

幼若肝細胞の分化誘導と Tryptophan 2, 3-dioxygenase 発現機構の研究

長尾 雅悦

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

Studies on *In Vitro* Induction of Terminal Differentiation in Immature Hepatocytes and Expression of Tryptophan Oxygenase

Masayoshi NAGAO

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Nakao)

Tryptophan 2, 3-dioxygenase (TO, EC 1. 13. 11. 11.) is a typical liver specific enzyme that appears in human liver postnatally and reaches to adult level 9 months after birth. In the primary culture of human hepatocytes, TO activity was not detected in the presence of 10^{-7} M dexamethasone and 2.5 mM tryptophan after 6 days of culture. It was shown that the TO gene was switched-off in the human fetal liver at 14 to 20 weeks of gestation. Immunocytochemical staining of TO showed that TO was not expressed as early as the first day after birth by a few mature hepatocytes, and that the number of hepatocytes expressing TO gradually increased during the early neonatal development. In contrast, immature hepatocytes actively proliferated in the culture without growth factors or serum, showing a labeling index with [3 H] thymidine of over 80% just after birth. Immature hepatocytes growth ability decreased rapidly with postnatal age. Double staining of hepatocytes from neonatal rat indicated that TO expressing cells and [3 H] thymidine incorporated cells were sorted out from each other, suggesting immature hepatocytes proliferate, but do not express TO. Differentiated cells express TO, but lose their growth activity. When neonatal hepatocytes without TO were cultured on the feeder layer of adult rat hepatocytes for 3.5 days, expression of TO increased dramatically and reached 70% of the total cells. On the contrary, the feeder layer strongly inhibited the growth of neonatal hepatocytes. Other feeder layers such as non-parenchymal hepatocytes, Reuber hepatoma cells, and Swiss 3 T 3 fibroblasts, had no effect on the reciprocal modulation of terminal differentiation (TO expression) and growth of neonatal hepatocytes. Furthermore, neither conditioned medium nor the extracellular matrix from primary culture of adult rat hepatocytes had any effect on the induction of cytodifferentiation of neonatal hepatocytes. "Dead" feeder layers of adult rat hepatocytes, obtained by treating the cells with cytosine arabinoside or drying them at 37°C, showed the same ability to induce cytodifferentiation of immature cells. When the dead feeder layers were treated with 1 N HCl and 0.1% trypsin, their ability to induce differentiation was almost completely lost. These results suggest that a cell surface component of adult rat hepatocytes, probably acid-labile protein, controls the terminal differentiation and the growth of immature hepatocytes.

(Received October 10, 1986 and accepted November 25, 1986)

Key words : Tryptophan 2, 3-dioxygenase, Gene expression, Primary culture of hepatocytes, Differentiation

TO : tryptophan 2, 3-dioxygenase
mRNA : messenger RNA
cDNA : complementary DNA

PBS : phosphate buffered saline
TAT : tyrosine aminotransferase

1 緒 言

近年の遺伝子工学の進歩により、先天代謝異常症を遺伝子レベルで診断し、さらにその遺伝子の構造異常を解明する時代が到来した。アミノ酸代謝異常症の領域でも、フェニルケトン尿症ではcDNAをプローブとして genomic DNA の制限酵素断片を Southern-blot 法により分析する制限酵素断片多型解析法が行われ、臨床的に羊水診断や亜型診断に有用であることが報告されている¹⁾。このように DNA の塩基配列の異常を基にアミノ酸代謝異常症を研究することが可能になったが、それぞれの疾患の遺伝子発現がどのようなメカニズムで障害されているかは、不明な事が多い。遺伝子の発現は単に DNA の構造だけでなく、ホルモンを初めとする液性因子とその細胞膜上のレセプター²⁾、cAMP や protein kinase C を介する細胞内セカンドメッセンジャー³⁻⁴⁾、遺伝子に直接作用する蛋白因子⁵⁾、クロマチンの構造⁶⁾、さらに細胞周期⁷⁾などの多種多様の因子が関与している。そこで *in vivo* の肝臓のアミノ酸代謝酵素の遺伝子発現を研究する *in vitro* の実験系として、初代培養肝細胞が最適である。肝臓には、アミノ酸代謝の key enzyme が多数発現しているが、その活性は胎生期から新生児、乳児期にかけて大きく変化する⁸⁾。すなわち、成長期の肝臓ではこれらの遺伝子の発現とその発現量の増加がみられ、その機構の解析は、アミノ酸代謝異常症を分子レベルで明らかにする鍵となる。そこで、著者は、トリプトファン代謝の key enzyme であり、肝細胞の最終分化のマーカーである tryptophan 2,3-dioxygenase (TO, EC 1.13.11.11.)⁹⁾ に注目した。TO は典型的な肝特異酵素で、ラットでは生後2週に初めて活性が出現し、生後4週に成熟ラット肝臓のレベルに達する¹⁰⁻¹³⁾。著者ら¹⁴⁾ は cDNA を用いた実験により、TO 遺伝子の転写促進による TO mRNA 量の増加によって、TO の発現調節が行われていることを明らかにした。今回、著者は、ヒト胎児及び幼若ラット初代培養肝細胞を用い、細胞レベルで TO の発現機構を検討したので報告する。

2 方 法

2.1 実験材料

肝細胞の分離及び培養に用いた試薬及び器具は、Nakamura *et al.*¹⁵⁾ の報告したものをを用いた。使用した試薬は、insulin 及び cytosine arabinoside (Sigma), dexamethasone 及び collagenase (和光純薬), aprotinin (Bayer), biotinylated anti-rabbit

IgG (Vector Laboratories), streptoavidin-horse radish peroxidase conjugate (Bethesda Research Laboratories), [Methyl-³H] thymidine (52.4 Ci/mmol, New England Nuclear) である。

Wistar 系の妊娠ラット(北海道実験動物センター)に出産させ、出生24時間以内の幼若ラットを0日齢、24~48時間のを1日齢というように区分し、実験動物として使用した。幼若ラットは、肝細胞分離に用いるまで、親ラットと同じケージで飼育した。成熟ラット肝細胞の分離には、体重150~200gのWistar系雄ラット(北海道実験動物センター)を用いた。

