肝細胞 Spheroid 形成と線溶系因子の動態

師 井 隆*, 根 本 一 樹*, 前 沢 閑 久*
宇 野 茂 之*, 関 泰 一 郎*, 有 賀 豊 彦*

Formation of the Hepatocyte Spheroid and Roles of Plasminogen Activator

Takashi MOROI*, Kazuki NEMOTO*, Yasuhisa MAEZAWA*,
Shigeyuki UNO*, Taiichiro SEKI* and Toyohiko ARIGA*

Key words : Hepatocyte, Spheroid, t-PA, PAI-1, Plasmin

For culturing hepatocytes, we generally use a matrix, collagen on which the cells proliferate and become confluent monolayer. Recently, a modified proteoglycan, chondroitin sulfatephosphatidylethanolamine (CS-PE), in stead of collagen, has been developed, and made possible a novel culture forming a multicellular assembling, spheroid. The spheroid is found to be highly differentiated, since it produces plasminogen and fibrinogen as well as albumin much more than the monolayer does, and it has an ability of being induced tyrosine aminotransferase by hormones. The mechanism with which hepatocytes form spheroid is unknown. Especially, it is not yet known how plasminogen activator (PA) plays in the spheroid or in the process of its formation. Our present study on the fibrinolytic factors revealed that the spheroid was in fairly hypofibrinolytic; t-PA activity in the conditioned media was one-tenth of that of monolayer (11 U/10⁶ cells versus 116 U/10⁶ cells), and the specific activity of t-PA was around one-fifth of monolayer. In addition, during the culture the mRNA for t-PA decreased in the spheroid, while it increased in monolayer. On the other hand, the mRNA for the PA inhibitor type 1 (PAI-1) was expressed higher in the spheroid. To form spheroid, addition of an anti-t-PA antibody to the media were not hampering although other protease inhibitors, including trypsin and plasmin inhibitors were of quite hampering and the cells remained monolayer. Thus, in the spheroid formation of hepatocytes, the cells would be in fibrinolytically inactive, however, they would require some proteolytic enzyme including plasmin.

* 日本大学農獣医学部栄養生理化学研究室〔〒154 東京都世田谷区下馬 3-34-1〕: Laboratory of Nutrition and Physiology, Nihon University College of Agriculture and Veterinary Medicine, Tokyo 154, Japan
受付: 1995.7.24, 受理: 1996.1.30

緒 言

初代培養肝細胞は *in vivo* における肝細胞と同様のホルモン応答能を示すことから多くの肝特異機能の解析に頻用されてきた。肝細胞の初代培養はコラゲンコート培養器等を用いた単層培養系が主流であった。近年, 小出ら^{1)~4)} は, 陽性荷電ポリスチレンやプロテオグリカンを培養基質として用い, 肝細胞の三次元的凝集塊 (multicellular spheroid; spheroid) 培養系を確立するとともに, spheroid の特徴などを明らかにしている。小出らによると肝細胞 spheroid は単層培養細胞に比べ増殖能が強く抑制されており, 毛細胆管様構造の組織化, アルブミンの産生など, 高度な分化機能を発現するという。また, spheroid は長期間培養が可能であることから, 肝特異機能の解析などに広く用いられている。

線溶系の trigger として中心的役割を担っている PA は生体内の様々な組織や体液中に存在するが, 肝臓における PA の存在や産生についてはほとんど知られていなかった。これまでに著者らは, コラゲンコート培養器を用いてラット肝細胞の無血清初代培養を行い, 肝細胞が PA を産生することを見だし, その性質や遺伝子発現を含む PA 産生調節機構を明らかにしてきた^{5)~8)}。

最近, PA は血栓溶解のみならず, 細胞外マトリックス (ECM) や基底膜における局所的プロテアーゼ活性化因子として, 癌の浸潤や転移, 血管新生をはじめとする形態形成などの生理的, 病態生理的諸現象に関与していることが明らかにされつつある。

