

カロリー病モデルPCKラットからの肝内胆管上皮細胞の単離,培養ならびにその生物学的特性の検討 細胞増殖活性及び細胞増殖関連遺伝子発現を中心に

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 木澤, 和夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4534">http://hdl.handle.net/2297/4534</a>

## カロリー病モデルPCKラットからの肝内胆管上皮細胞の 単離, 培養ならびにその生物学的特性の検討

—細胞増殖活性および細胞増殖関連遺伝子発現を中心に—

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻形態機能病理学  
(旧講座名: 病理学第二)  
(主任: 中沼安二教授)

木 澤 和 夫

カロリー病は肝内胆管の多発性, 分節状の嚢状拡張を特徴とする体染色体性劣性遺伝性疾患である。本疾患の新たなモデル動物として多発性嚢胞腎 (polycystic kidney, PCK) ラットが見出された。本研究では, PCKラット肝内胆管上皮細胞を単離して継代培養を行い, 本細胞の生物学的特性を検討した。PCKラットの肝臓を経門脈的にコラーゲナーゼで灌流し, 肝実質除去後に得られた胆管樹から肝内大型胆管を分離し, これをI型コラーゲンゲル上に移植, 培養した。この肝内胆管組織片からコラーゲンゲル上をシート状に増殖する胆管上皮細胞が認められ, 本細胞をコラーゲンゲルごと採取して継代培養し, 間質細胞の混入のない肝内胆管上皮細胞を単離した。PCKラット培養肝内胆管上皮細胞は, コラーゲンゲル上で単層の細胞層を形成し, その遊離縁には酸性糖蛋白の発現がみられ, さらに胆管上皮細胞の特異的なマーカーであるサイトケラチン7およびγ-グルタミルトランスぺプチダーゼの発現がみられ, 胆管上皮細胞としての形質を保持していた。なお, 対照として用いたSprague-Dawley系ラット (Crj:CD) の肝臓から肝内胆管上皮細胞を同様に単離, 培養した。コラーゲンゲル上におけるPCKラット培養肝内胆管上皮細胞の倍加時間は23時間であり, Crj:CDラットの77時間に比べて短く, PCKラットでは肝内胆管上皮細胞の増殖活性が亢進していた。DNAマイクロアレイを用いてPCKラット培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子の発現をCrj:CDラットと比較した結果, 上皮成長因子 (epidermal growth factor) に関連する細胞増殖シグナルを伝達するMEK5 (mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated protein kinase kinase 5) のmRNAならびに細胞増殖を抑制する形質変換成長因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta$ 3およびTGF- $\beta$  I型受容体のmRNAの発現亢進がみられた。以上の結果から, PCKラットでは, 遺伝子レベルでの細胞増殖制御の不調に基づく肝内胆管上皮細胞の異常増殖が肝内胆管拡張の発生に関与していると考えられた。

**Key words** PCK rat, biliary epithelial cells, culture, DNA microarray, signal transduction

ヒトの胆管系, 特に細胆管を含む肝内胆管系は, 胆管板 (ductal plate) と呼ばれるスリット状の内腔を有する二層性の上皮性原基より発生すると考えられている<sup>1)2)</sup>。肝線維嚢胞症 (fibrocystic disease of the liver) は胆管上皮細胞および支持結合組織の過剰増殖を特徴とする疾患で, 胆管板 (ductal plate) の分化やモデリングの異常により生ずると考えられており<sup>3)~7)</sup>、胆管奇型 (ductal plate malformation) とも呼ばれている<sup>7)</sup>。この肝線維嚢胞症に属する代表的な疾患として, 肝内胆管の多発性, 分節状の嚢状拡張を特徴とするカロリー病, ならびに門脈域結合組織の過剰増殖を特徴とする先天性肝線維症 (congenital hepatic fibrosis, CHF) があり<sup>8)</sup>、これらは常染色体性劣性遺伝形式を示す。また, カロリ病あるいはCHFでは高率に腎臓に常染色体劣性遺伝型多発性嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease) をみる。

さて, ヒト疾患の病因を解明するにあたり, 適切なモデル動

物を用いた実験から得られる情報は有用である。肝線維嚢胞症を発現する動物としてC57BL/6J-*cpk*/+マウスなど, いくつかの報告があるが<sup>9)~13)</sup>、これらは多発性嚢胞腎の研究に利用され, 肝病変の程度および発現頻度が低いため, 肝線維嚢胞症モデル動物としては用いられていない。このように, 現在, カロリ病やCHFといった肝線維嚢胞症を恒常的に発現する適切なモデル動物がないため, これら肝胆管病変の成立機序について未だ不明な点が多く残されている。

最近, 日本チャールス・リバーが生産するSprague-Dawley系ラット (Crj:CDラット) のコロニーから多発性嚢胞腎および肝内胆管の多発性拡張を示す突然変異動物 (常染色体性劣性遺伝を示す) が見出され, Katsuyamaら<sup>14)</sup>により多発性嚢胞腎 (polycystic kidney, PCK) ラットと称して報告された。Sanzenら<sup>15)</sup>はPCKラットの肝臓を病理組織学的に検索し, 本ラットにおける肝内胆管の拡張は多発性, 分節状の嚢状拡張で, ヒト

平成14年1月15日受付, 平成14年3月5日受理

Abbreviations: BECs, biliary epithelial cells; Cdk, cyclin-dependent protein kinase; CHF, congenital hepatic fibrosis; CK7, Cytokeratin 7; EGF, epidermal growth factor; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; GGT,

でのCHFを伴うカロリー病に類似した病態であることを明らかにし、さらに本病態の発生と進行には肝内胆管上皮細胞の増殖とアポトーシスの不調和が関与していることを報告した。

本研究では、この新たに見出されたカロリー病モデルPCKラットにおける肝内胆管拡張の発生機序を試験管内で明らかにするため、PCKラットの肝臓から肝内胆管上皮細胞を単離し、継代培養可能な細胞株を樹立することを試みた。次に、得られたPCKラット培養肝内胆管上皮細胞の増殖活性を対照であるCrj:CDラットと比較し、さらにDNAマイクロアレイを用いてPCKラット培養肝内胆管上皮細胞における細胞増殖に関連する遺伝子の発現量をCrj:CDラットと比較し、PCKラット肝内胆管上皮細胞の病的特性を明らかにしようとして試みた。