2.2 酵素活性の測定

Greengard and Dewey¹⁰⁾の方法に従い、胎児肝及び剖検肝(胎生3カ月より生後11歳までの病理組織学的に正常な肝臓で、-80℃に凍結保存しておいたもの)のTOの活性測定を行った。肝重量の4倍の5mM tryptophan, 25mM imidazole, 1mM EDTA, 0.14M KCl, pH 7.0を加え、Potter homogenizerにてホモジネイトした後、10,000×gで60分間遠心した。遠心上清0.1mlにH₂O 0.4ml及び標準反応液(5mM tryptophan, 4μM methemoglobin, 40mM potassium phosphate buffer, pH 7.0) 0.5mlを加え、100振盪/分で振盪しながら、37℃、30分間インキュベイトした。反応は15% metaphosphoric acid 0.5mlで停止させ、3,000 rpmで20分間遠心後、上清に0.4mlの1N NaOHを加え、365nmの吸光度を測定した。酵素活性は1μmol of kynurenine/mg protein per hrを1milliunitとして表わした。培養肝細胞のTO活性の測定の際は、径60mmのプラスチック培養皿に1/2に希釈した標準反応液を2.5mlを加え、ラバーポリスマンで細胞をそぎ落とした後、ホモジネイトし、以下剖検肝の場合と同様に行った。

Tyrosine aminotransferase (TAT, EC 2.6.1.5.)の活性測定はGranner and Tomkins¹⁵⁾の方法によった。培養肝細胞を10⁻³M EDTA-10⁻³M DTT (dithiothreitol)-0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.6)を加え、ラバーポリスマンでそぎ落とし、ホモジネイトの後、40,000×gで20分間遠心し、その上清を活性測定に用いた。0.8mlの7mM Tyrosine-0.125M potassium phosphate buffer (pH 7.6)に0.02mlのα-keto-glutarate (0.5M), 0.01mlのpyridoxal-5' phosphate (5mM)及び上清を0.1ml加えて、37℃、30分間インキュベイトした。反応は0.07mlの10N KOHで停止させ、さらに37℃、30分間インキュベイトし331nmの吸光度を測定

した。酵素活性は $1 \mu\text{mol}$ of p-hydroxyphenyl pyruvate/mg protein per min を 1 milliunit として表わした。

2.3 肝細胞の初代培養

2.3.1 ヒト胎児肝細胞

法的手続により人工妊娠中絶を行った胎生 14 週から 20 週の胎児より肝細胞を分離・培養した。手術後、できるだけ速やかに、肝臓をとり出し、 Ca^{2+} を含まない 5 mM EGTA-Hanks 液で洗浄し脱血した。0.05% のコラゲナーゼ液を注射針で直接、肝実質内に 5~10 分間注入した後、メスで約 1 mm 角の組織片とし、200 ml のエルレンマイヤーのフラスコに入れ、37°C の恒温槽中で、60 振盪/分で振盪しながら、約 15 分間インキュベイトした。これを 150 メッシュの細胞濾過器で濾過後、100 ml の MEM (Minimum Essential media) 培地を加え、 $50 \times g$ 、1 分間の低速遠心を行い、その沈渣を肝実質細胞として用いた。分離された肝細胞を I 型コラーゲンを塗布したプラスチック培養皿に 4×10^5 cells/cm² の密度でまき、10% 牛胎児血清、 10^{-9} M insulin 及び 10^{-9} M dexamethasone を添加した Williams E (WE) 培地で、単層培養を行った。

2.3.2 幼若ラット及び成熟ラット肝細胞

幼若ラット (生後 0 日~14 日) をエーテル麻酔し開腹した。24 ゲージの静脈留置針を門脈内に挿入し、0.05% のコラゲナーゼ液で 10~15 分間灌流した。肝臓を取り出し、4°C の MEM 培地中でゆるやかにピペティングし細胞を分散させ、細胞濾過器で濾過後、不消化の肝臓組織や結合組織を取り除き、 $50 \times g$ 、1 分間遠心後、沈渣を肝実質細胞として用いた。成熟ラット肝細胞の分離は、以前 Nakamura *et al.*¹⁶⁾ が報告したように *in situ* のコラゲナーゼ灌流法により行った。幼若ラット肝細胞は 4×10^5 cells/cm² の密度で成熟ラット肝細胞は 2.5×10^5 cells/cm² の密度でまき、5% 牛血清、 10^{-9} M insulin 及び 10^{-9} M dexamethasone を添加した WE 培地を用いてプラスチック培養皿上で単層培養を開始した。2 時間後に、血清及びホルモン無添加で aprotinin ($0.1 \mu\text{g/ml}$) を含む WE 培地に交換し培養を続けた。

2.4 TO の免疫細胞化学

TO 遺伝子の発現を検索する為、肝細胞を TO 誘導培地 (WE 培地に 2.5 mM tryptophan と 10^{-7} M dexamethasone を添加) で 24 時間培養した。細胞を 4°C の 137 mM NaCl-2 mM KCl-8 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 (phosphate buffered saline, PBS) で洗浄後 Gendre 液 (90% ピクリン酸飽

和エタノール/10%ホルマリン/酢酸, 85:10:5) で 10 分間固定し、冷 PBS で 10 回洗浄した。TO の免疫細胞化学には、streptoavidin-biotin-peroxidase 法を用いた¹⁶⁾。固定した培養肝細胞を 0.3% H_2O_2 添加メタノールで 30 分間、インキュベイトした後、冷 PBS で洗浄し、10 倍希釈したヤギ血清で 30 分間インキュベイトし、再び冷 PBS で洗浄した。次に 200 倍希釈 ($10 \mu\text{g/ml}$) した anti-TO IgG¹⁷⁾ で室温に 60 分間インキュベイトした。冷 PBS で洗浄後、100 倍希釈の biotinylated anti-rabbit IgG で室温、60 分間インキュベイトし、再び冷 PBS で洗浄してから、400 倍希釈の streptoavidin-peroxidase 複合体で、室温、30 分間インキュベイトした。冷 PBS で十分に洗浄後、Graham-Karnovsky 液 (0.005% H_2O_2 , 0.01 M imidazole, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6) を用いて peroxidase 発色反応を行った。細胞はヘマトキシリンで対比染色した。TO を発現した細胞を倒立顕微鏡下で数え、全細胞に対する比率で表した。統計学的な誤差を少なくする為、TO の発現の程度により 400~800 の細胞について検討した。

2.5 TO 抗原量の免疫学的測定 (Dot-immunobinding assay)

培養肝細胞に 0.5 M NaCl-5 mM tryptophan-20 mM Tris HCl buffer (pH 7.5) を加えて、ラバーポリスマンでそぎ落とした後、Polytron® Homogenizer (Kinematica 社) で 1.5 分間ホモジネイトした後、 $25,000 \times g$ 、20 分間遠心した。上清を Bio-dot® 微量濾過装置 (BIO-RAD) を用いて、ニトロセルロースペーパーに結合させた。ニトロセルロースペーパーはあらかじめ 10% ヤギ血清で処理しておいた。PBS-0.1% Tween 20 で洗浄後、200 倍希釈の anti-TO IgG¹⁷⁾ と室温で 2 時間反応させた。PBS-0.1% Tween 20 で洗浄後、100 倍希釈の biotinylated anti-rabbit IgG とインキュベイトし、再び洗浄し、400 倍希釈の streptoavidin-peroxidase 複合体と 1 時間、インキュベイトした。PBS-0.1% Tween 20 で洗浄後、Graham-Karnovsky 液で peroxidase 発色反応を行った。各点を densitometer でスキャンし、レコーダーに記録されたピーク領域の面積を測定し、 1mm^2 を 1 scanning unit として表わした。

