

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19025

研究課題名(和文) 肝臓における偽胆管・胆管癌形成の三次元イメージングと幾何学的空間定量解析

研究課題名(英文) Three-dimensional imaging and morphometric analysis on proliferation of pseudo-biliary tracts and differentiation into cholangiocarcinomas

研究代表者

高島 康郎 (TAKASHIMA, Yasuo)

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

研究者番号：50621083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝障害時の胆管系細胞(細胆管反応)や胆管癌の増殖・形態形成過程を空間定量的に把握し、その細胞制御を調べるため、肝障害モデルマウスを作製して解析した。その結果、肝障害時において中心静脈域に出現する胆管系細胞は、肝内マクロファージ(Kupffer細胞)によってNotchシグナルが活性化された肝細胞が胆管系細胞に分化転換したものであることがわかった。このとき同時に肝細胞のアポトーシスが抑制されることわかった。また、肝前駆細胞を調べたところ、LIN28BがmiRNAであるmiR-125a/bとlet-7bを抑制することで細胞増殖を制御し、同時に胆管上皮細胞への分化が抑制されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：For chronic diseases and cancers in liver, it is desirable to diagnose the three-dimensional (3D) structures of lesions and altered microtubule structures on a single cell-based observation. In this study, we purpose to develop technical infrastructures for pathological diagnosis and basic medicine, based on morphometrics for proliferation of pseudo-biliary tracts and cholangiocarcinomas, derived from pseudo-biliary epithelial cells differentiated from hepatocytes, using a high-resolution digital 3D reconstruction. Here we showed that Kupffer cells, known as stellate macrophages, stimulate Notch signaling in hepatocytes surrounding central veins, therefore, hepatocytes can be reprogrammed into bile duct-like cells without apoptosis. We also demonstrated that LIN28B, in hepatoblasts, suppresses tumor suppressive miRNAs including miR-125a/b and let-7b, and maintains expression of LIN28B itself, thereby, regulating their proliferation and suppressing differentiation into biliary cells.

研究分野：細胞生物学・生理形態学

キーワード：肝内胆管癌 分化転換 Notchシグナル Kupffer細胞 アポトーシス 肝前駆細胞 LIN28B miRNA

1. 研究開始当初の背景

肝臓は肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞など様々な種類の細胞で構成されており、このうち肝細胞と胆管上皮細胞は前腸内胚葉に由来する肝前駆細胞(肝芽細胞 hepatoblast)から分化してくる。肝芽細胞は高い増殖能と分化能をもつことから、胎生期肝臓の幹細胞といえる[1,2]。肝小葉門脈域の肝芽細胞は、血管内皮細胞や線維芽細胞から刺激を受けて胆管上皮細胞へと分化する[3,4]。その後、一層の胆管上皮細胞層が門脈を取り囲み(ductal plate)、肝芽細胞と胆管上皮細胞のモザイクからなる管腔構造を経て、胆管上皮細胞のみからなる胆管を形成する[5,6]。一連の胆管発生のプロセスは肝臓の中心部から辺縁へと連続的に起こることで肝内胆管の樹状構造が構築されていくと考えられている。しかしながら、従来の2D平面による観察だけではこれを立体的に説明することは難しい。これらの問題を解決するには高解像度3D再構築法による、細胞あるいは組織レベルでの3D解析が必要である。

肝疾患患者に対する臨床や基礎医学の研究において、3Dイメージングの手法としてポジトロン断層法(PET)や放射線コンピュータ断層撮影(CT)、核磁気共鳴画像法(MRI)、あるいは内視鏡的逆行性胆管膵管造影(ERCP)がある。しかしながら、これらの画像診断法では解像度が低いために病変細胞や微小管腔構造の変異を診断することが難しく、病理学的所見や基礎医学研究においても必ずしも十分とはいえない場合がある。これまでに、組織の発生初期から成熟過程までの一連の構築過程を3Dイメージングと形態計測学の手法を用いて解析した例はなかったが、最近、研究代表者らは高解像度デジタル3D再構築法により、マウスの肝内胆管の立体的な形態形成過程を定量的に詳細に明らかにした[7]。

マウス胎仔期 E13.5-E17.5, Neonate, 1-2 week old, Adult (10 week old)の肝臓の連続組織切片の胆管上皮細胞(CK19)と血管内皮細胞