### 材料および方法

#### I. PCKラット肝内胆管上皮細胞株の樹立

1. PCKラット胆管樹の作製および肝内大型胆管の分離、ならびに肝内胆管上皮細胞の初代培養

金沢大学医学部附属動物実験施設内で自家繁殖させた8週齢雄性PCKラットの肝臓から胆管樹をKatayanagiら<sup>10)</sup>の方法に準じて作製し、そこから肝内大型胆管を分離、培養した。すなわち、PCKラットをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、門脈に23ゲージ留置針を穿刺した後、前大静脈を絹糸で結紮、後大静脈を切断して流路を作製した。定流送液ポンプを用いて37℃に加温したHBSS(-) (Hank's balanced salt solution without Ca and Mg) で灌流して肝臓内の血液を除去し、さらに37℃に加温した0.04% コラゲナーゼS-1 (新田ゼラチン, 大阪) および0.22% ディスパーゼ (Life Technologies, Grand Island, USA) を含むDMEM/F-12培地 (Life Technologies) で約20分間灌流した。次に、肝臓を摘出し、4℃に冷却したHBSS(-)内で肝実質を可及的除去して胆管樹を作製した。得られた胆管樹を4℃に冷却したHBSS(-)内に移し、そこから眼科用ハサミを用いて肝内大型胆管を切り出して、この組織片をNu-Serum V Culture Supplement (10%, Becton Dickinson, Bedford, USA), フォルスコリン (2.055 μg/ml, 和光, 大阪), マウスEGF (20ng/ml, Upstate Biotechnology, New York, USA), ウシ下垂体抽出物 (12.5mg/ml, Life Technologies), 甲状腺ホルモンT3 (5mmol/l, Sigma, St.Louis, USA), ITS+Premix (10 μl/ml, Becton Dickinson), デキサメサゾン (1mmol/l, Sigma), グルコース (5mg/ml, Sigma), 炭酸水素ナトリウム (2.175mg/ml, Sigma) および100×抗菌液 (10 μl/ml, Life Technologies) を添加したDMEM/F-12培地 (以下、標準培地) 中にて、37℃, 5%炭酸ガスの条件下で培養した。48時間後に組織片をI型コラーゲンゲル (Cellmatrix Type I-A, 新田ゼラチン) 上に移植し、標準培地を重層して同様の条件下で培養した。標準培地の交換は週2回実施した。

なお、対照として8週齢雄性Crj:CDラット (日本チャールス・リバー, 相模原, 以下、対照ラット) を用い、同様の方法により肝内大型胆管を分離し、培養に供した。

2. PCKラット肝内大型胆管からの胆管上皮細胞の単離およびコラーゲンゲル上培養法による継代培養

肝内大型胆管の組織片から以下の方法により胆管上皮細胞を

単離し、コラーゲンゲル上培養法により継代培養した。すなわち、移植した組織片辺縁からコラーゲンゲル上をシート状に増殖する上皮様細胞の増殖先端部を位相差倒立顕微鏡下で外科用メスを用いて約1mm<sup>2</sup>大にコラーゲンゲルごと切り出した。これを眼科用ピンセットで新しいコラーゲンゲル上に再移植し、標準培地を重層して37℃, 5%炭酸ガスの条件下で培養した。標準培地の交換は週2回実施した。なお、対照ラットから採取した肝内大型胆管からも同様の方法で胆管上皮細胞を単離、培養した。

3. PCKラット肝内胆管上皮細胞のコラーゲンコート培養法による継代培養

コラーゲンゲル上培養法にて4回継代培養した胆管上皮細胞をコラーゲンゲルごと遠沈管に移し、37℃に加温した0.04% コラゲナーゼS-1および0.22% ディスパーゼを含むDMEM/F-12培地 (以下、ゲル消化用培地) を混合して37℃で約30分間反応させてコラーゲンゲルを消化した。ピペティングで細胞を分散させ、遠心 (1000rpm, 5分間) して上清を除去した後、HBSS(-)を加えて細胞を洗浄した。同様の条件で遠心して上清を除去した後、細胞を標準培地に浮遊させてI型コラーゲンでコートした培養用プラスチックボトルに播種し、37℃, 5%炭酸ガスの条件下にて培養した。標準培地の交換は週2回実施した。細胞がコンフルエントになった段階でトリプシン-EDTA (Sigma) を用いて細胞を剥離させて継代した。継代を4回繰り返した後、上述の如く細胞を剥離し、細胞凍結保存液 (セルバンカー, 十慈フィールド, 東京) に浮遊させて液体窒素中で凍結保存した。

なお、対照ラット肝内胆管上皮細胞を同様の方法で継代培養し、凍結保存した。

#### II. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の形態学的ならびに細胞化学的特徴の検討

コラーゲンゲル上で培養したPCKラットおよび対照ラットの培養肝内胆管上皮細胞の形態および細胞化学的性状を以下の方法により比較検討した。すなわち、解凍後にコラーゲンコート培養法で4回継代培養した細胞をコラーゲンゲルを入れた12穴マイクロプレートに播種し (2×10<sup>5</sup>個/ウェル), 標準培地で37℃, 5%炭酸ガスの条件下にて3日間培養した。培養終了後、ウェル内に10%中性緩衝ホルマリン液 (和光) を入れて細胞をコラーゲンゲルごと固定した。約2時間の固定処理後に細胞の付着したコラーゲンゲルをウェルから剥離させ、外科用メスを用いて約3mm幅の短冊状に切り出して、さらに10%中性緩衝ホルマリン液中で一晩固定した。型の如くパラフィン包埋を行い、標本作製した後、HE染色およびアルシアン青 (pH2.5) 染色を行って観察した。

#### III. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の免疫細胞化学的検討

PCKラットおよび対照ラットの培養肝内胆管上皮細胞を用いて、以下に示す免疫細胞化学的検討を行った。一次抗体として、抗サイトケラチン7 (CK7) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark), 抗γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ-glutamyl transpeptidase, GGT) 抗体 (コスモ・バイオ, 東京) および抗ビメンチン抗体 (DAKO) を用いた (表1)。

Table 1. Antibodies used in this study

Antibodies used	Clone	Source	Type of antibodies	Optimal dilution
Primary antibodies against				
Cytokeratin 7	OV-TL 12/30	DAKO	Monoclonal	1: 100
$\gamma$ -glutamyl transpeptidase	5B9	Cosmo-Bio	Monoclonal	1: 50
Vimentin	V9	DAKO	Monoclonal	1: 50
Secondary antibody against				
Mouse IgG		Serotec	Polyclonal	Neat

解凍後にコラーゲンコート培養法で4回継代培養した細胞を、コラーゲンコート処理カバーガラス(住友ベークライト, 東京)を入れた12穴マイクロプレートに播種し(5×10<sup>4</sup>個/ウェル), 標準培地で37℃, 5%炭酸ガスの条件下にて2日間培養した。カバーガラスに付着した細胞を冷PBSで洗浄した後, 冷アセトン(和光)で10分間固定した。次に, 細胞をPBSで洗浄してブロッキング試薬(DAKO)を室温で20分間反応させた後, PBSで適宜希釈した一次抗体を室温で2時間反応させた。細胞をPBSで洗浄し, フルオレセイン・イソチオシアン酸(fluorescein isothiocyanate)標識した抗マウス免疫グロブリン抗体(Serotec, Raleigh, USA)を室温で1時間反応させた後, 対比染色のためにヨウ化プロピジウムを含む封入剤(VECTASHIELD®, Vector Laboratories, Burlingame, USA)で組織スライド用カバーガラス上に封入し, 共焦点レーザー顕微鏡(LSM410, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)で観察した。

#### IV. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の増殖活性の検討

コラーゲン上培養したPCKラットおよび対照ラットの培養肝内胆管上皮細胞を用いて各々の細胞における倍加時間を検討し, 細胞増殖活性を比較した。すなわち, 解凍後にコラーゲンコート培養法で4回継代培養した細胞をコラーゲンゲルに入った35mm径ディッシュ内に播種し(4×10<sup>5</sup>個/ディッシュ), 標準培地で37℃, 5%炭酸ガスの条件下にて培養した。培養開始24, 48, 72, 96および144時間後に細胞をコラーゲンゲルごと遠沈管に回収してゲル消化用培地でコラーゲンゲルを消化した後, 遠心(1000rpm, 5分間)して上清を捨てた。これに1mlの0.05%クリスタルバイオレット/0.1Mクエン酸水溶液を加えた後, ミキサーで約90秒間攪拌して細胞を破壊した。クリスタルバイオレットで染色された細胞核をトーマの血球計算盤で計数し, その値を細胞数とした。各点につき3枚のディッシュの細胞数を計数し, その平均値を算出した。平均細胞数を片対数グラフにプロットして得られた増殖曲線から次の式を用いて倍加時間を算出した。

$$\text{倍加時間} = (t - t_0) \log 2 / \log N - \log N_0$$

( $t$ , 一定時間経過した任意な時間;  $t_0$ , 細胞数を計数した最初の時間;  $N$ ,  $t$ 時に計数した細胞数;  $N_0$ ,  $t_0$ 時に計数した細胞数)

