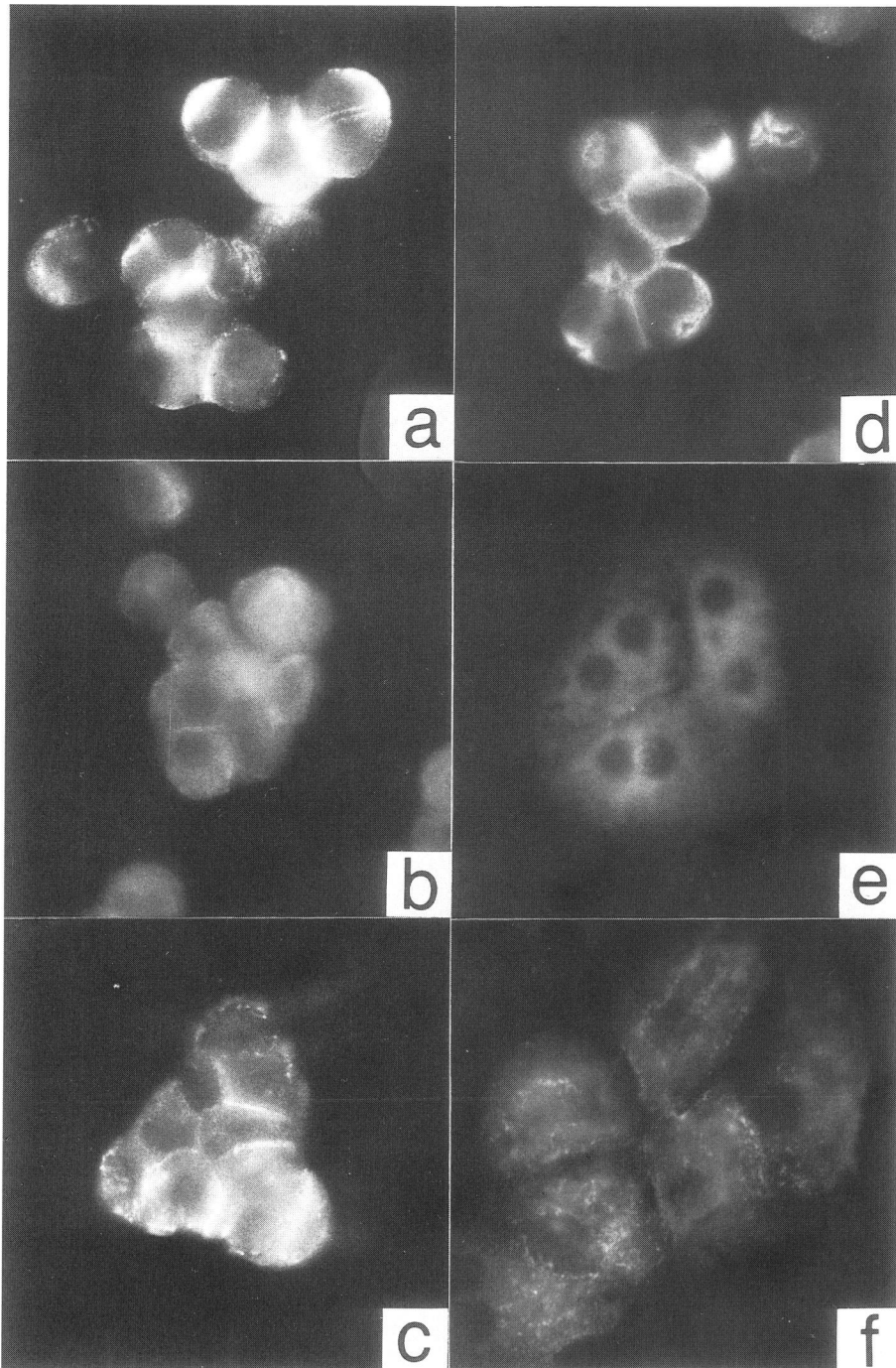
#### 3.4.1 2D2

蛍光顕微鏡による観察では、2D2 は spheroid 内に網状の局在を示し、細胞接着面に一致した局在と思われたが、spheroid の全周性の蛍光は認められなかった (Fig. 5a). LSM を用いて観察すると、細胞接着面における 2D2 の強い局在を認め、これは 3.2.1 で述べた毛細胆管のネットワークに一致する分布を示した (Fig. 5b-e).