そこで本論文では肝臓における器官形成に, 肝細胞が産生する t-PA がどのような役割を演じているかを追究するための一助として, 肝細胞 spheroid に注目し, spheroid 形成過程における線溶因子の産生と spheroid 形成に対する線溶因子の関与の有無について検討した。

試薬および方法

肝細胞 spheroid 培養

肝細胞は, 体重約 200 g のウィスター系雄ラ

ットより collagenase (type I, Sigma, USA) 灌流法により分離し, 50×g, 1 分の低速遠心を繰り返すことにより単離精製した。単離肝細胞は陽性荷電ポリスチレン培養器 (3802 Falcon, USA) にコンドロイチン硫酸 (鮫軟骨由来) の誘導体 (chondroitin sulfate-phosphatidylethanolamine; CS-PE) を固相化し⁹⁾¹⁰⁾, 0.6×10⁵ cells/cm² の割合で接種し, インスリン (10⁻⁸ M; Sigma), 上皮増殖因子 (EGF, 50 ng/ml; ヒゲタ醤油), 0.1 μM CuSO₄, 3 nM H₂SeO₃, 50 pM ZnSO₄ を含む William's E (WE; Flow Laboratories, USA) 培養液を用い, 5%CO₂/95%気下, 37°C で培養した。さらに, コントロールとしてコラゲンコート培養器 (25010, Corning, USA) を用いて単層培養を行い, spheroid 培養の成績と比較した。

Tyrosine aminotransferase (TAT) 活性および DNA の測定

TAT 活性の測定は Granner ら¹¹⁾ の方法に準じて行った。一定時間培養後の肝細胞を, ホルモンフリー WE で更に 24 時間培養して, インスリンや EGF の影響を除いた。その後, 10⁻⁵ M dexamethasone (Dex, Sigma), 10⁻⁴ M dibutyryl-cAMP (Bt₂-cAMP, Sigma) 含有 WE で 24 時間培養し TAT を誘導した。培養細胞を遠沈管に移し, 150×g で 15 分間遠心分離した。沈殿に 0.1% Triton-X 100 含有 Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加え, 15 秒間超音波破碎し, 細胞破碎液を得た。この細胞破碎液を, さらに 150×g で 15 分間遠心分離し, 得られた上清を TAT 活性測定に供した。沈殿については, 4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, ナカライテスク) を用いて DNA 量を測定した¹²⁾。

アルブミン, フィブリノゲン, プラスミノゲンおよび t-PA の測定

培地交換時に回収した培養液中のアルブミン量は, 2 種の抗アルブミン抗体を用いて, 3 ng/ml から 100 ng/ml まで定量可能なサンドウィッチ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法により測定した。すなわち, 抗ラットアルブミンウサギ抗体 (0.1 ng/well, Cappel, USA) を固相化した 96 well assay plate

(NUNC, Denmark) に培養液の希釈例 100 μ l を供した。4°C, 12 時間反応させた後、パーオキシダーゼ標識抗ラットアルブミンウサギ抗体 (2.5 ng/ml, Cappel) 50 μ l を用い *o*-phenylenediamine dihydrochloride (ナカライテスク) を基質として 492 nm の吸光度を測定した。

また、プラスミノゲン量、フィブリノゲン量は 2 ng/ml から 500 ng/ml まで定量可能な抗ラットプラスミノゲン抗体または、0.8 μ g/ml から 10 μ g/ml まで定量可能な抗ラットフィブリノゲン抗体 (いずれも当研究室で作成) を用いた ELISA によって定量した。すなわち、培養液の希釈列 100 μ l を固相化した 96 well assay plate (NUNC) に抗ラットプラスミノゲン抗体 (10 ng/ml) 50 μ l または、抗ラットフィブリノゲン抗体 (10 ng/ml) 50 μ l を供した。4°C, 12 時間反応させた後、パーオキシダーゼ標識抗ラットアルブミンウサギ抗体 (Cappel) を用い *o*-phenylenediamine dihydrochloride (ナカライテスク) を基質として 492 nm の吸光度を測定した。