2.6 [³H] thymidine による肝細胞のラベルとオートラジオグラフィ

[³H] thymidine ($2.5 \mu\text{Ci}$, 0.3mCi/mmol) を 2 日間培養した肝細胞に加えた。24 時間後、細胞を冷 PBS で洗浄し、Gendre 液で 10 分間固定した後、乳剤

(Sakura NR-M 2)を塗布した¹⁸⁾。4℃で1週間感光させ、D-19 現像液 (Kodak) で現像した。核がラベルされた細胞の数を倒立顕微鏡下で測定した。1つの培養皿につき約1,000の細胞について検討した。

2.7 支持細胞層の調整

支持細胞層の調整の為に Reuber hepatoma H₄-II-E 細胞 (獨協医大丹羽章博士より供与) 及び Swiss 3 T 3 細胞 (神戸大学医学部高井義美博士より供与) の培養を行った。両者とも10%牛血清を添加した Dulbecco 改良 MEM (DME) 培地を用い、プラスチック培養皿上に単層培養した。Reuber hepatoma 細胞は 4×10^4 cells/cm² の細胞密度で培養を開始し、準集密状態に達したものを支持細胞層として用いた。成熟ラット肝非実質細胞は、肝実質細胞の分離の際に得られる遠心上清をさらに $200 \times g$, 5分間遠心し、その沈渣を 0.75×10^5 cells/cm² の密度で、 10^{-9} M insulin, 10^{-9} M dexamethasone 及び 5 U/ml aprotinin 添加 WE 培地で1.5日培養した。成熟ラット肝実質細胞は 3×10^4 cells/cm² の低細胞密度でまき、1.5日培養した。幼若肝細胞をこれらの支持細胞層の上にまき、2・2で述べた条件で培養を行った。

成熟肝実質細胞よりなる支持細胞層を殺すため、100 μ g/ml の cytosine arabinoside で24時間、インキュベートするか、37℃の乾燥器中で乾燥させる操作を行った。また、支持細胞層を冷エタノールあるいは4%パラホルムアルデヒドで、10分間固定した。支持細胞層の効果に対する酸の影響を調べるため、殺した支持細胞層を1N HClと室温で1時間、インキュベートした。代表的蛋白分解酵素であるトリプシンの影響を調べるため、0.1%トリプシンで室温、1時間インキュベートした。反応を1mM phenylmethylsulfonyl fluoride で停止し、PBSで洗浄した。

2.8 更生培地と細胞間基質の調整

成熟ラット肝細胞を 2.5×10^5 cells/cm² の密度でまき、 10^{-9} M insulin, 10^{-9} M dexamethasone 及び 5 U/ml の aprotinin を添加した WE 培地で2日間培養した。この培地を集め $500 \times g$, 10分間遠心しその上清を透析し更生培地とした。

細胞間基質の調整には、培養肝細胞を1% Triton X-100 in PBSで1時間室温で消化し、残渣を0.025 N NH₄OHで除いた後、PBSで10回洗浄する方法を用いた¹⁹⁾。

3 成 績

3.1 胎児及び生後ヒト肝臓での TO の発現

3.1.1 成長に伴う TO 活性の変化

ヒト肝臓での TO の酵素活性は、胎児期を通じて低いレベルにあるが、新生児早期より活性の上昇を認め、特に生後9カ月目ごろより急激な上昇を認めた (Fig. 1)。この酵素発達のパターンは、以前報告されたラット肝臓での TO 及び glucokinase (EC. 2. 7. 1. 2.) の変化と類似しており、ヒトにおいても肝臓の最終分化の指標となることが確かめられた。

3.1.2 胎児培養肝細胞での TO の発現

分離された胎児肝細胞は培養開始2~3時間後より接着を初め、核が鮮明に観察されるようになった。培養1日後には、細胞間接着が強固となり単層を形成した。成熟肝細胞と違ってその後も活発な増殖能力を示し、培養6日後には Fig. 2 に示すような純粋に胎児肝実質細胞からなる単層細胞が観察された。この細胞を用い、培養2日目、4日目、6日目の TO 及び TAT の活性を測定した。

成熟肝細胞の TO 活性を最大に誘導する TO 誘導培地で培養を続けたにもかかわらず、培養6日を経過しても、TO の誘導は認められなかった。一方、TAT は培地に含まれる dexamethasone に応答して、培養日数の経過とともに活性の上昇がみられた。以上の結果より、胎生14週から20週の胎児肝臓では TO 遺伝子はスイッチ-オフの状態にあるが、TAT 遺伝子はスイッチ-オン状態にあると考えられた (Table 1)。

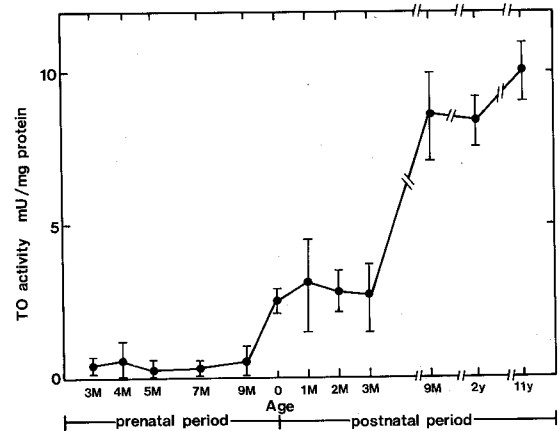


Fig. 1 Developmental change of TO activity in fetal and postnatal human liver. Values are means \pm S. D. for 3 experiments.