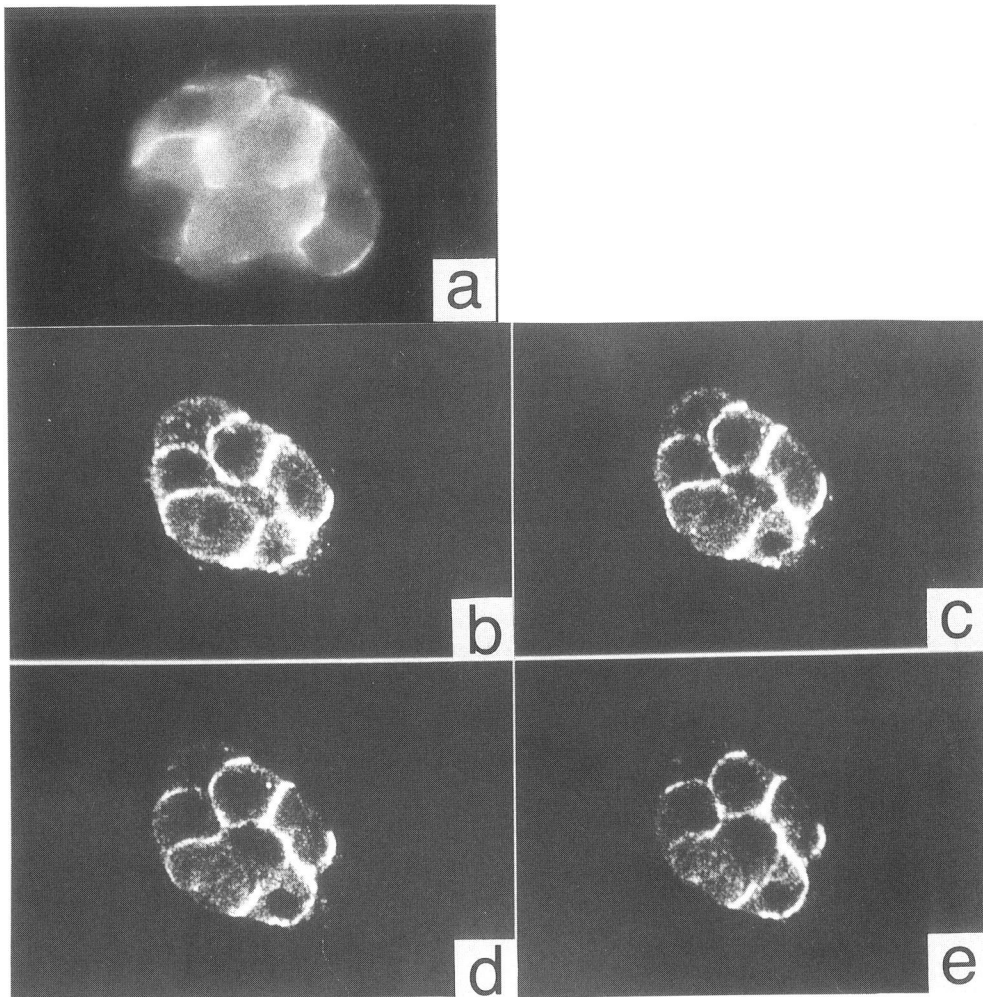
#### 3.4.2 ALP 酵素組織化学

PVLA を基質とした培養48時間後の肝細胞 spheroid では、Fig. 6 のように、細胞接着面に強い ALP 活性が認められた。これは前述の 2D2 の局在にほぼ一致