さらに、t-PA の抗原量も ELISA を用いて定量した。すなわち、培養液の希釈列 100 μ l を固相化した 96 well assay plate (NUNC) に抗ヒトメラノーマ t-PA ウサギ抗体 (2.5 ng/ml, American Diagnostica, USA) 100 μ l を供した。4°C, 12 時間反応させた後、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Serotec, UK) を用い, *p*-nitrophenyl phosphate (東京化成) を基質として、遊離する *p*-nitrophenol 量を 405 nm の吸光度として測定した。本測定法は t-PA のほか t-PA/PAI-1 複合体も t-PA として測定するものと考えられる。以上、すべての測定値は、単離核数あるいは細胞 DNA 量で補正し、単位細胞当たりの産生量に換算した。

t-PA 活性の測定

培養液中の t-PA 活性は Seki ら⁹⁾ の方法に従い、¹²⁵I ラベルしたプラスミノゲン・フリー・フィブリノゲン (生化学工業)、トロンビン (持田製薬) を用いて ¹²⁵I-フィブリン平板を作成し、一定時間後に遊離する分離産物の放射活性をオート- γ -カウンター (Packard, USA) により測

定した。同時にヒトメラノーマ細胞由来の t-PA (Technoclone, Austria) を用いて、活性を測定して標準曲線を描き、試料中の t-PA 活性をメラノーマ t-PA 相当単位数に換算した。

また、標準フィブリン平板による t-PA 活性の測定は Astrup ら¹³⁾ の方法に従って行った。フィブリン平板は、プラスミノゲン・リッチ・フィブリノゲン (生化学工業)、CaCl₂、トロンビンを用い、作成した。試料溶液 30 μ l をフィブリン平板にスポットし、37°C, 18 時間インキュベート後、溶解窓の大きさを測定した。

t-PA mRNA, PAI-1 mRNA の定量

mRNA 量は Northern blot analysis により測定した。一定時間培養後の細胞を Hanks 液で洗浄した後、AGPC 法¹⁴⁾ により総 RNA を調製し、その 10 μ g を泳動し、Hybond-N nylon membrane (Amersham, UK) に転写した。プローブには Nick Translation Kit (宝酒造) を用いて [α -³²P]-dCTP (Dupont, USA) でラベルしたラット t-PA cDNA¹⁵⁾ (Dr. Gelehrter, Michigan Univ. より供与)、ラット PAI-1 cDNA¹⁶⁾ (Dr. Ny, Umea Univ. より供与) および GAPDH cDNA¹⁷⁾ (Dr. Bravo, Bristol-Myers Squibb Co. より供与) を使用した。フィルターは、常法によりプレハイブリダイズした後、ハイブリダイズし、放射活性をバイオイメージングアナライザー (富士フィルム) により計測し、発現量を求めた。

なお、mRNA 量はすべての試料について GAPDH の発現量で除することによって補正した。

プロテアーゼ阻害剤等の spheroid 培養器への添加と培養細胞の形態観察

各種のプロテアーゼ阻害剤や牛胎児血清を Watanabe らの報告¹⁸⁾ に従い、以下に示す濃度となるように培養液に添加し、培養細胞の形態を顕微鏡観察した。

Anti-t-PA antibody (Anti-t-PA, 11.6 μ g/ml; American Diagnostica), egg white trypsin inhibitor (EWTI, 10 μ M; Sigma), soy bean trypsin inhibitor (SBTI, 10 μ M; Sigma), aprotinin (40 nM; 生化学工業), ϵ -aminocaproic acid (EACA, 1 mM; 第一製

Fig. 1 Phase contrast micrographs of rat hepatocytes cultured in CS-PE-coated dishes. Bar: 100 μ m

薬), tranexamic acid (t-AMCHA, 1 mM; ナカライテスク), fetal bovine serum (FBS, 1%; ニチレイ), Dex (1 μ M).