また, 培養開始24時間後の平均細胞数から各々の細胞における付着率を算出した。

#### V. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子発現: DNAマイクロアレイを用いた対照ラット培養肝内胆管上皮細胞との比較

PCKラットおよび対照ラットの培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子の発現量をDNAマイクロアレイを用いて比較した。本検討は市販のアレイキット(Atlas™ Glass Rat 1.0 Microarray, クロンテックカンパニー, 東京)を用いて行い, 本キットに搭載されている1081個の既知遺伝子について解析を実施した。なお, DNAマイクロアレイに用いる蛍光標識したcDNAサンプル(以下, 標識サンプル)を作製するため, 市販の標識キット(Atlas™ Glass Fluorescent Labeling Kit, クロンテックカンパニー)および精製キット(Atlas™ NucleoSpin Extraction Kit, クロンテックカンパニー)も同時に使用した。

##### 1. 全RNAの抽出

PCKラットおよび対照ラットの培養肝内胆管上皮細胞からグアニジニウムチオシアネートフェノールクロロホルム法<sup>17)</sup>にてRNAの抽出を行った。すなわち, 培養用プラスチックボトル内でコラーゲンコート培養法にてコンフルエント状態まで培養した細胞を前述の如く剥離させ, 遠心(1500rpm, 5分間)後に上清を捨て, 回収した。得られた細胞に4℃のRNA抽出試薬(Isogen, ニッポンジーン, 富山)0.8mlを加えてホモジナイズした後, 400 $\mu$ lのクロロホルム(和光)を加えて氷上に5分間静置した。これを冷却遠心(4℃, 12000g, 15分間)して水相を採取し, 等量のイソプロパノール(和光)を加えて核酸を沈殿させ, 全RNAを得た。これを0.1%ジエチルピロカボネイト(和光)でRNaseを失活させた滅菌蒸留水に溶解後, 残存するDNAを完全に除去するため, DNase I(宝酒造, 大阪)で37℃, 30分間処理した。再度, イソプロパノールで沈殿させた後, 滅菌蒸留水に溶解し, 吸光度計で濃度を測定して10 $\mu$ g/ $\mu$ lに調整した。

##### 2. cDNAの合成

RNA試料19 $\mu$ lにアレイキット付属のcDNA合成プライマー5 $\mu$ lおよび標識キット付属のcDNA合成コントロール液1 $\mu$ lを加え, DNAサーマルサイクラー(MJ research, South San Francisco, USA)で70℃にて5分間加熱した後に48℃まで冷却した。これに, 標識キット付属の5×cDNA合成反応液10 $\mu$ l, 10×dNTP 5 $\mu$ l, 脱イオン化水7.5 $\mu$ lおよびMoloney-murine白血病ウイルス(Moloney-murine leukemia virus)逆転写酵素液(200単位/ $\mu$ l)2.5 $\mu$ lの混合液を加えた後, 48℃で30分間およ

び70℃で5分間インキュベーションしてcDNAを合成した。これに標識キット付属のRNase (10単位/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ lを加えて37℃で15分間反応させてRNAを除去した。さらに標識キット付属の樹脂5  $\mu$ lを加えてミキサーで攪拌し、スピンフィルター濾過により蛋白質を除去した後、標識キット付属の3M酢酸ナトリウム溶液5.5  $\mu$ lを加えてミキサーで攪拌した。これに氷冷した100%エタノール (和光) 137.5  $\mu$ lを加えてミキサーで攪拌した後、-20℃で1時間冷却してcDNAを沈殿させた。遠心して上清を除去した後、cDNAに80%エタノールを重層して-20℃にて一晩保存した。

3. 標識サンプルの作製

遠心して上清を除去した後得られた沈渣に、標識キット付属の2×蛍光ラベリング緩衝液10  $\mu$ lおよびカップリング反応コントロールオリゴ溶液0.5  $\mu$ lを加えた。これに、標識キット付属のジメチルスルフォキドで溶解した蛍光色素Cy3 (Cy3 Mono-Reactive Dye Pack, アマシャムバイオサイエンス, 東京) の5mM溶液10  $\mu$ lを加えて遮光下、室温で30分間反応させた。反応後に3M酢酸ナトリウム溶液2  $\mu$ lおよび100%エタノール

50  $\mu$ lを加えてミキサーで攪拌し、-20℃で2時間冷却して標識サンプルを沈殿させた。遠心して上清を除去した後得られた沈渣を80%エタノールで洗浄し、さらに遠心して上清を除去した。得られた沈渣を脱イオン化水100  $\mu$ lに溶解して標識サンプル液を調製した。これに精製キット付属の緩衝液を400  $\mu$ l加え、精製キット付属のカラム上に添加して遠心した。遠心によってカラム内に保持された標識サンプルを精製キット付属の緩衝液で2回洗浄した後、精製キット付属の緩衝液50  $\mu$ lで溶出させた。なお、この操作を2回実施することで約80  $\mu$ lの精製された標識サンプル液が得られた。

4. ハイブリダイゼーション

50℃に加温したアレイキット付属のハイブリダイゼーション液1.27mlに80  $\mu$ lの標識サンプル液を加えてピペティングした後、50℃で5分間インキュベーションした。これをアレイスライドの収納されたハイブリダイゼーションチャンバーに添加し、50℃で一晩反応させた。反応後にアレイスライドを取り出してアレイキット付属の洗浄液22mlで10分間、同洗浄液2mlと1×SSC 20mlの混合液で10分間を2回および0.1×SSC 22mlで10分間洗浄し、さらに滅菌蒸留水で表面をすすいだ後に乾燥させた。

5. 遺伝子発現の検出および発現量の解析

ハイブリダイゼーション後のアレイスライドをマイクロアレイスキャナー (GenePix 4000B, インターメディカル, 名古屋) に装填して蛍光シグナルを検出、画像化し、マイクロアレイスキャナー付属の解析ソフトウェア (GenePix Pro 3.0.6, インターメディカル) で蛍光シグナルの数量化を行った。得られた蛍光シグナルの値から各遺伝子におけるPCKラット/対照ラット比を算出し、その値が2以上を示した場合はPCKラットにおいて有意に発現が亢進しているmRNA、0.5以下を示した場合はPCKラットにおいて有意に発現が減弱しているmRNAとした。さらにアレイスライド画像での蛍光シグナルを肉眼的に観察して遺伝子発現の強弱を確認した。

