

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15115

研究課題名(和文)胆道系幹細胞(BTSC)の単離法の確立と実体の解明

研究課題名(英文)Isolation and characterization of biliary tree stem cell (BTSC)

研究代表者

田中 稔(Tanaka, Minoru)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・細胞療法開発研究室長

研究者番号：80321909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TROP2を指標として肝外胆管の付属線(PBG)の細胞と管腔を構成する細胞を明確に細胞レベルで区別できることを示した。また、TROP2陰性のPBG構成細胞がTROP2陽性の増殖性の高い前駆細胞を産生し、管腔を形成することで胆管再生に寄与する可能性を培養実験、FACS解析や免疫染色により示した。さらに、PBG構成細胞のマーカーとして新規に同定したSAM5を指標として、胆管癌がPBG構成細胞に由来する可能性を示すとともにヒトの肝内胆管癌と肝外胆管癌の由来の違いをも区別できる可能性を示した。さらに、SAM5が胆管癌の治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that Trop2 expression is useful to distinguish peribiliary gland (PBG)-forming epithelial cells and luminal cells in extrahepatic bile ducts. We showed the possibility that TROP2-negative PBG-forming cells could contribute to bile duct regeneration by supplying TROP2-positive transit amplifying progenitor cells by in vitro culture system, FACS analysis and immunostaining. Furthermore, we identified Sam5 as a novel PBG marker. We showed the possibility that cholangiocarcinoma can be derived from PBG based on SAM5 expression and that SAM5 is useful to define the different origins of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinomas. SAM5 may become a therapeutic target to treat extrahepatic cholangiocarcinomas.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：胆道 幹細胞 胆管上皮細胞 付属線

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体を構成する一部の組織には組織幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、必要に応じて増殖、分化することで、新陳代謝による恒常性の維持や障害後の組織再生に寄与している。肝臓の組織幹細胞は Liver stem/progenitor cell (LPC) と呼ばれ、重篤な肝障害時に肝細胞や胆管上皮細胞へ分化することで再生に寄与する一方、近年、肝臓内の胆管と十二指腸をつなぐ「肝外胆管」にも幹/前駆細胞が存在することが報告された。胆道系幹細胞 (Biliary tree stem cell: BTSC) と名付けられたこの細胞は胆管周囲附属腺 (Peribiliary Gland: PBG) に存在するとされ、LPC マーカー (EpCAM, CD133 など) と膵前駆細胞マーカー (Pdx1) を発現し、肝細胞や膵内分泌細胞への分化能を有すると報告されている。しかし、これまでの BTSC に関する報告は肝外胆管の細胞を長期間培養し、残存した細胞を BTSC として解析したに過ぎず、肝外胆管から BTSC を直接、単離・同定する方法は確立されていなかった。このような従来の解析法では、複数の細胞種の混入や、長期培養に伴うストレスが BTSC の性状に影響を及ぼす可能性は避けられず、正確に生体内での BTSC の性状を反映しているとは言い難い。また、肝外胆管の恒常性の維持や障害後の再生への BTSC の寄与についてもほとんど分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、BTSC の同定法や単離法を確立するとともに、生体内での BTSC の性状や動態を明らかにすることで、恒常性の維持や障害後の再生、癌化への寄与について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝外胆管を EpCAM+TROP2- と

EpCAM+TROP2+細胞に分離し、遺伝子発現解析を行い EpCAM+TROP2-で特異的に発現する BTSC マーカー候補分子の探索を行なう。(2) 候補分子について免疫組織化学染色により PBG での発現を確認する。また、分離した EpCAM+TROP2-の PBG の細胞と EpCAM+TROP2+の管腔を形成する上皮細胞について、コロニー形成能や分化能の評価を行なう。(3) EpCAM+TROP2-に由来する PBG 構成細胞のコロニー形成細胞の多分化能の評価や膵  $\beta$  細胞への分化誘導を試みる。(4) TROP2-Cre マウスを用い、正常時または障害時の細胞系譜解析を行なう。(5) 正常時または障害時の TROP2 KO マウスの肝外胆管を解析し、肝外胆管細胞の分化、機能、再生に及ぼす TROP2 の機能を解明するとともに、EpCAM+TROP2-の PBG の細胞の肝外胆管の維持、再生における役割を調べる。