実験結果

1) Spheroid 形成

コラゲンコート培養器に播種した肝細胞は培養 3 時間で接着, 伸展し培養開始後 48 時間で単層を形成した。これに対して, CS-PE コート培養器に播種した肝細胞の形態は, 培養面に接着したが, 培養開始後 6 時間を経過しても培養面への伸展は観察されなかった。その後, 相互に近接した細胞同士が凝集し, 培養開始後約 24 時

間で spheroid を形成した (Fig. 1)。

ここには示さないが, 単層培養系では培養開始 144 時間で接着細胞は剝離して死滅したのに対し, spheroid 培養系では 300 時間の長期培養においても spheroid 形態を保持し, 生存し続けた。

2) 肝細胞 spheroid の機能

spheroid の機能について, 単層培養細胞のそれと比較検討した。

(I) Tyrosine aminotransferase (TAT) 活性

まず, アミノ酸代謝の key enzyme であり肝特異酵素の一種でもある TAT について, Dex,

Bt₂-cAMP による誘導後、出現する TAT 活性を測定した (Fig. 2)。

TAT 非誘導群では、両培養系とも、TAT 活性は 100 U/ μ g DNA 以下と低く、両培養系の間に差異は見られなかったが、TAT 誘導群では、単層培養系と spheroid 培養系の TAT 活性に大きな差異がみられた。すなわち、単層培養系では、培養初期 24 時間値の 230 U/ μ g DNA から培養経過にともなって顕著に低下し、120

時間では 35 U/ μ g DNA と初期値の約 1/6 となった。一方、spheroid 培養系の TAT 活性は、培養初期 24 時間値の 179 U/ μ g DNA が、72 時間では 240 U/ μ g DNA、120 時間では 200 U/ μ g DNA と、実験期間中ほとんど減少しなかった。これは、単層培養細胞が培養中急速に肝特異機能を失うのに対し、spheroid は、その機能を長期間保持することを示唆している。

(II) 肝細胞 spheroid におけるアルブミン、プラスミノゲンおよびフィブリノゲンの産生

Spheroid のプラスミノゲン、フィブリノゲンおよびアルブミンの産生能について、単層培養細胞のそれと比較した。

肝臓の特異機能を反映して産出されるアルブミンおよびプラスミノゲンはいずれも、spheroid 培養系で高い値を示し、単層培養系に比しそれぞれ、約 10 倍、3 倍であった。また、肝特異タンパク質であり、急性期タンパク質でもあるフィブリノゲンの産生量も単層培養系の 6 倍であった (Fig. 3)。これらのタンパク産生能からも、spheroid がより高い分化機能をもつことが確認された。

両培養系ともに、フィブリノゲン産生量がアルブミン産生量に比べ高値であった。

(III) 肝細胞 spheroid における t-PA の産生

Spheroid による t-PA 産生について、活性と抗原量とを測定し単層培養細胞のそれらと比較

Fig. 2 Tyrosine aminotransferase activity of primary cultured rat hepatocytes under different culture conditions. ○, Monolayer; ●, Spheroid

Fig. 3 Comparison of the hepatocyte specific plasma protein production between monolayer culture and spheroid culture. The amounts of albumin, plasminogen and fibrinogen present in the conditioned medium harvested at 72 hr, were measured by ELISA. Each level is the mean of 4 cultures with S.E.

Table 1 Production of t-PA by primary culture of rat hepatocytes under the different culture conditions.

Culture time (h)	Activity (IU/10 ⁶ cells)	Antigen (ng/10 ⁶ cells)	Specific activity (IU/ng)
Monolayer, 24	1.75	56.20	0.031
48	30.88	196.49	0.157
72	73.48	463.13	0.159
96	115.82	462.68	0.250
120	30.47	169.51	0.180
Spheroid, 24	0.81	39.34	0.021
48	2.63	86.33	0.030
72	11.39	118.03	0.097
96	8.16	157.37	0.052
120	8.09	95.10	0.085

The values for the activity and antigen were obtained from triplicated measurement in a single experiment for both cultures.