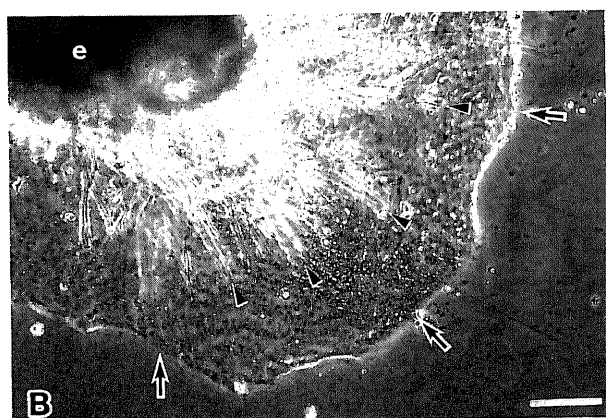
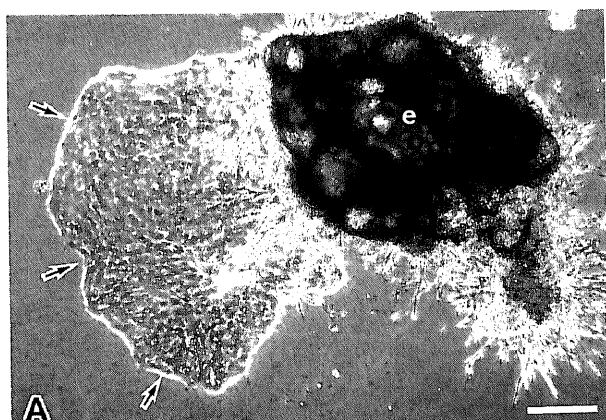


Fig. 1. Primary culture of biliary epithelial cells (BECs) of the intrahepatic large bile duct derived from a PCK rat at 2 days. (A) BECs (arrows) are spreading from the explant (e) with epithelial cell sheet appearance on collagen gel. (Phase contrast microscope, bar = 250  $\mu$ m). (B) BECs form epithelial cell sheet (arrows), though the stromal cells (arrowheads) are proliferating radially from the explant (e). The spreading speed of the BECs is faster and wider than that of the stromal cells. Thus, the isolation of epithelial cell sheet is available for subculturing. (Phase contrast microscope, bar = 125  $\mu$ m).

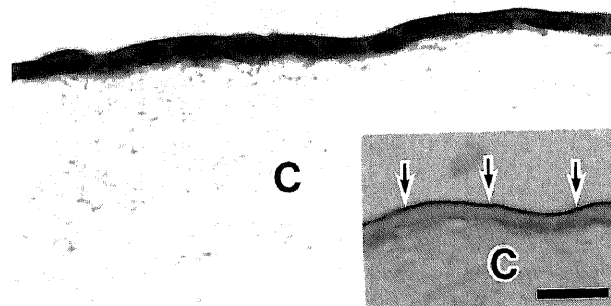


Fig. 2. Biliary epithelial cells (BECs) derived from a PCK rat cultured on collagen gel for 3 days. The cultured epithelial layer is monolayer and the BECs are low columnar. The oval or flattened nuclei in the BECs are mainly situated at basal side on the collagen gel (C). (HE stain). Insert: The apical surface of the cultured epithelial layer is positive for acid glycoprotein. (arrows, Alcian blue pH2.5 stain). Bar = 20  $\mu$ m.

## 成 績

## I. PCKラット肝内胆管上皮細胞の単離およびコラーゲンゲル上培養

PCKラットの肝臓をコラーゲナーゼ処理して作製した胆管樹から肝内大型胆管を切り出してコラーゲンゲル上に移植し、培養したところ、肝内胆管組織片の辺縁から胆管上皮細胞と考えられる上皮様細胞がコラーゲンゲル上をシート状に敷石状を呈して増殖するのが観察された(図1A)。移植した肝内胆管組織片

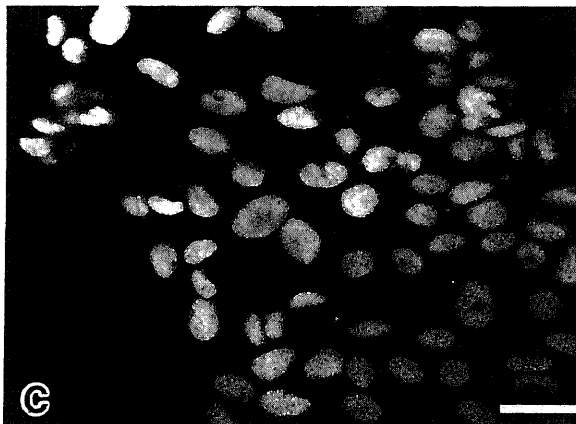
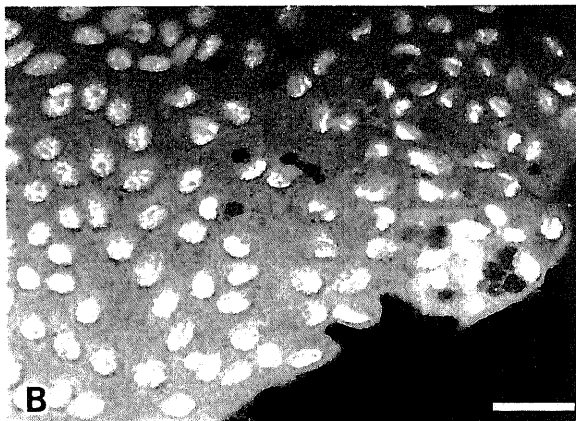
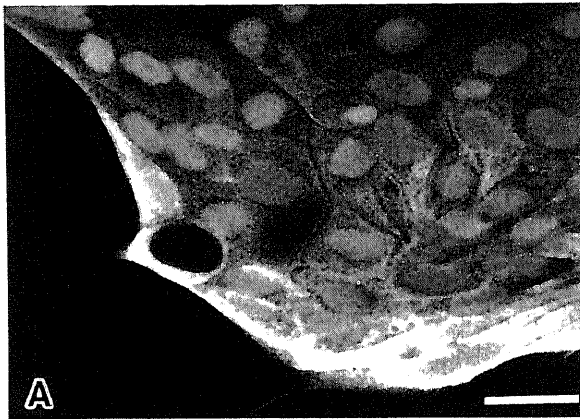


Fig. 3. Confocal immunocytochemistry of cultured biliary epithelial cells (BECs) derived from a PCK rat. BECs react with antibodies against cytokeratin 7 (A) and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (B), but no staining is detected for vimentin (C). Bar = 10  $\mu$ m.

の近傍では上皮様細胞以外に線維芽細胞や血管内皮細胞などの間質細胞と考えられる紡錘形細胞が放射状に増殖していたが、上皮様細胞のコラーゲンゲル上での伸展は紡錘形細胞より早く、上皮様細胞から成るシートの辺縁部(増殖先端部)では紡錘形細胞は観察されなかった(図1B)。従って、シート辺縁部の上皮様細胞をコラーゲンゲルごと採取して新しいコラーゲンゲル上に移植、培養する継代方法によって、間質細胞の混入のない肝内胆管上皮細胞を単離することができた。

## II. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の形態学的、細胞化学的および免疫細胞化学的特徴

組織学的に、コラーゲンゲル上で培養したPCKラット培養肝内胆管上皮細胞は、低円柱状あるいは扁平状を呈し、胞体の中央あるいはコラーゲンゲル側(基底側)に位置する楕円形から扁平な核を有しており、コラーゲンゲル上を単層に配列していた(図2)。細胞の重層化またはコラーゲンゲル内への増殖はみられなかった。アルシアン青(pH2.5)染色では、肝内胆管上皮細胞の遊離縁が弱陽性を示し、酸性糖蛋白の存在が示唆された(図2, 挿入図)。免疫細胞化学的には、CK7およびGGTが胞体内でびまん性に陽性であったが、ビメンチンは陰性であった(図3)。