### 4. 研究成果

(1) EpCAM+TROP2-で特異的に発現する BTSC マーカー候補分子の探索。

EpCAM+TROP2-で特異的に発現する BTSC マーカー候補分子として Sterile alpha domain containing 5 (Samd5) を同定した。

(2) Samd5 の免疫染色および PBG 細胞と管腔細胞のコロニー形成能、分化能の評価。Samd5 の免疫染色を行った結果、正常肝外胆管の PBG で Samd5 のシグナルが検出されたが、管腔の上皮細胞では検出されなかった (図 1 A)。DDC 食餌による胆道障害肝臓では Samd5 は管腔の上皮細胞でも発現が認められるようになり、胆管再生に PBG の細胞が寄与している可能性が示唆された (図 1B, C)。また、ヒト胆管癌においては SAMD5 が核発現していることも見出した (図 2)。胆管癌細胞株に Samd5 を強制発現させると癌細胞の増殖が低下したことから、Samd5 は未分化細胞の増殖に関わる分子であることが示唆された。以上の結果をまとめて、論文発表した (雑誌論文①) また、PBG 構成細胞と管腔細胞のコロニー形成能の評価を二次元培養系で行った結果、PBG 細胞は管腔細胞に比べて、高いコロニー形成能を示した。一方、三次元培養系で分化能を検討した結果、TROP2 陰性の PBG 細胞は TROP2 陽性細胞へと変化し、嚢胞を形成したことから、PBG 細胞は管腔形成細胞へと分化したことが示唆された。

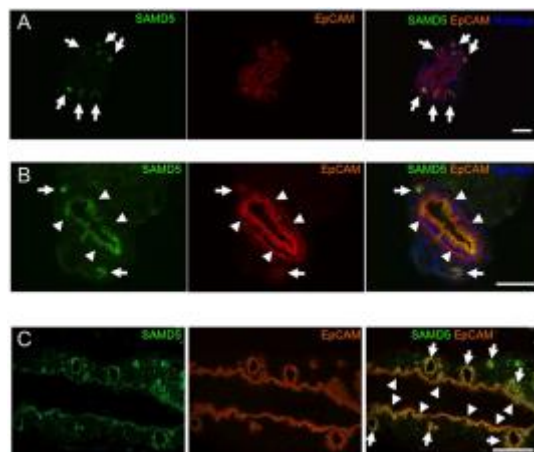


図 1 正常または胆道障害肝の肝外胆管における SAMD5 と EpCAM の発現様式。

(A) 正常肝外胆管の垂直切断面 (B, C) DDC 障害肝の肝外胆管の垂直切断面 (B) と並行切断面 (C)

(3) PBG 構成細胞の膵  $\beta$  細胞への分化誘導。PBG 構成細胞から産生したコロニー形成細胞を用いて膵  $\beta$  細胞への分化を試みた。その結果、qRT-PCR ではインスリンの発現が認められたものの C-peptide の放出は検出されなかったため、この分化誘導系では  $\beta$  細胞への分化は不十分であると考えられた。

(4) TROP2-Cre マウスによる細胞系譜解析. Trop2-Cre と Rosa-tdTomato レポーターマウスを交配し、Trop2 陽性細胞をラベルした. その結果、管腔の細胞が多数ラベルされることが確認できた. 一方、管腔の細胞の中でもラベルされない細胞が一部に認められた. この細胞が Cre リコンビナーゼの組み換え効率によるものか、実際に Trop2 陰性細胞として存在しているのかは今後の検討課題である.

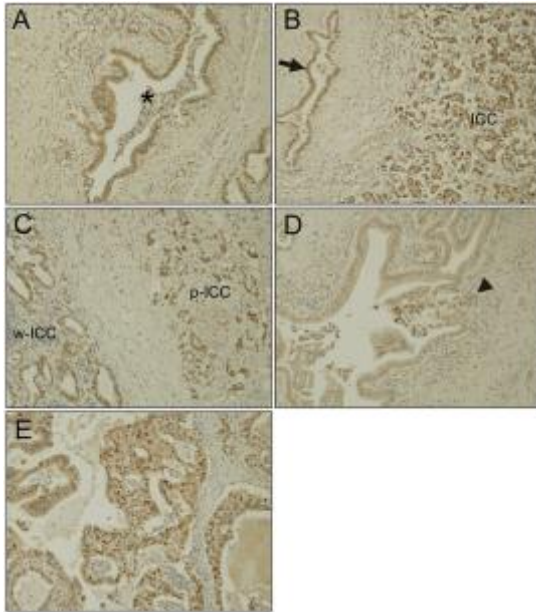


図2 ヒト胆管癌における SAMD5 の核内発現.