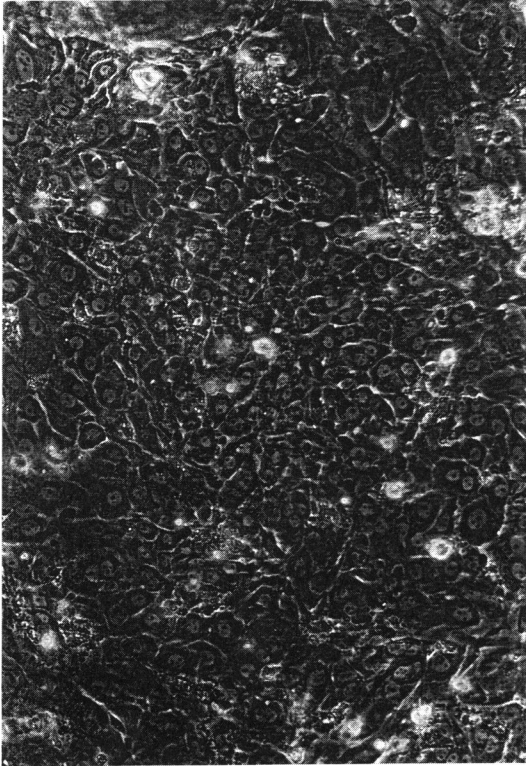


Fig. 2 Phase-contrast microscopic appearance of hepatocytes from fetus of 16 weeks of gestation. Hepatocytes were cultured in Williams medium E supplemented with 10% fetal calf serum, 10^{-9} M insulin, and 10^{-9} M dexamethasone for 6 days. ($\times 155$)

Table 1 Expression of TO and TAT in human fetal hepatocytes during primary culture.

Days in culture	TO activity milliunits/mg protein	TAT activity mg protein
2	1.18 ± 0.11	0.27 ± 0.66
4	1.32 ± 0.34	6.13 ± 0.85
6	1.48 ± 0.08	9.37 ± 1.24

Culture conditions were described in 2.3.1. Cells for assay of TO were supplemented with 2.5 mM tryptophan and 10^{-7} M dexamethasone and cells for TAT were with only 10^{-7} M dexamethasone. Values are means from three experiments \pm S. D.

3.2 幼若ラット肝細胞の増殖と分化の相反的調節

3.2.1 TOの免疫細胞化学

生後の各日齢のラット肝臓より肝細胞を分離し、集密状態に近い細胞密度で培養を行った。培養開始12時間後、 10^{-7} M dexamethasone と 2.5 mM tryptophan を添加した無血清の WE 培地に交換して、24 時

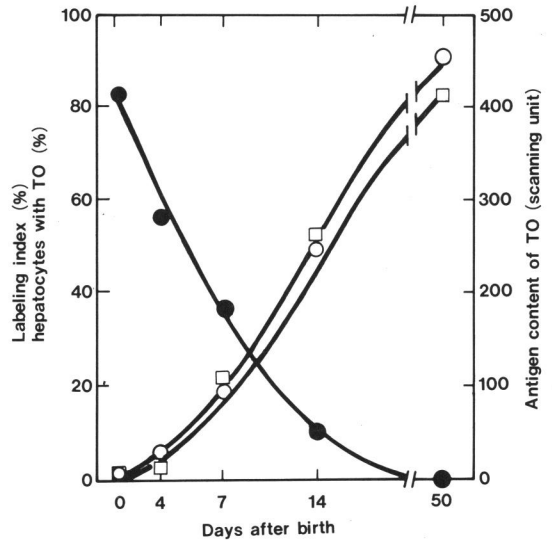


Fig. 3 Reciprocal change of growth and differentiation of rat hepatocytes during development. Hepatocytes were isolated on the indicated days after birth and cultured for 1 day in serum and hormone free medium and "TO inducing medium" for 1 day. ○: percent of hepatocytes with TO expression, □: amount of TO, ●: labeling index.

間 TO の誘導を行った。Fig. 4 に、生後 0 日、4 日、7 日、50 日の肝細胞の TO の免疫細胞化学を示す。抗 TO 抗体により、TO は特異的に染色され、TO を発現した分化細胞と発現していない未分化細胞は明瞭に区別することができた。生後 0 日の肝細胞では約 1% 以下の細胞にのみ TO の発現がみられた。これは、著者らが TO mRNA が生後 0 日の肝臓でわずかに検出できた結果と一致する。初めの生後 1 週間で TO を発現した細胞はゆるやかに増加するが、その後、急激に増加して生後 50 日では、ほとんどの細胞が TO を発現していた (Fig. 3, 4)。これらの変化は Fig. 3 に示した dot-immunobinding assay により測定した TO 抗原量の変化や、以前報告した TO mRNA の変化¹⁴⁾ と良く一致していた。

3.2.2 幼若ラット肝細胞の増殖能

幼若ラット肝細胞は、血清やホルモン無添加でも非常に良く増殖する。 $[^3\text{H}]$ thymidine のとりこみをみたラベリング・インデックスでは、生後 0 日の肝細胞は約 80% ラベルされるが、その後日齢とともに急速に減少し、成熟ラット肝細胞ではほとんどラベルされない (Fig. 3)。すなわち成長とともに、肝細胞の増殖能力は低下する一方、3.2.1 で述べたように、TO の発現は急激に増加する。