なお、対照ラット培養肝内胆管上皮細胞も同様の特徴を示した。

## III. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の増殖活性

PCKラットおよび対照ラット培養肝内胆管上皮細胞の増殖活性をコラーゲンゲル上培養下で比較したところ、対照ラット培

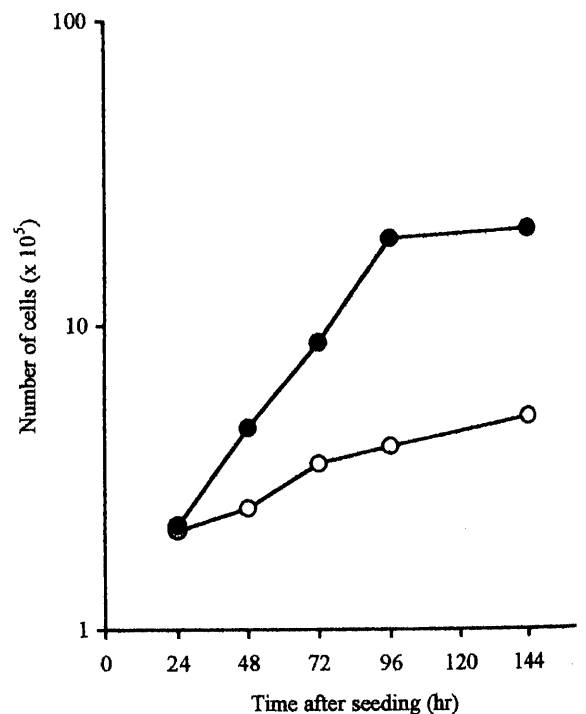


Fig. 4. Growth curves of biliary epithelial cells (BECs) derived from a control rat (O) and from a PCK rat (●). BECs were plated on collagen gels at  $4 \times 10^5$  cells/35 mm dish. Cells were harvested at 24, 48, 72, 96, and 144 hrs and counted using a hemacytometer. Results shown represent the average of three dishes for each time point, and the growth rate of cultured BECs derived from a PCK rat is higher than that from a control rat.

養肝内胆管上皮細胞の増殖は緩徐で、培養開始144時間後まで傾きの小さな増殖曲線を呈した(図4)。培養開始96時間後の平均細胞数から算出した倍加時間は77時間であった(表2)。一方、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の増殖は対照ラットより旺盛で、培養開始24時間後から96時間後まで傾きの大きな増殖曲線を呈した(図4)。培養開始96時間後の平均細胞数から算出した倍加時間は23時間で、対照ラット培養肝内胆管上皮細胞の倍加時間の約1/3であった(表2)。なお、各々の細胞における培養24時間後の付着率は、PCKラットでは53%、対照ラットでは52%とほぼ同様の値を示した(表2)。

IV. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子の発現

PCKラットおよび対照ラットの培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより比較した(図5)。そ

Table 2. Comparison of the doubling time and the plating efficiency between biliary epithelial cells (BECs) derived from a control rat and from a PCK rat

Origin	Doubling time (hr)	Plating efficiency (%)
Control rat	77	52
PCK rat	23	53

Doubling time was calculated from growth curve of BECs. Plating efficiency was calculated from the number of cells at 24 hrs after seeding.

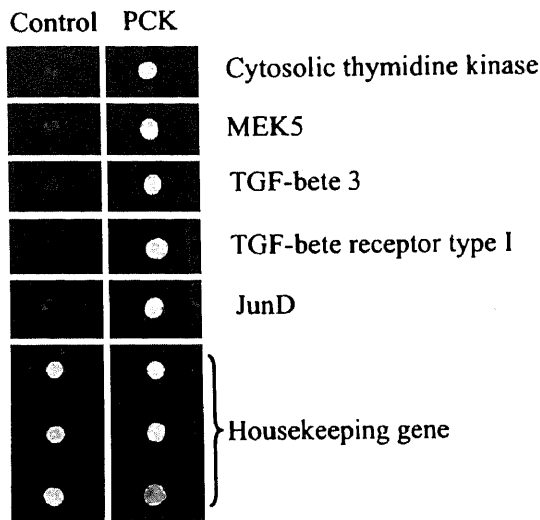


Fig. 6. Comparison of spot size of the genes including cytosolic thymidine kinase, mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated protein kinase kinase (MEK) 5, transforming growth factor (TGF)- $\beta$  3, TGF- $\beta$  receptor type I, and junD on DNA microarray analysis between biliary epithelial cells derived from a control rat and from a PCK rat.

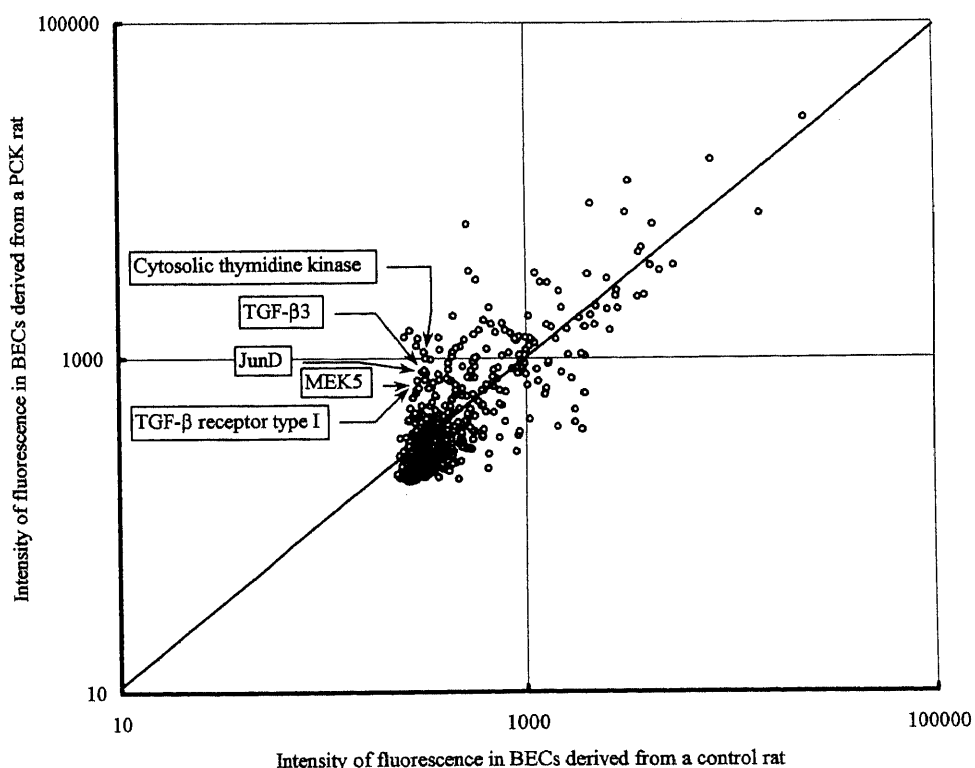


Fig. 5. Scatter plot on DNA microarray analysis between biliary epithelial cells (BECs) derived from a control rat and from a PCK rat. Solid line indicates  $y = x$ , where  $x$  is intensity of fluorescence in BECs derived from a control rat and  $y$  is that from a PCK rat.