Fig. 4 The gene expression for PAI-1 and t-PA, and change in PA activity during monolayer culture (A) and spheroid culture (B) of rat hepatocytes. The amounts of t-PA and PAI-1 mRNAs were determined as described in the Materials and Methods, and represented as percentages to the values for 6 hr monolayer culture, which was assumed as 100%. ○—○, t-PA mRNA; ●—●, PAI-1 mRNA; +---+, PA activity. Mean $\pm$ S.E. (n=4) was indicated.

した。

単層培養系における培養液中の t-PA の抗原量および活性は、肝細胞の分裂、増殖にともなって経時的に増大し、96 時間で最大値を示し、120 時間では急激に低下した。Spheroid 培養系では、t-PA 抗原量、活性ともに 72 時間までは単層培養系と同様の上昇 pattern を示した。しかし、いずれの時間においても両者の値は極めて低値であった。また、単層培養系と異なり 96 時間値が 120 時間で低下しなかった。両培養系の

間で、活性が高い 96 時間目の比活性を比較すると、単層培養系では約 0.25 U/ng であるのに対して、spheroid 培養系では約 0.05 U/ng であり、低い値となった。このことは、spheroid 培養系においては、t-PA の活性が何らかのインヒビターによって抑制されていることを示唆している (Table 1)。

(IV) 肝細胞 spheroid における t-PA mRNA および PAI-1 mRNA の発現

肝細胞 spheroid 培養系における培養液中の

Inhibitor	Culture time (hr)									
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
Control	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
anti-t-PA antibody	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
EWTI			H							
SBTI			H							
Aprotinin				H						
t-AMCHA				H						
EACA				H						
FBS				H						
Dex										

(S) Spheroid, ■ Monolayer, [H] Hemispheroid/Multilayer,
 □ Detached as monolayer sheets

Fig. 5 Effect of various proteolytic inhibitors and dexamethasone on the cell assembling of rat hepatocytes in primary culture.

t-PA 活性を測定し、同時に t-PA mRNA, PAI-1 mRNA の発現量を経時的に測定し、単層培養系のそれと比較した。遺伝子発現と活性との関係を検討した (Fig. 4)。

t-PA 活性は、単層培養系では 24 時間以降経時的に増大したのに対し、spheroid 培養系では、培養開始後 72 時間で初めて活性が検出された。しかし、その後の活性上昇はわずかで、Table 1 の結果と同様に、単層培養系に比し明らかに低値であった。

t-PA mRNA 発現は、培養 72 時間までは両培養系とも同程度であったが、120 時間では単層培養系では上昇したのに対し、spheroid 培養系では下降し、単層の約 1/4 となった。培養 120 時間における t-PA 活性の両培養系間の差異は、この mRNA 発現量の差に基づいているものと考えられた。

一方、PAI-1 mRNA 発現は、単層培養系では培養初期 6 hr で最も高く、以後漸減し、72 hr で、初期の 1/10 に低下し、経過中常に低いのに対し、spheroid 培養系での発現も培養初期 6 時間で最も高く、以後急減した。単層の 6 時間での発現を 100% とすると spheroid では 261% と明らかに高かった。この初期レベルは、spheroid

が形成された 24 時間で 1/5 に減少したが、その後も 120 時間を除いて単層培養系より常に高いレベルにあった。

これらの結果、t-PA の活性は、t-PA mRNA の発現量のみならず、活性抑制因子 PAI-1 の mRNA の発現によっても影響を受けることが明らかになった。