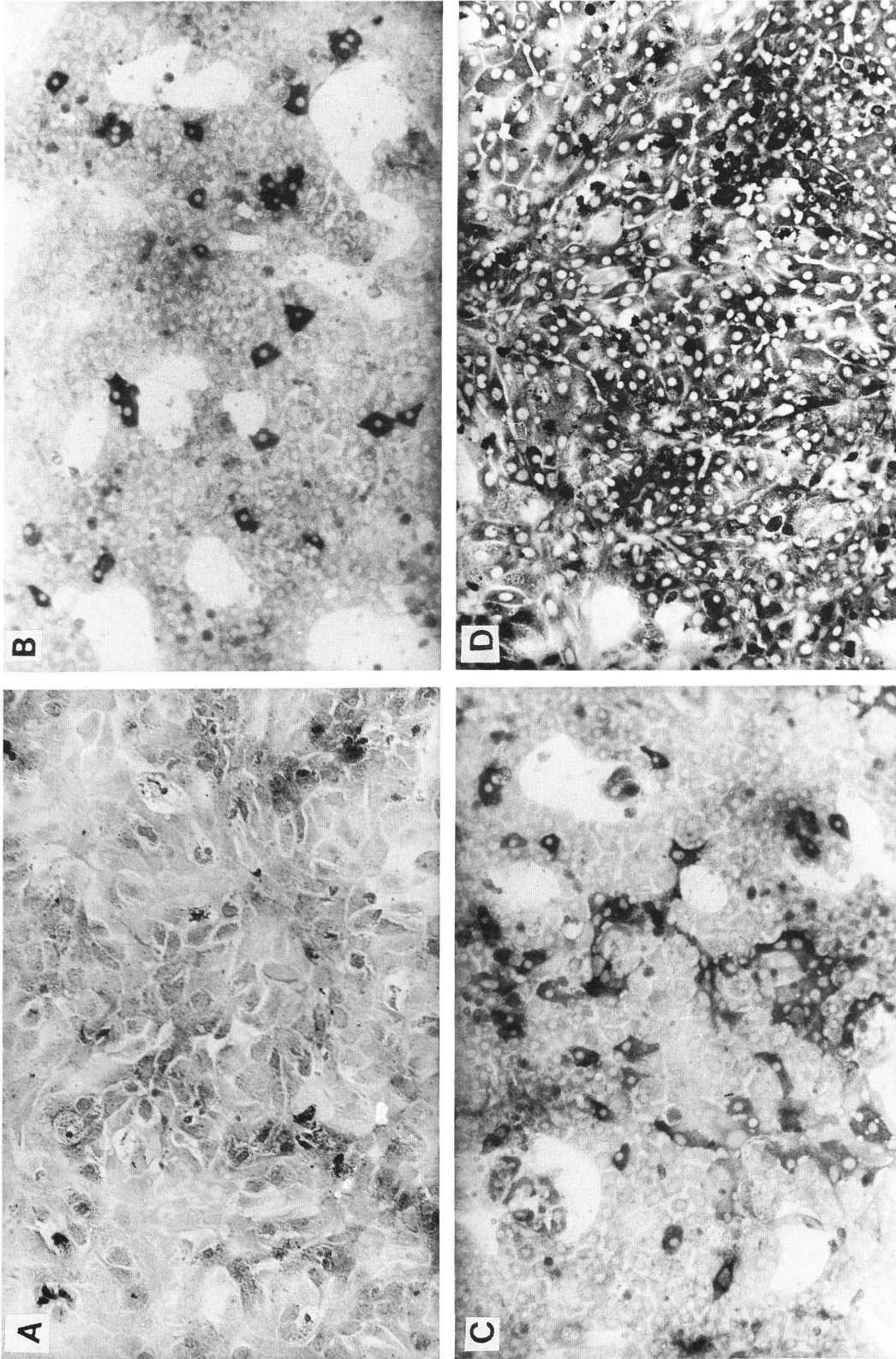


Fig. 4 Immunocytochemical staining of TO in primary cultured hepatocytes from rats of various ages. Isolated hepatocytes were cultured on collagen coated dishes in serum- and hormone-free medium for 1 day and then in "TO inducing medium" for 1 day. TO was stained immunocytochemically as described in 2.4. A. day-0, B. day-4, C. day-7, D. day-50. ($\times 155$)

3・2・3 増殖細胞と TO 発現細胞の関係

[³H] thymidine をとりこんだ増殖細胞と TO を発現した細胞がどのような関係にあるのかを二重染色法を用いて検討した。Fig. 5 に、生後 7 日の肝細胞の二重染色の結果を示す。最初に TO の免疫細胞化学を行い、ひき続いて、DNA 合成をオートラジオグラフィにより検索した。興味深いのは、DNA 合成を行った細胞と、TO を発現した細胞が完全に区別されることである。すなわち、TO の染色と DNA 合成の両者が陽性の細胞は 1% 以下であった。未分化な肝細胞は TO を発現していないが増殖能力を持ち、TO 発現を獲得すると増殖しない細胞となるのである。

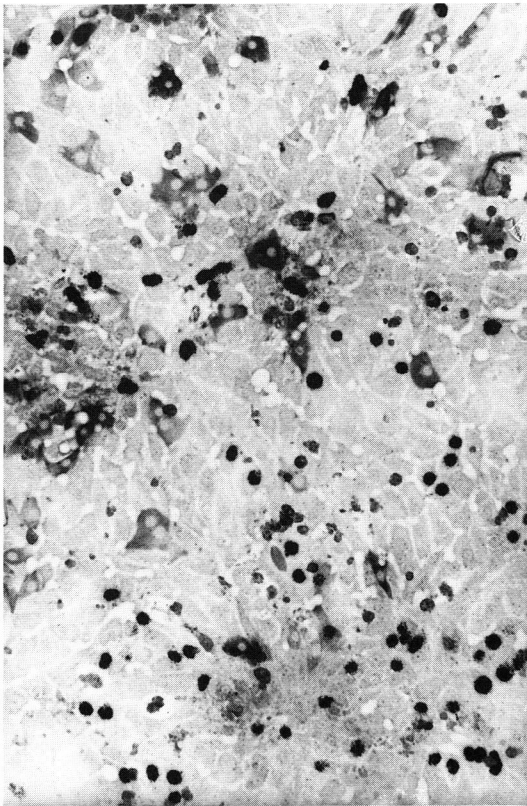


Fig. 5 Distinction of neonatal rat hepatocytes in primary culture showing autonomous growth and TO expression. Hepatocytes from 7-day old rats were isolated and cultured in serum- and hormone-free conditions for 2 days. Then dexamethasone (10^{-7} M), and [³H] thymidine ($2.5 \mu\text{Ci/ml}$) were added in fresh medium containing 2.5 mM tryptophan. After 24 h, the cells were fixed with Gendre's solution and then immunocytochemistry and autoradiography were carried out. ($\times 155$)

3・3 幼若ラット肝細胞の *in vitro* での分化誘導

一般に細胞間接触及び細胞と細胞間基質との接触は、細胞分化に重要な因子と考えられている²⁰⁻²¹⁾。そこで、これらの因子の幼若肝細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

3・3・1 成熟ラット肝実質細胞からなる支持細胞層による分化誘導

成熟ラット肝実質細胞よりなる支持細胞層を 3×10^4 cells/cm² の非常に低い細胞密度で形成し、この上に生後 0 日の幼若肝細胞を培養すると 70% 以上の幼若肝細胞

Table 2 Effects of various feeder layers on differentiation of neonatal rat hepatocytes.

Feeder layer	Hepatocytes expressing TO (%)
None (collagen coated)	5.2±2.1
adult rat hepatocytes	73.4±6.1
Non-parenchymal hepatocytes from adult rats	2.1±0.9
Reuber hepatoma cells	1.9±0.8
Swiss 3T3 cells	1.2±0.7

Hepatocytes from 0-day old rats were cultured on various feeder layers or collagen coated dishes in serum- and hormone-free medium for 2.5 days and then in "TO inducing medium" for 1 day. Hepatocytes with TO was quantitated as described in 2.4. Values are means±S. D. for three experiments.

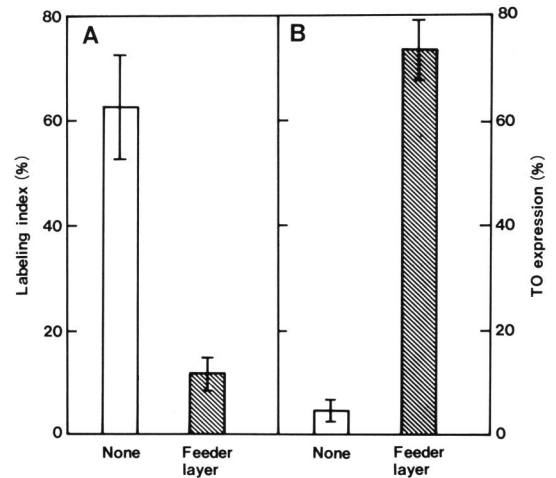


Fig. 6 Induction of differentiation and inhibition of autonomous growth of hepatocytes from 0-day old rats by contact with adult rat hepatocytes. Values are means±S. D. for three experiments. A: labeling index, B: expression of TO. Open bars: no feeder layer (collagen coated dishes), Hatched bars: with a feeder layer of adult rat hepatocytes.