Table 3. The genes differentially over- or under-expressed in biliary epithelial cells derived from a PCK rat using DNA microarray analysis

Gene name	Classification	GenBank accession No.	Ratio of normal rat to PCK rat
Over-expressed genes encoding			
Glycine transporter	Symporter	M88595	12.03
ADP-ribosylation factor 2	Intracellular transducer	L12381	5.36
Cationic amino acid transporter 3	Symporter	AB000113	5.19
Potassium channel RCK4, subunit	Voltage-gated ion channel	X16002	4.39
Calcium channel $\beta$ subunit-3	Voltage-gated ion channel	M88751	4.05
Fibroblast growth factor 2	Growth factor	M22427	3.42
JunD	Oncogene	D26307	3.07
TGF- $\beta$ 3	Growth factor	U03491	2.65
Inhibitor of DNA binding 1	Transcription activator	D10862	2.65
Cytosolic thymidine kinase	Nucleotide metabolism	M22642	2.50
Synaptobrevin 2	Trafficking protein	M24105	2.49
Tripeptidylpeptidase II	Aminopeptidase	U50194	2.30
MEK5	Intracellular kinase network member	U37462	2.20
TGF- $\beta$ receptor type I	Growth factor receptor	L26110	2.19
Adipocyte fatty acid-binding protein	Trafficking protein	U75581	2.18
G protein, $\gamma$ -5 subunit	G protein	M95780	2.12
ADP-ribosylation factor 3	Intracellular transducer	L12382	2.06
Acetylcholine receptor $\beta$ -subunit	Neurotransmitter receptor	X74833	2.03
Under-expressed genes encoding			
Calpactin II	Complex lipid metabolism	M19967	0.31
Plasma glutathione peroxidase precursor	Enzyme involved in protein turnover	D00680	0.40
Rab-11A	G protein	M75153	0.41

の結果、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞において対照ラットより発現が亢進しているmRNAは18種類みられ、PCKラット/対照ラット比の大きい順に、グリシントランスポーター、ADPリボシル化因子2、塩基性アミノ酸トランスポーター3、NaチャンネルサブユニットRCK4、Caチャンネル $\beta$ 3サブユニット、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor, FGF) 2、JunD、DNA結合阻害因子1、形質変換成長因子 (transforming growth factor, TGF) - $\beta$  3、細胞基質チミジンキナーゼ、シナプトブレビン2、トリペプチジルペプチダーゼII、マイトジェン活性化蛋白 (mitogen-activated protein, MAP) /細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ (extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) キナーゼ (MAP/ERK kinase, MEK) 5、TGF- $\beta$  I型受容体、脂肪細胞脂肪酸結合蛋白、G蛋白 $\gamma$ 5サブユニット、ADPリボシル化因子3ならびにアセチルコリン受容体 $\beta$ サブユニットをコードするmRNAであった (表3, 図5, 6)。一方、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞において対照ラットより発現が減弱しているmRNAは3種類みられ、PCKラット/対照ラット比の小さい順にカルパクチンII、原形質グルタチオンペルオキシダーゼ前駆体ならびにRab-11AをコードするmRNAであった (表3)。

### 考 察

ヒトの先天的な胆管系形成異常の病因解明には類似的病態を示すモデル動物を用いた研究が有用と思われる。特に、モデル動物での肝内胆管上皮細胞の特徴を試験管内で研究するため、胆管上皮細胞を純粋に肝臓より単離し、得られた細胞を安定に継代培養させることが必要である。上皮系細胞の培養において

は、継代培養を続けるに従い細胞が脱分化して細胞固有の形質が失われてしまうことが懸念され<sup>18)</sup>、また、組織から目的の細胞を採取する際に間質細胞が混入してしまう場合も多くみられるので<sup>19)</sup>、これら問題点の克服が重要である。

本研究では、カロリ病の新しいモデル動物であるPCKラットから継代培養可能な肝内胆管上皮細胞株を樹立することを目的に、当教室のKatayanagiら<sup>19)</sup>の方法を用いて肝内胆管上皮細胞の単離、培養を試みた。本法の特徴は、胆管樹を解剖学的に肝内小型胆管および肝内大型胆管に区分して各々から胆管上皮細胞を単離することが可能な点、ならびに胆管上皮細胞と間質細胞のコラーゲンゲル上での増殖速度の違いを利用して胆管上皮細胞のみを単離することが可能な点であり、本研究ではこの方法によりカロリ病における胆管病変の主たる発生部位の肝内大型胆管<sup>20)</sup>から間質細胞の混入のないPCKラット肝内胆管上皮細胞を単離することができた。得られた細胞は継代培養しても胆管上皮細胞の特異的なマーカーであるCK7およびGGTを発現していた。多くの非上皮系細胞に存在する中間径フィラメントのビメンチン<sup>21)</sup>は脱分化した上皮系培養細胞にしばしば発現することが知られているが<sup>22)</sup>、今回単離したPCKラット培養肝内胆管上皮細胞にビメンチンの発現はみられず、脱分化せずに胆管上皮細胞としての形質を保持していることが確認された。

継代培養することができたPCKラット培養肝内胆管上皮細胞の性質を対照ラット培養肝内胆管上皮細胞と比較し、その特性を検索した。まず、細胞増殖活性を比較した結果、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞では倍加時間の短縮がみられ、増殖活性が亢進していることが示された。免疫組織化学的にPCKラ



ット肝内胆管上皮細胞は、対照ラット肝内胆管上皮細胞に比べて増殖細胞のマーカーであるKi-67を高頻度に発現することが報告されている<sup>15)</sup>。従って、試験管内および生体内での検討からPCKラットの肝内胆管では対照ラットに比べて胆管上皮細胞の増殖活性が亢進していることが示された。

次に、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより対照ラットと比較した。DNAマイクロアレイはDNAチップとも呼ばれ、スライドガラス又はナイロンメンブラン表面に数百から数千のcDNAを高密度に固相化したもので、これを用いることにより一回の実験で膨大な数の遺伝子発現を検索することが可能である。そして、このアレイ技術を用いた遺伝子のハイスループット解析は今後、遺伝子レベルでの病態の検索に多用されると考えられる。

本研究では、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞において対照ラットに比べて発現が亢進している遺伝子が18種類確認され、その中に細胞増殖制御に関与する遺伝子が含まれていた。そのひとつにDNA合成酵素であるチミジンキナーゼをコードする遺伝子があり、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞は増殖活性の亢進に伴ってチミジンキナーゼの発現を亢進させ、活発なDNA合成を行っていることが示唆された。

さらに、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞において細胞増殖シグナル伝達に関与するMEK5の遺伝子発現が亢進していたことも注目される。MEK5は細胞増殖シグナル伝達経路のひとつであるMAPキナーゼカスケード<sup>23)24)</sup>を構成するプロテインキナーゼのひとつであり、細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ(ERK)5のスレオニンおよびチロシン両残基をリン酸化することにより細胞増殖シグナルを核内に伝達している<sup>25)</sup>。さらに、MEK5およびERK5が構成するMAPキナーゼカスケードは、種々の細胞に対してマイトジェンとして機能することが知られている上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)<sup>26)</sup>の刺激による細胞増殖の一部を担っていることが報告されている<sup>27)~29)</sup>。また、培養肝内胆管上皮細胞ではEGF受容体が細胞膜全体にびまん性に分布していることが報告されている<sup>30)</sup>。これらのことから、PCKラット培養肝内胆管上皮細胞では培養液中のEGFによる細胞増殖シグナルをMEK5を介して対照ラットより活発に核内へ伝達し、このために細胞増殖活性が亢進していると考えられた。従って、PCKラットでは肝内胆管上皮細胞のEGFに対する感受性が亢進しており、これに基づく胆管上皮細胞の過剰増殖が肝内胆管拡張の発生に関与しているものと考えられた。Nautaら<sup>31)</sup>は、肝外胆管拡張を示すBALB/c-*bpk/bpk*マウスの培養胆管上皮細胞を用いた試験管内の検討で、EGFにより細胞増殖活性が亢進したとの実験結果から本研究と同様な考察をしている。なお、今回用いたアレイキットにはERK5のcDNAが搭載されておらず、ERK5の遺伝子発現については解析できなかった。また、一般的によく知られているMAPキナーゼカスケード<sup>32)</sup>、いわゆる古典的MAPキナーゼカスケード、の構成要素であるERK1、ERK2およびMEK1の遺伝子発現に対照ラットとの差はみられなかった。