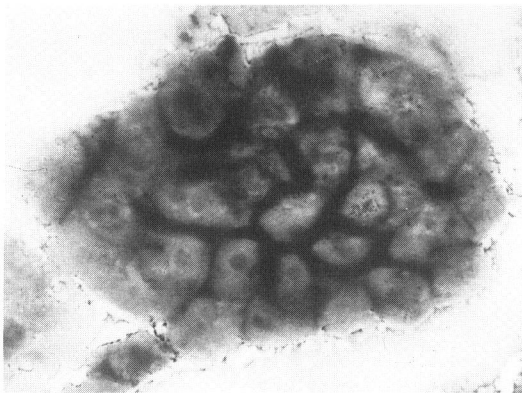




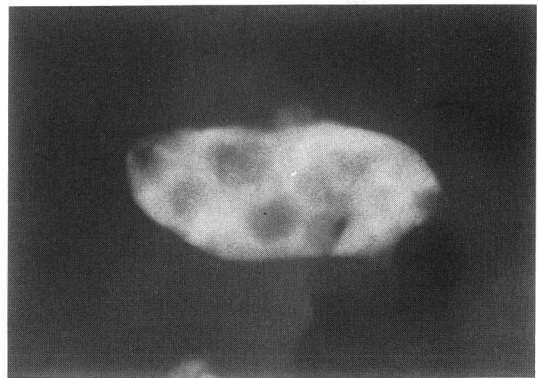
**Fig. 4** Immunofluorescent micrographs of rat hepatocytes labeled with anti-desmoplakin antibody. a-c: PVLA-coated dishes at the 2nd hr (a), the 4th hr (b) and the 24th hr (c) after plating. d-f: Type I collagen-coated dishes at the 2nd hr (d), the 4th hr (e) and the 24th hr (f) after plating. ( $\times 680$ ).



**Fig. 5** Immunofluorescent micrographs of 48-hr cultured rat hepatocytes labeled with 2D2 antibody. a: An image obtained by conventional epifluorescence microscopy ( $\times 470$ ). b-e: Images of serial optical sections by LSM at  $2\ \mu\text{m}$  intervals from the basal (b) to the apical (e) region of the spheroid ( $\times 470$ ).



**Fig. 6** Micrograph of histochemical demonstration of ALP in 48-hr cultured rat hepatocytes on PVLA-coated dishes ( $\times 680$ ).



**Fig. 7** Fluorescent micrograph of 48-hr cultured rat hepatocytes on PVLA-coated dishes exposed to Na-fluorescein for 10 min. ( $\times 470$ ).

することから、肝細胞 spheroid の細胞接着面には毛細胆管のネットワークが再形成されているものと考えられた。

### 3・4・3 Na-fluorescein による検索

培養 48 時間後の肝細胞 spheroid に、Na-fluorescein を反応させると、spheroid 内に網目状に蛍光が認められた (Fig. 7). これは Na-fluorescein が肝細胞内に取り込まれ、毛細胆管内に濃縮して排泄された結果と考えられた。

### 3・5 透過型電子顕微鏡による観察

培養 48 時間後の肝細胞 spheroid の透過型電子顕微鏡による観察では、肝細胞間に、微絨毛を持ち分岐した管腔が認められ (Fig. 8), PVLA を基質とした培養条件下での毛細胆管の再形成が超微構造的にも確認された。

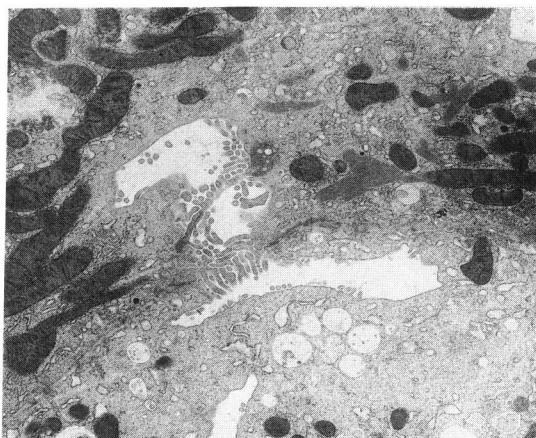


Fig. 8 Electron micrograph of 48-hr cultured rat hepatocytes on PVLA-coated dishes ( $\times 8700$ ).