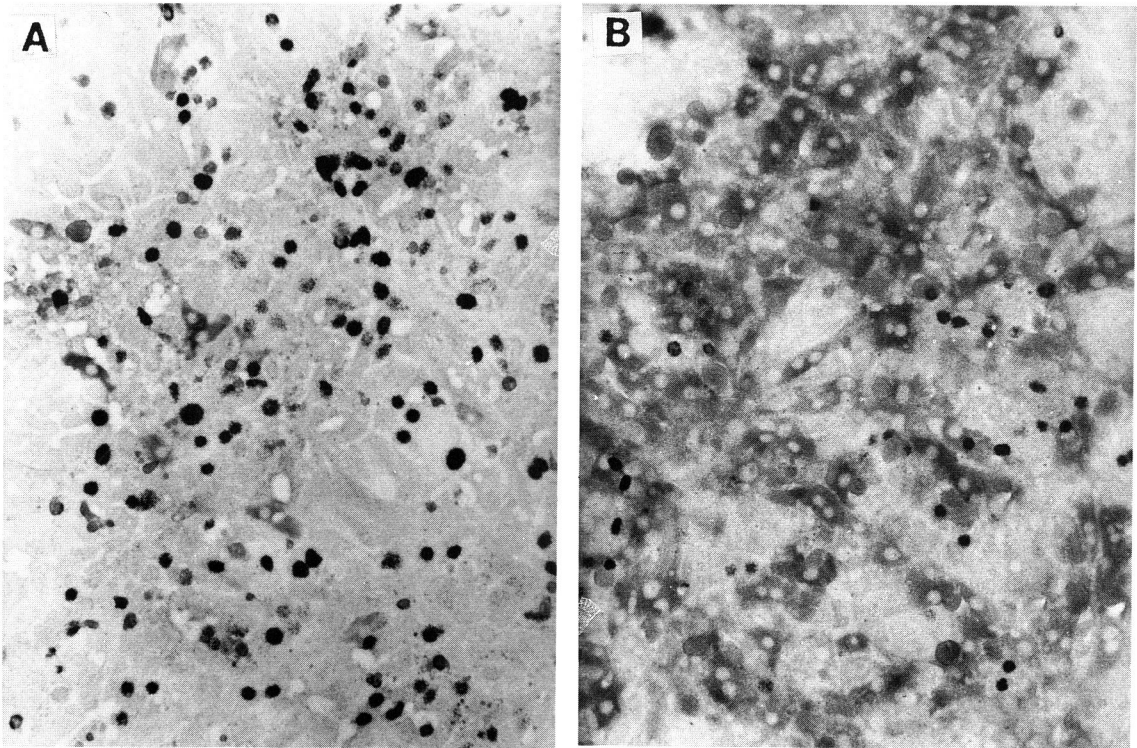


Fig. 7 Effect of a feeder layer of adult rat hepatocytes on differentiation and autonomous growth of 0-day old rat hepatocytes in primary culture. A: no feeder layer (collagen coated dish), B: with a feeder layer of adult rat hepatocytes. ($\times 155$).

胞が分化し TO を発現した (Fig. 6, 7, Table 2). この支持細胞層上での TO の発現は, I 型コラーゲン上での場合の約 14 倍であった (Table 2). 一方, この支持細胞層は, 幼若肝細胞の増殖を阻害した (Fig. 6, 7). この実験で, 幼若肝細胞と支持細胞層である成熟肝細胞とは, 容易に区別できる. なぜなら, 支持細胞層として用いた成熟肝細胞の数は, 幼若肝細胞の 10% 以下であり, 形態学的にも, 幼若肝細胞は小さく大部分が単核であるが, 成熟肝細胞の多くが二核である. Fig. 6 は, 成熟肝細胞の支持細胞層の, 未分化細胞に対する増殖と分化への影響を数量的に表現したものである. コラーゲン上では幼若肝細胞は活発に増殖し, 63.4% の細胞が $[^3\text{H}]$ thymidine でラベルされたが, TO を発現した細胞はわずか 4.9% であった. 対照的に, 支持細胞層上では, TO の発現が 73.4% の細胞にみられ, $[^3\text{H}]$ thymidine でラベルされた細胞は 11.8% であった. この結果より, 幼若肝細胞の分化は, 成熟肝実質細胞との細胞間接触により誘導され, 幼若肝細胞が分化して TO を発現してしまうと, 増殖能力を失うことが明らかになった.

3・3・2 各種支持細胞層, 細胞間基質及び更生培地による分化誘導

成熟ラット肝非実質細胞, Reuber hepatoma 細胞及び Swiss 3 T 3 線維芽細胞を支持細胞層とした時の分化誘導能を調べたが, 幼若肝細胞の TO の発現に, 何の効果もみられなかった (Table 2). すなわち, 分化誘導能は成熟ラット肝実質細胞に特異的である. 未分化細胞の分化誘導は, 成熟肝細胞より分泌される液性因子や細胞間基質によって引き起こされる可能性もある. しかしながら, Table 3 に示したように, 成熟肝細胞の更生培地も細胞間基質も効果が無かった. 従って, 幼若肝細胞と成熟肝細胞との直接的な接触, おそらく細胞膜上に存在する因子との接触が細胞分化に必要とされる.

3・3・3 支持細胞層の処理

支持細胞層が生きている必要があるかどうかを調べるために cytosine arabinoside ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), 10% エタノール, 4% パラホルムアルデヒド, 1 N HCl また, 37°C で乾燥させるという処理をそれぞれ行った. Cytosine arabinoside で処理後の細胞はトリパンブルー

Table 3 Effects of extracellular matrix and conditioned medium from adult rat hepatocytes on differentiation of neonatal rat hepatocytes.

Extracellular matrix or conditioned medium	Hepatocytes expressing TO (%)
None (plastic dish)	6.1±3.5
Collagen (type I) coated	5.2±2.1
Extracellular matrix from adult rat hepatocytes	3.7±0.9
Extracellular matrix from 7-day old rat hepatocytes	3.2±1.1
Conditioned medium from cultures of adult rat hepatocytes	3.8±1.5

Hepatocytes from 0-day old rats were cultured on the indicated substrata. Conditioned medium was prepared as described in 2.8. Cells were stained for TO immunocytochemically after culture for 3.5 days with "TO inducing medium" for the last day. Values are means±S.D. for three experiments.