一方で、上皮系細胞など多くの細胞種に対して増殖抑制作用を示すTGF- $\beta$ <sup>33)34)</sup>のアイソフォームであるTGF- $\beta$ 3、ならびにTGF- $\beta$ I型受容体およびJunDの遺伝子発現がPCKラット培養肝内胆管上皮細胞において亢進していたことは興味深い。細胞周期をG1期からS期へ進行させるためには細胞周期を調節しているサイクリン/サイクリン依存性プロテインキナーゼ

(cyclin-dependent protein kinase, Cdk)複合体によるがん抑制遺伝子産物Rb (retinoblastoma gene product) 蛋白のリン酸化が必須である。TGF- $\beta$ はこのサイクリンおよびCdkの発現を抑制、あるいはCdkインヒビターの発現を誘導してRb蛋白のリン酸化を抑制し、細胞周期をG1期に停止させて増殖を抑制することが知られている<sup>35)~37)</sup>。また、TGF- $\beta$ は上皮系細胞のアポトーシスを誘導する因子でもあり<sup>38)</sup>、TGF- $\beta$ 依存性のアポトーシスにはJunD・FosB型のAP-1 (activated protein-1) 転写因子が作用していることが報告されている<sup>39)</sup>。PCKラットでは、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling) 法を用いた生体内でのアポトーシスの検討により、肝内胆管上皮細胞のアポトーシスが生後1週以降、顕著に増加することが知られており<sup>15)</sup>、この知見と今回の結果をあわせると、PCKラット肝内胆管上皮細胞ではTGF- $\beta$ 遺伝子およびTGF- $\beta$ 受容体遺伝子の発現が亢進しており、産生されたTGF- $\beta$ がオートクラインあるいはパラクラインの機序で胆管上皮細胞に作用してアポトーシスを誘導している可能性が考えられた。なお、今回用いたアレイキットにはFosBのcDNAが搭載されておらず、FosBの遺伝子発現については解析できなかった。

TGF- $\beta$ は細胞外基質の産生を亢進させて組織の線維化を引き起こす作用を有することも既に知られている<sup>40)</sup>。ヒトの肝硬変組織内、あるいは胆管結紮によって線維化を引き起こしたラット肝組織内の胆管上皮細胞において、TGF- $\beta$ およびTGF- $\beta$ 受容体の発現が亢進しているとの実験結果から肝臓の線維化における胆管上皮細胞の関与を示唆する報告がある<sup>41)42)</sup>。PCKラットの肝臓ではCHF類似の線維化が観察されることから<sup>15)</sup>、肝内胆管上皮細胞におけるTGF- $\beta$ の発現亢進が線維化に関与している可能性も否定できない。

以上、PCKラットの肝臓をコラゲナーゼ処理して得られた胆管樹から肝内胆管組織片を分離してコラーゲンゲル上で培養し、そこから増殖する胆管上皮細胞を単離することにより、継代培養可能な肝内胆管上皮細胞株を樹立することができた。この細胞株は対照ラット培養肝内胆管上皮細胞に比べて増殖活性が高く、また、細胞の増殖シグナル伝達に関与する遺伝子の発現亢進と同時に増殖抑制シグナル伝達に関与する遺伝子の発現亢進を示した。従って、PCKラットでは遺伝子レベルでの細胞増殖制御の不調和に基づく胆管上皮細胞の異常増殖が肝内胆管拡張の発生に関与していると考えられた。

## 結 論

新たに見出されたカロリー病モデル動物であるPCKラット肝から肝内胆管上皮細胞を単離し、継代培養可能な細胞株の樹立を試み、さらに細胞増殖活性および遺伝子発現を対照ラット培養肝内胆管上皮細胞と比較し、以下の結論を得た。

1. PCKラットの肝臓をコラゲナーゼ処理して得られた胆管樹から肝内大型胆管を分離し、これをI型コラーゲンゲル上に移植、培養することにより、ゲル上をシート状に増殖する胆管上皮細胞が認められた。本細胞をゲルごと採取し、継代培養することで間質細胞の混入のない肝内胆管上皮細胞株が樹立できた。
2. PCKラット培養肝内胆管上皮細胞の倍加時間は対照ラットに比べて短縮しており、対照ラットよりも細胞増殖活性が亢進していた。

3. DNAマイクロアレイにより, PCKラット培養肝内胆管上皮細胞では対照ラットに比べて細胞の増殖シグナルおよび増殖抑制シグナルの伝達に関与する遺伝子の発現亢進が認められた。

以上, カロリ病モデルPCKラット培養肝内胆管上皮細胞は, 対照ラットに比べて細胞増殖活性が高く, また, 細胞増殖シグナル伝達に関与する遺伝子の発現亢進と同時に細胞増殖抑制シグナル伝達に関与する遺伝子の発現亢進を示した。これらのことから, PCKラットでは遺伝子レベルでの細胞増殖制御の不調和に基づく胆管上皮細胞の異常増殖が肝内胆管拡張の発生に関与していると考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 直接御指導頂きました金沢大学医学系研究科形態機能病理学講座中沼安二教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に際し終始, 御指導, 御助言を頂きました形態機能病理学講座原田憲一講師, 佐々木素子講師, 常山幸一助手, 石川県立中央病院病理科片柳和義先生ならびに教室の諸先生方, 技師の方々に深謝いたします。なお, 本研究の一部は日本肝臓学会大会(京都, 2001)で発表した。