A. 正常肝門部大型胆管では SAMD5 の核発現は認めないが、B-E の胆管癌では SAMD5 の核発現を認めた.

(5) 野生型または TROP2 KO マウスの胆道障害モデルでの解析.

野生型マウスと Trop2 KO マウスを用いて、胆管結紮による肝障害を施した結果、ALP や総ビリルビン、胆汁酸といった血中肝障害マーカーに差異は認められなかった. よって、Trop2 は胆道障害に直接関与しないことが示唆された. 一方、野生型マウスに胆管結紮を行い、経時的に肝外胆管の FASC 解析を行った結果、胆道障害の進行とともに、EpCAM 陽性細胞中の TROP2 陽性細胞の割合が増加していくことが明らかとなった. さらに、EpCAM+TROP2+細胞の多くは Ki67 陽性の増殖細胞であった. さらに、この EpCAM+TROP2+細胞をコロニーアッセイに供したところ、正常時の EpCAM+TROP2+細胞に比べて高いコロニー形成能を示した. (2) の結果と合わせて考えると、正常時に PBG に存在する EpCAM+TROP2-の細胞は胆道障害を受けると、TROP2+の増殖性が高く管腔形成能のある前駆細胞となり、総胆管の再生に寄与するものと考えられた.

本研究は、TROP2 を指標として PBG に存在する細胞を明確に区別することが可能であることを示すと同時に、PBG 構成細胞が高い増殖性を示し胆管再生に寄与する可能性を示した. さらに、PBG 構成細胞のマーカーとして新規に同定した SAMD5 を指標として、胆管癌が PBG 構成細胞に由来する可能性を示すと同時にヒトの肝内胆管癌と肝外胆管癌の由来の違いをも区別できる可能性を示した. さらに、SAMD5 が胆管癌の治療標的となる可能性を示したことから、その意義は大きいと考える.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①Expression and localization of sterile alpha motif domain containing 5 is associated with cell type and malignancy of biliary tree. Yagai T, Matsui S, Harada K, Inagaki FF, Saijou E, Miura Y, Nakanuma Y, Miyajima A, Tanaka M. *PLoS One*. 12: e0175355. (2017) doi:

10.1371/journal.pone.0175355. 査読あり

②Depletion of myeloid cells exacerbates hepatitis along with aberrant elevation of histone H3 in sera of mice. Piao X, Yamazaki S, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Nakabayashi O, Kurosawa T, Mikami T, Tanaka M, Van Rooijen N, Ohmuraya M, Oikawa A, Kojima Y, Kakuta S, Uchiyama Y, Tanaka M, \*Nakano H. *Hepatology*. 65(1):237-252 (2017) doi: 10.1002/hep.28878. 査読あり

③Liver regeneration and fibrosis after inflammation. \*Tanaka M, Miyajima A. *Inflammation and Regeneration*. 36:19 (2016)

<https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-016-0025-2> 査読あり

④A transcriptomic signature of mouse liver progenitor cells. Passman AM, Low J, London R, Tirnitz-Parker JE, Miyajima A, Tanaka M, Strick-Marchand H, Darlington GJ, Finch-Edmondson M, Ochsner S, Zhu C, Whelan J, Callus BA, \*Yeoh GC. *Stem Cells Int*. 5702873 (2016) doi:

10.1016/j.stemcr.2015.08.008. 査読あり

⑤CPM is a useful cell surface marker to isolate expandable bi-potential liver progenitor cells derived from human iPS cells. Kido T, Kouji Y, Suzuki K, Kobayashi A, Miura Y, Chen EY, Tanaka M, \*Miyajima A. *Stem Cell Reports*. 5:508-515 (2015)

doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.008.