## 4 考 察

### 4・1 多層立体培養の意義

spheroid 培養は、Moscona<sup>9)</sup> の embryonic cells を用いた報告が最初で、単層培養に比し、より *in vivo* に近い培養法として紹介された。一方、Lissitzky *et al.*<sup>10)</sup> は、胎仔ラット甲状腺細胞の培養 spheroid が、単層培養にみられない濾胞の形成やホルモンの産出を示すことを報告し、この培養法が分化した機能の維持に有用である可能性を示した。肝細胞に関しては、Landry *et al.*<sup>11)</sup> が、疎水性のメタクリレートである poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA) を基質として用い、基質との接着を阻害することによって、新生仔ラット肝細胞の spheroid を形成させている。

彼等はこの方法で、無血清培地で 1 カ月間以上、上皮様形態を維持することが可能で、アルブミン合成能も単層培養より長く維持されたと報告している。また、Spray *et al.*<sup>12)</sup> や Koide *et al.*<sup>1,13)</sup> は、グルコサミノグリカンやプロテオグリカンを用いて成熟ラット肝細胞の spheroid 培養を行い、単層培養に比し、gap junction の維持やアルブミンの産生能の点で優れていると報告している。一方、松本<sup>14)</sup> は疎水性培養皿を用いてラット肝細胞の spheroid 培養を行い、細胞膜の ALP 活性が単層培養より長く保たれることを認めている。このように、spheroid 培養は単層培養に比べ、形態維持のみならず、機能的にも *in vivo* に近い性格を保つために有用な方法と考えられている。しかし、これまでの spheroid 培養は、いずれも基質と肝細胞が接着しない条件を作り、浮遊状態にすることによって spheroid を作るため、前述した不便さのほかにも、同一細胞集団を経時的に観察することができないという欠点を持っている。

我々は、PVLA を基質としてラット肝細胞 spheroid 培養を行った。PVLA は小林ら<sup>2,3)</sup> により開発されたラクトースを側鎖に有するポリスチレンの誘導体で、この側鎖に対する識別機構を持つ肝細胞と特異的に接着する。その特徴は、接着に伴う肝細胞の伸展がみられないこと、接着機構が  $Ca^{2+}$  濃度に依存することであり、天然基質と比べ熱安定性に優れていること、肝細胞の asialoglycoprotein receptor (AGPR) に結合すること等である。従って、肝細胞が PVLA と接着した状態で spheroid を形成することが、これまでの spheroid 培養と異なる。更に、肝細胞の AGPR が類洞膜に存在すること<sup>15,16)</sup> から、肝細胞が類洞膜を基質に向けて接着し、生理的な方向性を保ったまま培養できる可能性もある。

### 4・2 spheroid における毛細胆管網の形成

アクチンは直径約 6 nm のマイクロフィラメントを構成し、生体内の肝細胞では特に毛細胆管周囲に豊富に存在する<sup>17)</sup>。肝細胞 spheroid をローダミン・ファロイジンで染色し、LSM による断層観察を行うと、spheroid の内部にアクチンの樹枝状の配列が見出された。断層像の重ね合わせにより、このアクチンの配列が互いに連なって、連続した網状構造を作っていることが確認された。このことから、spheroid 内部で、毛細胆管の立体的ネットワークが形成されている可能性が強く示唆された。単層培養肝細胞でも肝細胞間に毛細胆管が再構成される<sup>18,19)</sup> が、これらの毛細胆管は孤立性の cyst 様の管腔を作るだけで、隣りの管腔と連絡するこ



