

令和元年6月17日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07421

研究課題名(和文)ユニークな肝再生モデル系における胆管増生とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Progenitor cell proliferation during liver regeneration induced by portal vein branch ligation

研究代表者

塩尻 信義 (SHIOJIRI, Nobuyoshi)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：70162568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓再生の仕組みを明らかにするため、マウスを用いて肝臓に入る門脈の結紮実験を行った。特定の肝葉に行く門脈を結紮すると、その肝葉は栄養枯渇で萎縮する一方、門脈結紮を行わない肝葉は肥大する。その過程で、未分化な肝前駆細胞がどのように増殖するか調べた。肝再生に働くとされるTNF α が肝前駆細胞の増殖に必要不可欠であることを示唆する結果が得られた。しかし肝細胞の増殖には必ずしも必須ではなかった。またモザイクマウスを用い、肝再生過程における肝細胞の増殖パターンに定方向性がないことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子欠失マウスを用いて特定の肝葉に行く門脈を結紮する実験を行い、その肝再生過程で肝前駆細胞の増殖はTNF α のシグナルを必要とするが、肝細胞の増殖には必要ではないことを示唆する結果を得た。この成果は、肝前駆細胞の増殖の仕組みを明らかにしただけでなく、従来知られる肝細胞の増殖の仕組みに疑問を呈するものである。またヒト肝疾患にともなう肝再生の仕組みや治療への応用に貢献するものでもある。

研究成果の概要(英文)：Liver regeneration was examined in mouse livers, which had portal vein branch ligation to left and median liver lobes. While ligated lobes were degenerated, liver regeneration, including hepatocyte growth, was detectable in nonligated liver lobes. Liver progenitor cell proliferation was noted around portal vein branches of ligated and nonligated lobes. In portal vein branch ligation experiments with TNFR1-knockout mice, hepatocyte growth took place, but no liver progenitor cells remarkably proliferated. The data suggest that TNF α signaling plays an important role in progenitor proliferation during liver regeneration induced by portal vein branch ligation.

研究分野：組織構築学

キーワード：肝再生 肝前駆細胞 胆管 TNF 門脈結紮 モザイク フラクタル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓の再生系として、代償性肥大が再生の本体である部分肝切除系と、肝障害に誘発されて肝幹様細胞あるいは肝前駆細胞の増殖がおり肝再生にいたる肝障害系の、大きく2つの実験系が知られる。部分肝切除系では、免疫系細胞の集積は肝内に認められないが、肝障害系では、肝細胞への障害のため免疫系細胞が多数集積し、また肝前駆細胞の増殖が同時におこる。そのため、種々の解析を行う上で細胞構成上非常に複雑である。肝前駆細胞の増殖の意義を明らかにするためには、より単純な実験系が求められる。

マウスやラットの成体肝臓で特定の肝葉に行く門脈を結紮すると、その肝葉は栄養枯渇で萎縮するが、その際、肝前駆細胞の増殖や胆管増生がおこるとされる。また壊死をとまなうことも多いとされる。しかし結紮を行わない肝葉でも肝再生に加え、顕著な胆管増生あるいは肝前駆細胞増殖がおこるとされる。しかし、これら、結紮肝葉、非結紮肝葉における細胞動態は依然不明な点が多い。門脈結紮系では、再生肝葉と萎縮肝葉が別なので、胆管増生あるいは肝前駆細胞増殖のメカニズムを解析する上で、再生と障害が同時におこる、化学薬剤投与による肝障害再生系より単純である。この門脈結紮による肝再生系を確立することができれば、その詳細解析は肝前駆細胞研究に有用なデータを供給しうると期待される。

肝臓実質部に侵入する肝前駆細胞は肝細胞と胆管上皮細胞に分化し、肝再生に寄与すると考えられているが、これも十分な証明には至っていない。もしこの寄与があるならば、通常の肝細胞の増殖パターンからずれがある可能性がある。肝臓でのオルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)酵素の発現がモザイク状になる *spf^{flsh}* ヘテロ型マウスを用いて肝再生実験を行い、肝細胞の増殖パターンを解析すれば、その寄与が明らかになるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、マウス成体肝臓において、化学薬剤を用いず肝前駆細胞増殖を顕著に誘導できる新奇実験系の開拓とそのメカニズムの解明を行うことを目的とする。そのために、次の研究項目について解析を行った。