査読あり

⑥Oncostatin M is a potential agent for the treatment of obesity and related metabolic disorders: a study in mice. Komori T, Tanaka M, Furuta H, Akamizu T, Miyajima A, \*Morikawa Y. *Diabetologia*. 58(8):1868-76. (2015) doi: 10.1007/s00125-015-3613-9.

査読あり

⑦Oncostatin M Confers Neuroprotection against Ischemic Stroke. Guo S, Li ZZ, Gong J, Xiang M, Zhang P, Zhao GN, Li M, Zheng A, Zhu X, Lei H, Tanaka M, Li H. *J. Neurosci.* 26;35(34):12047-62. (2015) doi: 10.1523/JNEUROSCI.1800-15.2015. 査読あり

〔学会発表〕 (計 11 件)

①田中稔. 肝再生過程における肝幹/前駆細胞の実体解明を目指して 第 23 回 肝細胞研究会、大阪、2016 年 7 月 7 日-7 月 8 日

②田中稔. 肝臓の疾患および再生における多様な細胞死の意義 第 89 回 日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 25 日-9 月 27 日

③田中稔、松田道隆、鶴崎慎也、宮島篤. 細胞死を起点とした肝臓の線維化と再生機構の解明 第 24 回 日本 Cell Death 学会、大阪、2015 年 7 月 11 日-7 月 12 日

④Tomoki Yagai, Atsushi Miyajima, Minoru Tanaka. Study on the molecular mechanisms linking between hepatic cell death and fibrosis. Japan Australia Meeting on Cell Death, WEHI, Melbourne, Australia, October 22, 2015

⑤Minoru Tanaka. Isolation and characterization of liver stem/progenitor cell (LPC) in mouse hepatic disease model. 18<sup>th</sup> A-IMBN annual conference, SIMS, Cheonan-si, Korea, September 22, 2015

⑥松井 理司、宮島 篤、田中 稔. TROP2 を指標とした胆道系幹/前駆細胞 (BTSC) の同定 第 89 回 日本生化学会大会、仙台 9 月 25 日-27 日

⑦松井 理司、宮島 篤、田中 稔. 胆道系幹/前駆細胞の単離・同定法の確立とその生理的意義の解明 第 23 回 肝細胞研究会、大阪、2016 年 7 月 7 日-7 月 8 日

⑧三浦泰史、田中稔、吉川大和、合田亘人、宮島篤. Characterization of Liver Stem/Progenitor Cell by the Expression Profile of Lutheran 第 13 回幹細胞シンポジウム、東京大学 伊藤国際学術研究センター (東京都) 2015 年 5 月 29-30 日

⑨三浦泰史、田中稔、吉川大和、合田亘人、宮島篤. Lutheran は肝幹/前駆細胞の性状を制御する機能性マーカー分子である 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイラ

ンド (兵庫県神戸市) 2015 年 12 月 1 日 (火) から 12 月 4 日 (金)

⑩三浦泰史、吉川大和、合田亘人、宮島篤、田中稔. Lutheran は肝幹/前駆細胞の Heterogeneity を規定する機能性マーカーである 第 23 回 肝細胞研究会、大阪、2016 年 7 月 7 日-7 月 8 日

⑪三浦泰史、吉川大和、合田亘人、宮島篤、田中稔. Lutheran は肝障害時の EpCAM 陽性細胞の性状を制御する機能性マーカーである 第 89 回 日本生化学会大会、仙台 2016 年 9 月 25 日 - 9 月 27 日

〔図書〕 (計 3 件)

①田中稔. 細胞死からみた肝線維化の制御機構 実験医学 第 34 巻 7 号 pp. 158-163 (2016)

②田中稔. 細胞死と肝臓の再生および線維化 臨床免疫・アレルギー科 第 63 巻 第 5 号 pp. 445-451. 科学評論社 (2015)

③田中稔. gp130 を介して作用するサイトカイン サイトカイン・増殖因子キーワード辞典 pp. 52-66. 羊土社 (2015)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://ncgm-regenerative-medicine.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 稔 (TANAKA, Minoru)

国立国際医療研究センター研究所・細胞組織再生医学研究部・細胞療法開発研究室・室長

研究者番号：80321909

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

大河内 仁志 (Okochi, Hitoshi)

国立国際医療研究センター研究所・細胞組織再生医学研究部・部長

研究者番号：30185235