#### 文 献

- 1) van Eyken P, Sciort R, Callea F, Van der Steen K, Moerman P, Desmet VJ. The development of the intrahepatic bile ducts in man. A keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 81: 1586-1595, 1988
- 2) Shah KD, Gerber MA. Development of intrahepatic bile ducts in human. *Arch Pathol Lab Med* 114: 597-600, 1990
- 3) Jorgensen M. A stereological study of intrahepatic bile ducts. 1. Method and application to normal livers. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81: 657-662, 1973
- 4) Jorgensen M. A stereological study of intrahepatic bile ducts. 2. Bile duct proliferation in some pathological conditions. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81: 663-669, 1973
- 5) Jorgensen M. A stereological study of intrahepatic bile ducts. 3. Infantile polycystic disease. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81: 670-675, 1973
- 6) Jorgensen M. A stereological study of intrahepatic bile ducts. 4. Congenital hepatic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 82: 21-29, 1973
- 7) Desmet VJ. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts. variations on the theme "ductal plate malformation." *Hepatology* 16: 1069-1083, 1992
- 8) Crawford JM. The liver and the biliary tract. *In* Cotran RS, Kuma V, Robbins SL (eds), *Robbins pathologic basis of disease*, 5th ed, p831-896, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, 1994
- 9) Crocker JFS, Blecher SR, Givner ML, McCarthy SC. Polycystic kidney and liver disease and corticosterone changes in the cpk mouse. *Kidney Int* 31: 1088-1091, 1987
- 10) Grimm PC, Crocker JFS, Malatjalian DA, Ogborn MR. The microanatomy of the intrahepatic bile duct in polycystic disease: comparison of the cpk mouse and human. *J Exp Pathol (Oxford)* 71: 119-131, 1990
- 11) Guay-Woodford LM, Green WJ, Lindsey JR, Beier DR. Germline and somatic loss of function of the mouse cpk gene causes biliary ductal pathology that is genetically modulated. *Hum Mol Genet* 9: 769-778, 2000
- 12) Nauta J, Ozawa Y, Sweeney WE, Rutledge JC, Avener ED. Renal and biliary abnormalities in a new murine model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 7: 163-172, 1993
- 13) Kränzlin B, Schieren G, Gretz N. Azotemia and extrarenal manifestations in old female Han:SPRD(cy/+) rats. *Kidney Int* 51: 1160-1169, 1997
- 14) Katsuyama M, Masuyama T, Komura I, Hibino T, Takahashi H. Characterization of a novel polycystic kidney rat model with accompanying polycystic liver. *Exp Anim* 49: 51-55, 2000
- 15) Sanzen T, Harada K, Yasoshima M, Kawamura Y, Ishibashi M, Nakanuma Y. Polycystic kidney rat is a novel animal model of Caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Am J Pathol* 158: 1605-1612, 2001
- 16) Katayanagi K, Kono N, Nakanuma Y. Isolation, culture and characterization of biliary epithelial cells from different anatomical levels of the intrahepatic and extrahepatic biliary tree from a mouse. *Liver* 18: 90-98, 1998
- 17) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 18) Hoerl BJ, Vroman BT, Kasperbauer JL, LaRusso NF, Scott RE. Biological characteristics of primary cultures of human gallbladder epithelial cells. *Lab Invest* 66: 243-250, 1992
- 19) Kumar U, Jordan TW. Isolation and culture of biliary epithelial cells from the biliary tract fraction of normal rats. *Liver* 6: 369-378, 1986
- 20) Torres VE. Polycystic liver disease. *In* Watson ML, Torres VE (eds), *Polycystic kidney disease*, 1st ed, p500-529, Oxford University Press, New York, 1996
- 21) Quax W, Egberts WV, Hendriks W, Quax-Jeu-Ken Y, Bloemendal H. The structure of the vimentin gene. *Cell* 35: 215-223, 1983
- 22) Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 93: 2175-2188, 1994
- 23) Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* 18: 128-131, 1993
- 24) Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268: 14553-14556, 1993
- 25) English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced form. *J Biol Chem* 270: 28897-28902, 1995
- 26) Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48: 193-216, 1979
- 27) Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395: 713-716, 1998

- 28) Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274: 26563-26571, 1999
- 29) Diaz-Meco MT, Moscat J. MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* 21: 1218-1227, 2001
- 30) Ishii M, Vroman B, LaRusso NF. Morphologic demonstration of receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by isolated bile duct epithelial cells. *Gastroenterology* 98: 1284-1291, 1990
- 31) Nauta J, Sweeney WE, Rutledge JC, Avner ED. Biliary epithelial cells from mice with congenital polycystic kidney disease are hyperresponsive to epidermal growth factor. *Pediatr Res* 37: 755-763, 1995
- 32) Johnson GL, Vaillancourt RR. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 6: 230-238, 1994
- 33) Like B, Massague J. The antiproliferative effect of type  $\beta$  transforming growth factor occurs at a level distal from receptors for growth-activating factors. *J Biol Chem* 261: 13426-13429, 1986
- 34) Boyd FT, Massague J. Transforming growth factor- $\beta$  inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor. *J Biol Chem* 264: 2272-2278, 1989
- 35) Feng XH, Filvaroff EH, Derynck R. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-induced down-regulation of cyclin A expression required a functional TGF- $\beta$  receptor complex. Characterization of chimeric and truncated type I and type II receptors. *J Biol Chem* 270: 24237-24245, 1995
- 36) Ewen ME, Sluss HK, Whitehouse LL, Livingston DM. TGF- $\beta$  inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74: 1009-1020, 1993
- 37) Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261, 1994
- 38) Bursch W, Oberhammer F, Jirtle RL, Askari M, Sedivy R, Grasl-Kraupp B, Purchio AF, Schulte-Hermann R. Transforming growth factor- $\beta$  1 as a signal for induction of cell death by apoptosis. *Br J Cancer* 67: 531-536, 1993
- 39) Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, Lodish HF. Critical role of Smad and AP-1 complex in transforming growth factor- $\beta$ -dependent apoptosis. *J Biol Chem* 275: 36295-36302, 2000
- 40) Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A. Transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Surv* 12: 81-103, 1992
- 41) Baer HU, Friess H, Abou-Shady M, Berberat P, Zimmermann A, Gold LI, Korc M, Buchler MW. Transforming growth factor  $\beta$  s and their receptors in human liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10: 1031-1039, 1998
- 42) Milani S, Herbst H, Schuppan D, Stein H, Surrenti C. Transforming growth factors  $\beta$  1 and  $\beta$  2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. *Am J Pathol* 139: 1221-1229, 1991

**Isolation, culturing, and characterization of intrahepatic biliary epithelial cells from a PCK rat, a novel animal model of Caroli's disease, with an emphasis on cell proliferation activity and expression of cell proliferation-related genes** Kazuo Kizawa, Department of Human Pathology, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **111**, 162 — 172 (2002)

**Key words** PCK rat, biliary epithelial cells, culture, DNA microarray, signal transduction

#### Abstract

Caroli's disease is an autosomal recessive inherited disease characterized by multiple and segmental saccular dilatations of the intrahepatic bile ducts. We have previously reported the polycystic kidney (PCK) rat, a novel animal model of Caroli's disease. In this study, the intrahepatic biliary epithelial cells (BECs) derived from a PCK rat were isolated and cultured, and were characterized biologically. The fragments of intrahepatic large bile duct were cut from the biliary tree after collagenase perfusion via the portal vein of the liver, and were cultured as explants on type I collagen gel. BECs spread from these explants with epithelial cell sheet appearance. Areas of this sheet composed of intrahepatic BECs alone were cut and placed on other collagen gels as subcultures. This allowed us to isolate intrahepatic BECs derived from a PCK rat without mesenchymal cell contamination. Cultured BECs derived from a PCK rat maintained phenotype as BEC; they were composed of a monolayer of epithelial cells and expressed acid glycoprotein on the apical cell surface on collagen gel, and expressed bile duct epithelial specific markers including cytokeratin 7 and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. In the same manner, control BECs derived from a Crj:CD rat were also isolated and cultured. BECs derived from a PCK rat displayed a shorter doubling time of 23 hours compared with that of 77 hours for BECs derived from a Crj:CD rat; proliferation activity of the former was higher than that of the latter. On DNA microarray analysis, mRNA encoding mitogen activated protein/extracellular signal-regulated protein kinase kinase (MEK) 5, which is one of the signal transducers related to epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation, was over-expressed in the BECs derived from a PCK rat. Simultaneously, mRNA encoding transforming growth factor (TGF)- $\beta$  3 and TGF- $\beta$  receptor type I, which are related to cell growth inhibition, were also over-expressed in these cells. From these results, the high proliferation activity of BECs based on the imbalance between expressions of cell proliferation related genes and cell growth inhibition related genes might contribute to the multiple and segmental cystic dilatation of the intrahepatic bile duct in the PCK rat.