とはない。

そこで、毛細胆管膜に強い活性を認め、毛細胆管への胆汁成分の排泄に関与すると考えられる ALP について酵素組織化学的に検索した。spheroid の凍結切片について ALP 活性を調べたところ、spheroid 内のアクチンの樹枝状の局在に一致するように、肝細胞の間を結ぶ ALP のネットワークが証明された。一方、高坂と小川によって作製された 2D2 抗体は、特異的に毛細胆管膜ドメインの蛋白と反応することが確かめられている<sup>7)</sup>が、今回行った免疫組織化学の LSM による観察では、spheroid 内に連続したネットワークが検出された。これらの方法は、いずれも毛細胆管に対する特異性の点ではすぐれているが、ALP 染色は凍結切片を作製するため、立体的構造が捉えられない。一方、2D2 等の免疫組織化学は、spheroid 内部へ抗体を浸透させることが困難なため、大きな spheroid の内部が観察できないという弱点がある。そのため、spheroid 内の毛細胆管ネットワークを描出する目的には、ローダミン・ファロジンをを用いたアクチンの検出が最もすぐれていた。これらの成績から、spheroid 培養によって肝細胞の分化形質の一つである毛細胆管の再構成が起こり、生体内に近い毛細胆管のネットワークを形成することが明らかにされた。透過型電子顕微鏡による検索では、毛細胆管の内腔に微絨毛が観察され、毛細胆管としての機能を果たしていることが形態的にも示唆された。

そこで、Na-fluorescein を用いて機能的な検索を行った。Na-fluorescein は胆汁指向性<sup>20)</sup>で、diffusion によって肝細胞に入った後、濃縮されて毛細胆管に排泄されることが知られている<sup>21)</sup>。今回、培養 48 時間目の肝細胞 spheroid において、培養液中に加えられた Na-fluorescein が細胞間に濃縮して認められたことから、これまで述べてきた毛細胆管ネットワークが、毛細胆管として実際に機能していることが強く示唆された。

#### 4・3 spheroid における細胞間接着装置

デスモソームは上皮細胞や心筋細胞に良く発達している細胞間接着装置で、中間径フィラメントの細胞膜への結合部位として働く。デスモソームに局在する膜の裏打ち蛋白はデスモブラキンと呼ばれ、4 種類の分子量の異なる蛋白が同定されている<sup>22)</sup>。デスモソームは上皮細胞の癌化に伴って変化することが知られており、多くの研究がある。株化されたヒト肝芽腫細胞では、デスモソームは極めて少ないが、分化誘導に伴って再形成されることが報告されている<sup>23)</sup>。このようにデスモソームの形成は、肝細胞の分化形質の一つと考えられる。そ

こで、spheroid 培養におけるデスモブラキンの局在を経時的に検索し、コラーゲン基質の単層培養でのそれと比較した。その結果、PVLA 基質で培養した肝細胞では、少なくとも培養 48 時間目まで、連続して細胞膜にデスモソームの局在を認めることができ、spheroid が、コラーゲン基質での培養に比して、肝細胞の分化形質の維持に有用であることが示唆された。

以上述べたように、PVLA を基質とした spheroid 培養は、肝細胞間に毛細胆管のネットワークを形成し、細胞膜のデスモソームも維持されることから、cell-cell communication や cell-cell interaction 等の機能も維持されているものと考えられる。spheroid 培養によって、このような分化形質が保たれる理由は不明であるが、一つの可能性として、PVLA との接着が考えられる。細胞外基質は、ホルモンや神経伝達物質等と同様に、receptor を介して種々の second messenger を生じ、細胞骨格、特にアクチンの重合に変化を与え、細胞の形態を変え、間接的に物質代謝の変化を引き起こすと考えられている<sup>24)</sup>。特にコラーゲンは、integrin を介して adenylate cyclase を活性化し、細胞の cAMP は A-キナーゼを活性化させて、培養肝細胞の代謝を変化させる。またフィブロネクチンは、talin を介してアクチンの再分布を誘発し、細胞の伸展を引き起こすと考えられる<sup>24)</sup>。これに対して、我々が基質として用いた PVLA は、AGPR と特異的に結合し、receptor のリン酸化<sup>25)</sup>を引き起こすが、receptor と結合した asialoglycoprotein は細胞内に取り込まれ、ライソソームで分解されると考えられており、細胞の代謝系に影響を与えることは知られていない。このような差が肝細胞の機能維持の差となって表れる可能性も考えられる。