(PECAM)を蛍光免疫染色し、肝臓中心部の高解像度連続断層画像を取得した。これを3D解析ソフトにインポートし、門脈域の胆管上皮細胞

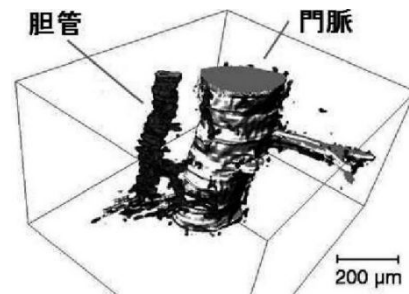


図1. 胆管と門脈の3Dイメージング

の3D分布と胆管の形態を3Dリモデリングし、全方位から観察した[図1]。さらに幾何学モデルを作製し、内腔をもつCK19陽性細胞塊の大きさ、数、長径、分岐点の数、細胞塊同士の距離、内腔の直径、体積、胆管と門脈との距離を、空間的かつ定量的に解析した。その結果、胆管上皮細胞は胎生中期および後期における二段階の形態形成の活発化により細胞塊の増加、伸長、分枝、統合を繰り返して胆管構造を構築し、生後1週齢以降に門脈から離れつつ内腔が拡張され、胆管が成熟することが明らかとなった[7]。

2. 研究の目的

肝臓の慢性疾患や癌などにおいては、病変組織の立体構造や微小管腔構造の変異を細胞単位で詳細に解析することが望まれる。しかしながら、従来の2D平面における観察主体の手法では細胞あるいは組織レベルの3D構造を明らかにすることは難しい。そこで本研究では、高解像度デジタル3D再構築法を用いて肝障害時に中心静脈域に出現する胆管系細胞(偽胆管)や胆管癌の形態形成過程を立体的にとらえ、そこから得られる情報を空間定量解析するとともに、胆管癌の起源となりうる胆管系細胞におけるシグナル伝達と分子機構を明らかにすることを目的とする。

細胞や組織の発生 - 再生 - 癌化過程は全世界で研究されており、ヒトの病理検体や癌細胞株、あるいは多くの動物モデルが用いられて

いる。しかしながら組織学や病理学的な研究の多くは 2D 平面による定性的な観察が主流で、3D イメージングによる空間定量的な記述は少ない。細胞 - 組織 - 器官は個々の細胞の極性と立体的な組織構築により形成されるので、2D 平面より 3D イメージングでの解析のほうがより多くの情報が得られる。従来のような組織切片を 2D 平面で観察する手法では細胞の 3D 分布や病変部位の立体構造を把握することは難しいが、本研究では高解像度連続断層画像をデジタル 3D 再構築することにより、これらを空間定量的に記述することを可能にした。肝障害・胆管癌モデルにおいて、胆管系細胞の分布(偽胆管、細胆管反応)や胆管癌の増殖・形態形成過程を明らかにすることは、臨床における病理診断の向上や今後の基礎医学の研究に役立つものと期待される。

3. 研究の方法

本研究では、成体マウスに Thioacetamide (TAA)を継続的に投与して、慢性肝炎あるいは肝硬変に類似した病態モデルを作製し、さらに長期投与により胆管癌モデルを作製した。これらの病態モデルにおいて、偽胆管や胆管癌の形成過程を空間定量的に解析した。また、胎仔マウスの肝臓から肝前駆細胞を抽出し、その幹細胞能維持の分子機構を解析した。

これまでに、組織の発生初期から成熟過程までの一連の構築過程を 3D イメージングと形態計測学的手法を用いて解析した例はなかったが、最近、研究代表者らは高解像度デジタル 3D 再構築法により、マウスの肝内胆管の立体的な形態形成過程を定量的に詳細に明らかにしている[7]。本研究では、研究代表者らが開発した高解像度デジタル 3D 再構築法を用いて、肝障害時における偽胆管や胆管癌の形態形成過程を立体的にとらえ、そこから得られる情報を空間定量的に解析するとともに、遺伝子発現やシグナル伝達経路を解析した。

4. 研究成果

肝障害時における胆管系細胞の 3D 分布

肝内胆管癌は門脈域の胆管細胞と類似した細胞からなる悪性上皮腫であるが、腫瘍起源の詳細はわかっていない。そこで、マウスに TAA を 30 週投与して肝内胆管癌モデルを作製し、肝葉中心部の連続凍結切片を作製した後、Cytokeratin (CK)19(胆管上皮細胞マーカー)と PECAM-1/CD31(血管内皮細胞マーカー)を蛍光標識して共焦点レーザー顕微鏡を用いて高解像度連続断層画像を取得した。このデータセットを 3D 解析ソフトにインポートして研究代表者らが開発した手法により 800 μ m (x) \times 800 μ m (y) \times 500 μ m (z)の空間を再構築し、CK19 陽性細胞の空間分布を調べた結果、多くの CK19 陽性胆管系細胞(偽胆管)が観察された。