テストで死んでいることを確認した。生後0日の肝細胞を cytosine arabinoside で処理した支持細胞層の上で3.5日間培養すると76%の細胞にTOの発現がみられ、生きた支持細胞層の場合と差が無かった (Table 4)。また、37°Cで乾燥させた支持細胞層も同様にTOの発現を誘導する能力を保持していた。しかし、10%エタノールや1N HCl、また4%パラホルムアルデヒドによる処理は分化誘導の活性を失わせた。さらに、cytosine arabinoside による処理や37°Cで乾燥させた支持細胞層を0.1%トリプシンで消化すると、分化誘導能は失われた。すなわち、細胞膜上に存在すると考えられる分化誘導因子は酸に不安定で、トリプシンに感受性を持つことがわかった。

4 考 察

細胞分化に伴う遺伝子発現の調節機構の解明は、今日、医学生物学の領域において重要な研究課題の一つである。さらに先天代謝異常症の研究にも分子遺伝学的手法が導入され、単に構造遺伝子の異常だけでなく、遺伝子の発現機構の異常が示唆される症例が増えてきた。特にアミノ酸代謝異常症の多くは、肝臓のみ特異的に発現しているアミノ酸代謝酵素の異常によることから、肝細胞の分化に伴う遺伝子発現機構の解明は、分子病理学的追求の基礎となる。この研究では、以前報告した遺伝子レベルでの tryptophan 2,3-dioxygenase (TO) の発現機構に引き続き¹⁴⁾、胎児及びラット初代培養肝細胞を用いて、未分化肝細胞の分化誘導に伴うTOの発現について検討した。

Table 4 Effects of various treatments of the feeder layer of adult rat hepatocytes on its activity to induce cytodifferentiation of 0-day old rat hepatocytes.

Treatment	Hepatocytes expressing TO (%)
No feeder layer (collagen coated dishes)	4.4±1.8
No treatment (intact feeder layer)	78.2±7.2
Cytosine arabinoside	76.4±6.5
Drying at 37°C	74.8±8.3
4% Paraformaldehyde	2.8±1.2
Cold ethanol	2.7±1.9
1 N HCl	1.8±0.7
0.1% trypsin after treatment with cytosine arabinoside	9.8±3.3

Feeder layers were treated as described in 2.7. Hepatocytes from 0-day rats were cultured on these feeder layers for 3.5 days in serum- and hormone-free medium with "TO inducing medium" for the last day. Expression of TO was measured as described in 2.4. Values are means±S.D. for three experiments.

TOは、ラット肝臓において、生後2週ごろより発現する late suckling cluster と呼ばれる一群の酵素に属し⁹⁾、肝細胞の最終分化のマーカーとなるが、ヒト肝臓にても、胎児期には活性が非常に低く、生後徐々に発現が増加するパターンを示した。また、胎児培養肝細胞を用いて、胎生14週から20週の胎児肝臓では、TO遺伝子の転写がスイッチオフになっていることが明らかになった。すなわち、ヒトにおいても胎児期から新生児及び乳児期にかけて、TO遺伝子の転写にスイッチが入り、TO mRNA量が増加し、同時にTO酵素蛋白量が増加していくという過程が想定される。

幼若ラットの生後のTOの発現を、培養肝細胞に免疫細胞化学を用いて検出する方法でみると、生後0日の肝細胞では非常に少ないながらTOを発現した細胞が認められ、成長とともにTOを発現した細胞の数が増加することが確かめられた。言いかえれば、ある特定の時間にすべての肝細胞のTO遺伝子に同時にスイッチが入るのではなく、成長過程で個々の細胞のTO遺伝子の転写がat randomにスイッチされ、この細胞の増加が肝臓全体としてのTO発現量を決定するのである。

興味深い現象は、二重染色によりDNA合成を行った細胞とTOを発現した細胞が完全に区別されたことである (Fig. 5)。これはTOを発現していない未分化な肝細胞は増殖することができるが、最終分化を終え

て TO を発現すると、増殖能力を失ったことを意味する。幼若ラット肝細胞は血清や成長因子を無添加の条件でも自律的に増殖するが、成熟ラット肝細胞は、insulin, epidermal growth factor (EGF), 及び hepatocyte growth factor (HGF) のような因子を増殖に必要とする²²⁻²⁵⁾。最近、著者ら²⁶⁾は出生直後のラット肝細胞が、熱にも酸にも安定で分子量が1万以下の成長因子を分泌していることを発見し、幼若肝細胞が autocrine 機構で増殖していることを報告した。この幼若肝細胞の自律的増殖能は成長に伴う肝細胞の成熟により減退していく (Fig. 3) と同時に増殖因子を分泌する量も少なくなっていく。このような明瞭な増殖と分化の相反的調節が、成長期の肝臓ではみられる。

現在、最も重要な課題は、どのような因子が肝細胞の最終分化を引きおこし、同時に自律的増殖能を調節しているかである。以前、Nakamura *et al.*²⁷⁾は、成熟ラット肝細胞を用いて、細胞密度による増殖と分化の調節が、細胞間接触を介する cell surface modulator (CSM) によって行われていることを示した。そこで、著者は *in vitro* で未分化な幼若肝細胞と成熟肝細胞を接触させることにより、分化を誘導できるかを検討した。その結果、成熟肝実質細胞を支持細胞層とした場合に特異的に分化が誘導され、幼若肝細胞が TO を発現し、またその自律的増殖能を失った。この効果は、液性因子や細胞間質を介するものではなく、直接の細胞間接触を介するものである。このことは支持細胞層を殺しても、その分化誘導能は変わらないことから裏付けられる。この細胞分化を誘導する細胞膜上の因子は、酸に不安定で、またトリプシンにより活性を失うことから、蛋白と考えられる。

以上の結果より、幼若肝細胞の分化は、成熟肝細胞の細胞膜上の因子により、細胞間接触を介して引きおこされることが明らかになった。そして、一つの分化した細胞の出現により、まわりの細胞が分化していくカスケード系の様な現象が起こっていると考えられる。なぜなら、Fig. 4 及び Fig. 7 に示した通り、TO を発現した細胞が群を作って存在しているからである。この事は肝臓の組織切片でも同じである。この細胞膜上の因子は、分化誘導だけでなく新しく分化した細胞を G₀ にとどめておく役割も果たしているのかも知れない。以前報告した CSM²⁷⁾ と、この分化誘導因子とが同じものかどうかは、今後の問題である。また、この因子が、先天代謝異常症の病因である遺伝子発現の異常と、どのような関連を持つかが明らかになれば、疾患の診断及び治療への応用も可能と思われる。この因子の物質と