3) Spheroid 形成への線溶因子の関与

以上の結果から、spheroid 培養細胞は、プラスミノゲンの産生能では単層のそれに比し高値であったが、t-PA の活性、抗原量、mRNA 発現量のいずれもが低レベルにあり、しかも PAI-1 mRNA 発現量は高いレベルにあることなどから、低線溶状態が特徴と思われる。そこで、PA やその他のセリンプロテアーゼが肝細胞の spheroid 形態形成にどのように関与しているのかについて、各種阻害剤を用いて検討した。また、PAI-1 mRNA の発現を促進することが知られている Dex¹⁹⁾ についても、その影響を検討した。

結果は、Fig. 5 に模式図として要約して示した。阻害剤非添加のコントロールでは 24 時間で spheroid が形成された。EWTI, SBTI, aprotinin, t-AMCHA, EACA などのトリプシ

ン阻害剤やプラスミン阻害剤添加群は, spheroid や spheroid 様の三次元構造を形成することなく, 培養開始 72~96 時間まで単層状態を保ち, 一時的に重層したが, 直ちに剝離した。またトリプシンインヒビターを含む FBS 添加群も同様に spheroid を形成しなかった。Dex 添加群は, 単層を維持した。

これらに対し, t-PA の活性を抑制する抗 t-PA 抗体添加群は, コントロールと同様に spheroid を形成した。

以上のように, spheroid 形成は, プラスミン阻害剤をはじめ各種の阻害剤によって抑制されたことから, 何らかのプロテアーゼが spheroid 形成に促進的に働いていることが示唆された。一方, t-PA は, 抗 t-PA 抗体添加による t-PA 活性抑制下においても spheroid が形成されたことから, spheroid の形成には影響していないと思われる。

考 察

肝臓は, 糖質, 脂質, 蛋白質などの代謝や, 薬物, アルコールなどの解毒および排泄機能やアルブミンをはじめとするほとんどの血漿蛋白質の合成分泌機能を営み, 生体の恒常性維持に中心的役割を果している。肝細胞に関する生化学的な研究を行うために, 継代可能な cell line が用いられてきた。しかし, アルブミン非産生であったり, 尿素合成能が欠如している例が多いことが報告された²⁰⁾。そこで, より生体に近い初代培養法が開発され多くの成果を挙げた。しかし, この方法も *in vivo* の肝臓機能とは必ずしも一致せず, 初代培養肝細胞は一週間以内の短期間の培養で剝離し死滅する。近年, 肝細胞 spheroid に毛細胆管様構造の組織化, アルブミンの産生など, 高度な分化機能の発現が観察され, また長期間培養が可能であることなどが立証されている^{1)~4)}。以来, spheroid 培養系は肝機能そのものの把握や毒性検査などの目的に用いられるようになってきた。しかしながら spheroid 形成機序や形成因子に関連して, 線溶系の関与の有無を検討したものはほとんどみられない。

本研究では, 陽性荷電ポリスチレン培養器に

コンドロイチン硫酸の誘導体である chondroitin sulfate-phosphatidylethanolamine, (CS-PE) を固相化した培養器を用いて単離肝細胞を培養することにより形成される肝細胞 spheroid について, 従来の単層培養肝細胞と比較しながら, 分化機能の発現を観察するとともに, 線溶系因子について t-PA, PAI-1 等の産生ならびに形態形成への関与の有無等を検討した。

Spheroid は肝特異タンパクである TAT の被誘導能を長期間高度に維持し, また, アルブミン, プラスミノゲン, フィブリノゲンなどの産生分泌能も単層培養細胞の数倍から十数倍に達することが明らかになった。