- (1) 門脈結紮をふくめ肝再生系における肝前駆細胞増殖の免疫組織学的解析
- (2) 部分肝切除ならびに門脈結紮による肝再生系における TNF シグナルの関わり
- (3) 各肝再生系におけるモザイクマウスを用いた肝細胞の増殖パターンの数理解析

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6J 系マウス(生後 8-12 週雄)を用い、部分肝切除、門脈結紮手術、アセトアミノフェン(APAP)腹腔内投与または 3,5-ジエトキシカルボニル-1,4-ジヒドロコリジン(DDC)食餌処理を施し、その再生過程を、細胞動態をふくめ免疫組織学的に解析した。
- (2) TNF 受容体遺伝子欠失マウス(生後 8-12 週雄)に部分肝切除、門脈結紮手術を行い、再生過程を野生型と比較した。
- (3) 肝細胞の増殖パターンの解析のためのモザイク解析は、*spf^{flsh}* ヘテロ型雌マウス(生後 8-12 週)を用い、部分肝切除を含め種々の肝再生系で OTC モザイク像についてボックスカウント法によりフラクタル解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 各肝再生系における細胞動態を免疫組織学的に探索した。
部分肝切除系では、術後 3 日に Ki67 陽性肝細胞が肝小葉全体に一樣に観察された。顕著な胆管増生あるいは肝前駆細胞の増殖はおこることはなかった。術後 2 週には再生を完了した。
DDC 障害系では、DDC 給餌 2 週で門脈周囲にサイトケラチン強陽性、オステオポンチン陽性の胆管増生ならびに肝前駆細胞増殖が認められた。これらの細胞は肝臓実質部にある程度侵入した。胆管上皮細胞に Ki67 陽性細胞が多数認められたが、肝細胞にはあまり Ki67 陽性細胞は観察されず、この障害系では肝細胞はあまり増殖しないと推察された。標準食餌に変えて 3 週後にはほぼ正常な組織像に回復した。
APAP 障害系の場合、その投与は 2 回行ったが、投与後 3 日の時点で、中心静脈周囲 1-3 層の肝細胞に壊死を生じていた。また残りの肝臓実質部全体の肝細胞が Ki67 陽性となり、ほぼ全ての肝細胞が増殖相に入っていた。加えて、門脈域より、少数であるがサイトケラチン強陽性の肝前駆細胞が出現し、肝臓実質部に侵入した。APAP 投与後 3 週でほぼ正常な組織像に回復した。
門脈結紮実験では、手術 1 日後に、門脈結紮を行った肝葉で壊死がおこり、次第に萎縮していった。手術 3 日後に、サイトケラチン強陽性の胆管増生あるいは肝前駆細胞が認められた。結紮肝葉での変化と平行し、門脈結紮を行わない肝葉で再生がおこった。肝細胞の分裂像は手術 3 日後に顕著であった。非結紮肝葉でも、胆管増生あるいは肝前駆細胞増殖が認められる個体があった。これらの増生は、DDC 処理とは異なり肝実質部に深く侵入することにはなかった。個体差があり、さらに実験例数を増やす必要がある。

- (2) TNF 受容体遺伝子欠失マウスにおいて門脈結紮手術を施したところ、術後 1 日、3 日ともに肝細胞壊死は門脈を結紮した肝葉で野生型同様認められた。門脈結紮を行わない肝葉での肝細胞増殖も野生型同様におこった。これらの結果は、門脈結紮による肝再生系では、そ

の肝細胞の増殖に TNF シグナルが働かない可能性があることを示唆している。別の因子が TNF の働きを代行している可能性もある。一方、肝前駆細胞の増殖については、TNF 受容体遺伝子欠失マウスの場合、結紮、非結紮肝葉ともに抑えられた。この結果より、門脈結紮系での肝前駆細胞増殖には TNF シグナルが関わることが示唆された。今後、さらに実験例数を増やし、証明していく必要がある。