しての精製と分子レベルでの作用メカニズムを明らかにすることが、これからの課題である。

5 結 論

未分化な胎児肝細胞及び幼若ラット肝細胞の分化に伴う TO 遺伝子発現機構の研究のため、胎児及びラット培養肝細胞に TO の免疫細胞化学を用い、分化誘導因子について検討した。

1. 胎児及び生後ヒト肝臓での TO の発現パターンは、ラット肝臓のそれと類似し、ヒトにおいても TO は肝臓の最終分化のマーカーとなる。また、培養胎児肝細胞を用いた実験の結果から、胎生 14 週から 20 週の肝臓では、TO 遺伝子の転写がスイッチオフになっていることが明らかになった。
2. 生後のラット肝臓における TO 発現の増加は、TO を発現した細胞の数の増加により、TO を発現した細胞数と TO 酵素蛋白量の変化は良く相関していた。
3. TO の免疫細胞化学と DNA 合成をみるオートラジオグラフィーを同時に行う二重染色により、TO を発現した細胞は増殖能を失うことが明らかになった。
4. 成熟ラット肝実質細胞の支持細胞層のみ幼若肝細胞の分化を誘導し、約 70% もの細胞が TO を発現した。また、同時に幼若肝細胞の自律的増殖能を失わせる効果を持っていた。
5. この成熟ラット肝実質細胞に存在する分化誘導因子は、細胞膜上の蛋白性の因子と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を御指導いただいた徳島大学医学部酵素研究施設酵素病理部門 市原 明教授、中村敏一助教授並びに札幌医科大学小児科学講座大柳和彦助教授に感謝の意を表します。また、御指導、御校閲いただいた札幌医科大学小児科学講座 中尾亨教授に深謝いたします。

文 献

1. Woo, S. K. C., Lidsky, A. S., Guttler, F., Chandra, T. and Robson, K. J. H.: Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* **306**, 151-155 (1983).
2. Payver, F., Wrance, O., Carlstead-Duke, J., Okret, S., Gustafsson, J. A. and Yamamoto, K. R.: Purified glucocorticoid receptors bind selectively *in vitro* to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids *in*

- vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6628-6632 (1981).
3. Sussmuth, W., Hoppner, W. and Seitz, H. J.: Permissive action of thyroid hormones in the cAMP-mediated induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in hepatocytes in culture. Eur. J. Biochem. **143**, 607-611 (1984).
 4. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J. Biol. Chem. **257**, 7847-7851 (1982).
 5. Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldman, T. A. and Greene, W. C.: Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 4230-4234 (1985).
 6. Lacy, E., Roberts, S., Evans, E. P., Burnrenshaw, M. D. and Constantini, F. D.: A foreign β -globin gene in transgenic mice: integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissue. Cell **34**, 343-358. (1983).
 7. Liu, H. T., Gibson, C. W., Hirschhorn, S. R., Baserga, R. and Mercer, W. E.: Expression of thymidine kinase and dihydrofolate reductase genes in mammalian ts mutants of the cell cycle. J. Biol. Chem. **260**, 3269-3274 (1985).
 8. Greengard, O., Federman, M., and Knox, W. E.: Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzyme differentiation. J. Biol. Chem. **52**, 261-272 (1972).
 9. Frantz, J. M. and Knox, W. E.: The effect of development and hydrocortisone on tryptophan oxygenase and tyrosine aminotransferase in the livers of young rats. Biochemistry **6**, 3464-3471 (1967).
 10. Greengard, O. and Dewey, H. K.: The prematurely evoked synthesis of liver tryptophan oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 1698-1701 (1962).
 11. Killewich, L. A. and Feigelson, P.: Developmental control of messenger RNA for hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5392-5396 (1977).
 12. Roper, M. D. and Franz, J. M.: Immunocytochemical evidence for increased titers of tryptophan pyrrolase during substrate and hormonal enzyme induction. J. Biol. Chem. **237**, 3714-3717 (1962).
 13. Nakamura, T., Aoyama, K., Tomomura, A. and Ichihara, A.: Hormonal control of gene expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in neonatal rat liver. Biochim. Biophys. Acta **678**, 91-97 (1981).
 14. Nagao, M., Nakamura, T. and Ichihara, A.: Developmental control of gene expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in neonatal rat liver. Biochim. Biophys. Acta **867**, 179-186 (1986).
 15. Granner, D. K. and Tomkins, G. M.: Tyrosine aminotransferase (rat liver) Methods Enzymol. **17 Part A**, 633-637 (1970).
 16. Nakamura, T., Nakayama, Y., Teramoto, H., Nawa, K. and Ichihara, A.: Loss of reciprocal modulation of growth and liver functions of hepatoma cells in culture by contact with cells or cell membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6398-6402 (1984).
 17. Niimi, S., Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A.: Hormonal regulation of translatable mRNA of tryptophan 2,3-dioxygenase in primary culture of adult rat hepatocytes. J. Biochem. **94**, 1697-1706 (1983).
 18. Nakamura, T., Tomita, Y. and Ichihara, A.: Density dependent growth of adult rat hepatocytes in primary culture. J. Biochem. **94**, 1029-1035 (1983).
 19. Friedman, R., Fuks, z., Odavia, H. and Vladavsky, I.: Differential structural requirements for the induction of cell attachment, proliferation and differentiation by the extracellular matrix. Exp. Cell Res. **157**, 181-194 (1985).
 20. Frazier, W. and Glassed, L.: Surface components and cell recognition. Ann. Rev. Biochem. **48**, 491-523 (1979).
 21. Bissel, M. J., Hall, H. G. and Parry, G.: How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol. **99**, 31-68 (1982).
 22. Tomita, Y., Nakamura, T. and Ichihara, A.: Control of DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity by hormones and amino acids in primary cultures of adult rat hepatocytes. Exp. Cell Res. **135**, 363-371 (1981).
 23. Nakamura, T., Teramoto, H., Tomita, Y. and Ichihara, A.: Two types of growth inhibitor in rat platelets for primary cultured hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. **122**, 1450-1455 (1984).
 24. Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A.: Partial purification and characterization of hepatocytes growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. **122**, 1450-1459 (1984).
 25. Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A.:

- Purification and characterization of hepatocytes growth factor from rat platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press, (1986).
26. 藤井 尊, 長尾雅悦, 中村敏一, 市原 明: Auto-crine機構による幼若ラット肝細胞の自己増殖能. 生化学 **57**, 984 (1985).
27. Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y. and Ichihara, A.: Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 7229-7233 (1983).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 長尾雅悦