Spheroid 培養系では, t-PA の抗原量, 活性ともに単層培養系に比較して低く, また PA の比活性が極めて低いことから, 何らかのインヒビターの存在が示唆された。このインヒビターは, mRNA の解析から, 培養初期の PAI-1 mRNA の高度 (単層の約 3 倍) の発現により産生される PAI-1 ではないかと推察される。Spheroid における t-PA mRNA の減少傾向 (単層の 1/3 倍から 1/2 倍) とあわせて考えると, spheroid の低線溶活性は, 遺伝子レベルでの制御に起因するものといえよう。Gelehrter²¹⁾ らは, 最近生体肝切除実験で, PAI-1 の発現が早期に現れ, 以後急減することを認め, PAI-1 が前初期遺伝子群に属することを報告している。この点から, spheroid に見られた培養初期の PAI-1 の高発現は, 恐らく同様の反応を反映したのと考えられる。本研究のはじめに確認された spheroid の分化機能は, このように制御された低線溶状態下で発現可能となるものとも考えられる。

近年, t-PA は肝細胞増殖因子 (HGF) の活性化に²²⁾²³⁾, プラスミンは transforming growth factor- β (TGF- β) の活性化に²⁴⁾ 関与するとの報告があり, 肝細胞の増殖や分化と関連して発現が抑制されるこれらの活性化因子は肝再生機構の中にあつて重要な役割を演じているものと考えられる。

今回の実験で, spheroid 形成という現象が exogeneous の線溶系諸因子によってどのように変化するかをみたのは, 肝再生現象を mimic

するのが目的であった。その結果は、抗 t-PA 抗体は肝細胞 spheroid の形成に全く影響しなかったが、t-AMCHA, EACA, aprotinin などのプラスミン阻害剤やトリプシン阻害剤は明らかに抑制的に作用した。したがって、spheroid は t-PA こそ低レベルにあるが、プラスミンまたはトリプシン様のプロテアーゼを産生していて、その酵素作用が cell assembling に必須の要素となっているものと推察した。著者らは最近、肝細胞培養器へ抗プラスミノゲン抗体の添加が、spheroid の形成を抑制することを確認している。u-PA の挙動はみていないが、プラスミノゲンより派生するプラスミンが、ここでいうプロテアーゼの有力な candidate の一つであろうと考えている。Spheroid の高プラスミノゲン産生能は、このこと自体 spheroid の形成や機能発現を有利にしているとも考えられる。

ごく最近、Carmeliet ら²⁵⁾ は、t-PA, u-PA ノックアウトマウスの作成に成功し、これらのマウスには多数のフィブリン沈着がみられたものの、繁殖能を有し、発生個体にも組織学的な異常を認めなかったことから、繁殖や胚形成には、t-PA, u-PA 以外の何らかのプロテアーゼが必須であろうと指摘している。著者らの今回の成績、すなわち肝細胞 spheroid が t-PA の発現は抑制されているのに高いフィブリンノゲンおよびプラスミノゲン産生能を有し、また阻害剤を用いた間接的ながらプロテアーゼの関与を示唆する成績は、肝臓に限定してはいるものの、Carmeliet らの成績と近似していて興味深い。

結 語

肝細胞の培養に際して、従来の単層培養とは異なり多細胞集合体を形成する spheroid 培養を行った。Spheroid は長期間生存するとともに、TAT の被誘導能、アルブミン、プラスミノゲン、フィブリンノゲンの高産生能など高度に分化した機能を発現していた。しかし、t-PA は、その活性、抗原量および遺伝子発現など明らかに低値であった。PAI-1 mRNA 発現の高値と合わせ、低線溶が示唆された。一方、spheroid の形成にはプラスミンを含むプロテアーゼの関与が必要であることが、阻害剤の添加実験によっ