肝細胞 - 胆管系細胞分化転換の分子機構

門脈域の肝内胆管癌は Notch シグナルにより肝細胞から胆管系細胞に分化転換した細胞が起源である可能性が知られている[8,9]。一方、中心静脈域の肝内胆管癌が肝細胞からの分化転換した胆管系細胞(偽胆管)を起源として腫瘍化したものかどうかを調べるため、マウスに TAA を投与して肝内胆管癌モデルを作製した。TAA 投与 5 週後に中心静脈域に胆管系細胞が出現し、一過的な Notch シグナルが認められると同時に、Notch リガンドである Jagged-1 を発現する Kupffer 細胞(肝類洞内常在型マクロファージ)が中心静脈域に集積した。また、クロドロン酸で Kupffer 細胞を除去した後に TAA を投与すると胆管系細胞の出現が著しく減少したことから、Kupffer 細胞が肝細胞の Notch シグナルを活性化して胆管系細胞へと分化転換させていることがわかった。また、Kupffer 細胞は中心静脈域の肝細胞のアポトーシスを抑制していることがわかった[10]。

肝前駆細胞の幹細胞能維持の分子機構

胎仔マウスの肝臓から肝前駆細胞を抽出し、幹

細胞能を維持するための分子制御機構を調べた。肝前駆細胞では LIN28B (幹細胞マーカー) が癌抑制的マイクロ RNA である miR-125a/b と let-7b を抑制することで、LIN28B 自身の遺伝子発現の維持と肝前駆細胞の自己増殖を制御し、また、肝前駆細胞から胆管上皮細胞への分化を抑制していることがわかった[図 2][11]。

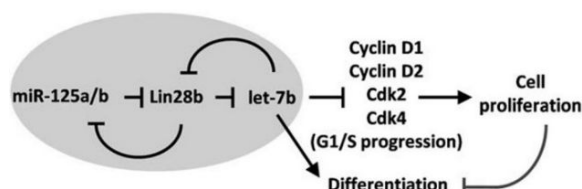


図2. 肝前駆細胞の細胞増殖と分化抑制の制御メカニズム

研究成果の一部は **Scientific Reports**[10], **Hepatology** [11]に発表された。

【参考文献】

- [1] Suzuki, **J Cell Biol.** 2002 Jan 7;156(1):173-84.
- [2] Suzuki, **Development.** 2008 May;135(9):1589-95.
- [3] Clotman, **Genes Dev.** 2005 Aug 15;19(16):1849-54.
- [4] Zong, **Development.** 2009 May;136(10):1727-39.
- [5] Antoniou, **Gastroenterology.** 2009 Jun;136(7):2325-33.
- [6] Si-Tayeb, **Dev Cell.** 2010 Feb 16;18(2):175-89.
- [7] Takashima, **Hepatology.** 2015 Mar;61(3):1003-11.
- [8] Gatto, **Dig Liver Dis.** 2010 Apr;42(4):253-60.
- [9] Sekiya, **J Clin Invest.** 2012 Nov;122(11):3914-8.
- [10] Terada, **Sci Rep.** 2016 Oct 4;6:34691.
- [11] Takashima, **Hepatology.** 2016 Jul;64(1):245-60.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

1. Terada M, Horisawa K, Miura S, Takashima Y, Ohkawa Y, Sekiya S, Matsuda-Ito K, Suzuki A. Kupffer cells induce Notch-mediated hepatocyte conversion in a common mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma. **Sci Rep.** 2016 Oct 4;6:34691. doi: 10.1038/srep34691.

2. Takashima Y, Terada M, Udono M, Miura S, Yamamoto J, Suzuki A. Suppression of let-7b and miR-125a/b Maturation by Lin28B Enables Maintenance of Stem Cell Properties in Hepatoblasts. **Hepatology.** 2016 Jul;64(1):245-60. doi: 10.1002/hep.28548. Epub 2016 Apr 15.

{その他}

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/orgreg/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高島 康郎 (TAKASHIMA, Yasuo)
九州大学・生体防御医学研究所・特任助教
研究者番号:50621083