他方 spheroid は必ずしも基質に接着しない状態でも、機能の維持に適していることから、細胞同士が多層の集合体を形成すること自体が、細胞機能の維持に働いている可能性もある。Watson<sup>24)</sup>は *in situ* の細胞形態を保持することが、機能の維持に必要であると述べている。PVLA を基質とした立体培養では、*in vivo* の肝細胞索のように、肝細胞が立方に近い状態で立体的に配列していた。また、spheroid を構成する肝細胞を LSM で断層撮影すると、立方の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞<sup>26)</sup>と同様に、細胞膜に沿った微小管の縦方向の配列が観察され、spheroid を構成する肝細胞が立方を保っていることが確認された。

本研究では、PVLA を基質とすることによって、基質に接着した状態でのラット肝細胞の多層立体培養を

行った。このようにして形成された spheroid 内には毛細胆管が再構築され、それが連続して生体内の肝臓のように毛細胆管ネットワークを作るのみならず、機能的にも Na-fluorescein を排泄することが確認された。また、単層培養では短時間で消失し、再構成され難いデスマソームが、長時間 *in vivo* に近い状態で維持されることが確かめられた。

今回の多層立体培養の研究は、肝細胞のみならず、他の上皮系細胞、特に重層扁平上皮としての分化形質を有する表皮細胞等の多層立体培養を行う上での基礎を作るために役立つものと考えられる。また、今回検索した細胞間接着装置や細胞骨格は、表皮等の培養系でも、分化形質の指標として役立つ可能性がある。

## 5 要 約

PVLA を基質として成熟ラット肝細胞の初代培養を行い、基質に接着したまま肝細胞が多層立体化する spheroid 培養法の条件を設定した。肝細胞の分化形質の検索を行い、次のような結果を得た。

1. spheroid 内には毛細胆管が再構築され、毛細胆管は生体内の肝臓と同じようなネットワークを形成していることを確かめた。
2. 単層培養に比し、デスマソーム等の細胞間接着装置は長く維持された。LSM による断層撮影で、spheroid を構成する肝細胞は、細胞膜に沿った微小管の配列を示し、立方性を保っていることが認められた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲いただきました高橋誠教授、森道夫教授に深く感謝致します。また、PVLA をご供与いただいた東京工業大学、赤池敏宏教授及びご協力いただいた本学病理学教室、皮膚科学講座の諸先生及び研究補助員の方々に感謝致します。

## 文 献

1. Koide, N., Shinji, T., Tanabe, T., Asano, K., Kawaguchi, M., Sakaguchi, K., Koide, Y., Mori, M. and Tsuji, T.: Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **161**, 385-391 (1989)
2. 小林一清, 住友宏, 小林明, 石田正夫, 西沢真治, 赤池敏宏: オリゴ糖を側鎖にもつポリスチレンとラット肝細胞との相互作用. **高分子論文集** **42**, 719-724 (1985)
3. 小林明, 赤池敏宏, 宮田暉夫: 基質材料設計による肝細胞の無血清培養と肝シミュレータへの応用. **人工臓器** **15**, 1438-1441 (1986)
4. Sawada, N. and Tsukada, H.: Changes in phalloidin-sensitivity of hepatocytes of rats during 2-acetyl-amino-fluorene carcinogenesis. **Tumor Res.** **17**, 39-50 (1982)
5. Sawada, N., Tomomura, A., Sattler, C., Sattler, G., Kleinman H. and Pitot, H. C.: Effects of extracellular matrix components on the growth and differentiation of cultured rat hepatocytes. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** **23**, 267-273 (1987)
6. Kreamer, B., Staecker, J., Sawada, N., Sattler, G., Hsia, S. S. and Pitot, H. C.: Use of low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** **22**, 201-211 (1986)
7. 高坂一, 小川勝洋: モノクローナル抗体によるラット肝細胞膜 Wheat Germ Agglutinin 結合糖蛋白の解析. **札幌医学雑誌** **57**, 343-354 (1988)
8. Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase. **Histochemie** **11**, 88-96 (1967)
9. Moscona, A.: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. **Exp. Cell Res.** **22**, 455-470 (1961)
10. Lissitzky, S., Fayet, G., Giraud, A., Verrier, B. and Torresani, J.: Thyrotropin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine-thyroid cells. **Eur. J. Biochem.** **24**, 88-99 (1971)
11. Landry, J. and Freyer, J. P.: Regulatory Mechanisms in spheroidal aggregates of normal and cancerous cells. **Recent Results Cancer Res.** **95**, 50-66 (1984)
12. Spray, D. C., Fujita, M., Saez, J. C., Choi, H., Watanabe, T., Hertzberg, E., Rosenberg, L. C. and Reid, L. M.: Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures. **J. Cell Biol.** **105**, 541-551 (1987)
13. Koide, N., Sakaguchi, K., Koide, Y., Asano, K., Kawaguchi, M., Matsushima, H., Takenami, T., Shinji, T., Tanabe, T., Mori, M. and Tsuji, T.:

- Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. **Exp. Cell Res.** **186**, 227-235 (1990)
14. 松本偉男： 初代培養肝細胞の多細胞球状培養時の再組織構築における細胞極性の発現と維持. **肝臓** **31**, 952-959 (1990)
  15. Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J. A. M., Lodish, H. F. and Schwartz, A. L.: Immunocytochemical localization of the receptor for asialoglycoprotein in rat liver cells. **J. Cell Biol.** **92**, 865-870 (1982)
  16. Mizuno, M., Brown, W. R. and Vierling J. M.: Ultrastructural immunocytochemical localization of the asialoglycoprotein receptor in rat hepatocytes. **Gastroenterology** **87**, 763-769 (1984)
  17. Oyamada, M. and Mori, M.: Immunohistochemical demonstration of tubulin and actin in rat hepatocytes *in situ* using a perfusion extraction-fixation procedure. **J. Histochem. Cytochem.** **33**, 1197-1204 (1985)
  18. Oda, M., Price, V. M., Fisher, M. M. and Phillips, M. J.: Ultrastructure of bile canaliculi, with special reference to the surface coat and the pericanalicular web. **Lab. Invest.** **31**, 314-323 (1974)
  19. 朴哲斯, 佐藤睦, 澤田典均： 初代培養肝細胞の形態学的研究 特に細胞接着と毛細胆管構造の出現について. **札幌医学雑誌** **58**, 355-364 (1989)
  20. Gebhardt, R. and Jung, W.: Biliary secretion of sodium fluorescein in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes and its stimulation by nicotinamide. **J. Cell Sci.** **56**, 233-244 (1982)
  21. 伴野昌厚, 渡辺純夫, 広瀬美代子, 黒田博之, 浪久利彦： Na-fluorescein を用いた初代培養肝細胞の胆汁分泌機構の解析. **肝臓** **117**, 397 (1985)
  22. Miller, K., Matthey, D., Measures, H., Hopkins, C. and Garrod, D.: Localisation of the protein and glycoprotein components of bovine nasal epithelial desmosomes by immunoelectron microscopy. **EMBO J.** **6**, 885-889 (1987)
  23. 佐藤睦, 榎本克彦： ヒト肝芽腫細胞の分化形質誘導に関する研究. **札幌医学雑誌** **60**, 173-182 (1991)
  24. Watson, P. A.: Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. **FASEB J.** **5**, 2013-2019 (1991)
  25. Schwartz, A. L.: Phosphorylation of the human asialoglycoprotein receptor. **Biochem. J.** **223**, 481-486 (1984)
  26. Bacallao, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E. H. K. and Simons, K.: The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. **J. Cell Biol.** **109**, 2817-2832 (1989)

別刷請求先：

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学皮膚科学講座 山口貴嗣