て示唆された。

謝 辞: この研究の遂行にあたり、培養マトリックスをご提供くださいました愛知医科大学分子医科学研究所、木全弘治教授、杉浦信夫博士に深謝いたします。

本研究は日本大学学術助成金（奨励研究）によった。

文 献

- 1) Koide N, Sinji T, Tanabe T, Asano K, Kawaguchi M, Sakaguchi K, Koide Y, Mori M, Tsuji S: Continued high albumin production by multicellular spheroid of adult rat hepatocytes in the presence of liver-derived proteoglycans. *BBRC* **161**: 385-391, 1989.
- 2) Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Sinji T, Mori M, 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.
- 3) 小出典男, 辻 孝夫: 肝細胞 spheroid 形成. 胆肝脾 **20**(4): 589-591, 1990.
- 4) 小出典男, 辻 孝夫: 肝細胞機能の発現と組織構築. 実験医学 **9**(7): 178-183, 1991.
- 5) 有賀豊彦, 関泰一郎: 線溶系の新展開-細胞機能に關与する線溶系因子の役割 (松尾理 編). 学際企画 (東京): 95-117, 1992.
- 6) Seki T, Watanabe K, Saito K, Ariga T: Purification and characterization of hepatic plasminogen activator (h-PA) in conditioned medium of rat hepatocytes in primary culture. *Biosci Biochem Biochem* **57**: 1369-1371, 1993.
- 7) 関泰一郎, 深澤洋子, 有賀豊彦, 松尾 理: 肝線溶活性調節機構の解析-初代培養肝細胞における t-PA 遺伝子発現調節機構の解析-. 日本血栓止血学会誌 **5**: 49-53, 1994.
- 8) Seki T, Ariga T, Saitoh K, Sugawara T, Oshiba S: Hormonal regulation of plasminogen activator produced by rat hepatocytes in primary culture. *Thromb Res* **58**: 543-554, 1990.
- 9) Sugiura N, Sakurai K, Hori Y, Karasawa K, Suzuki S, Kimata K: Preparation of lipid-

- derivatized glycosaminoglycans to probe a regulatory function of the carbohydrate moieties of proteoglycans in cell-matrix interaction. *J Biol Chem* **268**: 15779-15757, 1993.
- 10) 矢田俊量, 木全弘治, 小倉 卓, 小出典男, 辻 孝夫: プロテオグリカンと三次元培養. *組織培養* **19**: 312-316, 1993.
- 11) Granner D, Tomkins GM: Tyrosine aminotransferase (rat liver), *Methods in Enzymol* **17**: 663-637, 1970.
- 12) Brunk CF, Jones KC, James TW: Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem* **92**: 497-500, 1979.
- 13) Astup T, Mullertz S: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem* **40**: 346-351, 1952.
- 14) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159, 1987.
- 15) Ny T, Leonardsson G, Hsueh AJW: Cloning and characterization of a cDNA for rat tissue-type plasminogen activator. *DNA* **7**: 671-677, 1988.
- 16) Zeheb, R, Gelehrter TD: Cloning and sequencing of cDNA for the rat PAI-1. *Gene* **73**: 459-468, 1988.
- 17) Fort P, Piechaczyk M, Sabrouy S, Dani C, Jeanteur P, Blanchard JM: Various rat adult tissues express only one major mRNA species form the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res* **13**: 1431-1442, 1985.
- 18) Watanabe K, Hasegawa K, Koga M: Role of plasmin inhibitors in growth of adult rat hepatocytes in serum-free primary culture. *Biomed Res* **8**, 377-386, 1987.
- 19) Heaton JH, Nobes VL, O'Dell LG, Morris SM Jr, Gelehrter TD: Glucocorticoid and cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Endocrinol* **3**: 185-192, 1989.
- 20) 中村敏一, 市原 明: 肝機能を有する株細胞. 蛋白質・核酸・酵素 **23**: 1272-1282, 1978.
- 21) Thornton AJ, Bruzdinski CJ, Raper SE, Gelehrter TD: Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. *Cancer Reserch* **54**: 1337-1343, 1994.
- 22) Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* **11**: 4825-4833, 1992.
- 23) Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK: Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* **143**: 949-958, 1993.
- 24) Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB: Characterization of the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial cells and pericytes of smooth muscle cells: a self regulating system. *J Cell Biol* **111**: 757-763, 1990.
- 25) Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, R De Vos van den Oeord JJ, Collen D, Mulligan RC: Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**: 419-424, 1994.