部分肝切除系で同様に TNF 遺伝子欠失マウスを用いて肝再生過程を解析した。TNF 遺伝子欠失マウスにおいても、野生型マウスと同様にその肝再生は正常に進行した。手術 3 日後における細胞周期マーカー Ki67、リン酸化ヒストン 3、トポイソメラーゼ IIa 陽性細胞の割合は野生型と遺伝子欠失マウスで差がなかった。この結果は過去の論文報告とは一致しないが、TNF リガンドの遺伝子欠失マウスデータとは一致する。TNF リガンドの遺伝子欠失マウスでも、部分肝切除による肝再生は正常におこるとされる。TNF が肝再生過程で発現変動していることを本研究でも確認しており、肝再生過程で働く可能性は十分にある。遺伝子欠失個体では TNF の代替シグナルが働いているとも推察される。さらに今後の検討が必要である。

(3) 部分肝切除系及び、APAP または DDC による肝障害系で、OTC 酵素の発現がモザイク状になる *spf^{flsh}* ヘテロ型マウスを用いて肝細胞の増殖パターンを数理科学的に解析した。OTC モザイク像の解析は、肝再生が完了する時期、部分肝切除系では、術後 2 週、DDC 処理の場合は処理終了後 3 週、APAP 投与の場合は投与後 3 週の時点で肝臓サンプルを採取した。各肝臓サンプルからモザイク像を取り込み、ボックスカウント法によりフラクタル解析を行った(図 1)。その結果、いずれの系でも OTC モザイク像はフラクタル次元について値 1.5 をもつことが明らかとなった。各再生系の再生途上におけるモザイク像も同様に解析したが、フラクタル次元 1.5 を示した。これらの結果は、肝再生系では、前駆細胞増殖がおこるとされる系もふくめ、肝細胞の増殖パターンはフラクタルの性質をもち、肝細胞の娘細胞の配置は肝内の構造に対し定方向性はなくランダムにおこることを示している。

ラットキメラを用いた、部分肝切除による肝再生系では、そのモザイクパターンはフラクタル次元として値 1.35 を有するとの報告もあるが、本研究の解析データはこのデータとは一致しなかった。ラットキメラの場合もそのモザイクパターンはフラクタル次元をもつため、肝再生過程で肝細胞はランダムに娘細胞を配置すると考えられるが、これは異なる 2 系統を用いるキメラ動物に固有の問題かもしれない(2 系統の細胞間の接着性[親和性]が、同種の場合と異なる可能性がある)。モザイクパッチ(2 種類の細胞が混じり合うキメラ/モザイクパターンにおける片方の細胞の集合塊)を構成する細胞間の接着性[親和性]が、異なるタイプの細胞間のそれに比べて高いと、フラクタル次元の数値は小さくなるので、ラットの場合はキメラ個体を解析に用いたために、用いられた 2 系統間で細胞の親和性が異なった可能性がある。

実際に、2 種類の細胞を増殖させ、そのモザイクパターンのコンピュータシミュレーションを行った。細胞の中心同士の距離が近いときは斥力、離れているときは引力が作用すると仮定し、2 種類の細胞を比率 50% で割り当て、500 個までランダムに 3 次的に増殖させた。このモデルで得られる 2 次元平面でのモザイクパターンは 1.5 のフラクタル次元をもった。一方、ラットキメラで推察されたタイプの異なる細胞間での接着性を同タイプのそれに比べ低く設定してコンピュータシミュレーションを行うと、フラクタル次元は 1.35 となり、ラットキメラの報告値に一致した。この結果は、ラットキメラにおけるモザイクパターンでは 2 系統由来の肝細胞の接着性が異なることを示唆している。

研究代表者の用いたモザイクマウスにおいて、その再生過程で得られるモザイクパターンが、等価な 2 種類の細胞タイプのコンピュータシミュレーションと同じフラクタル次元値をもつことは、肝細胞の増殖パターンは肝細胞以外の細胞との相互作用にはあまり依存しないことも示唆している。研究代表者らのグループが用いたコンピュータシミュレーションは組織形成を数理科学的に解析する上で、重要なツールになると期待される。

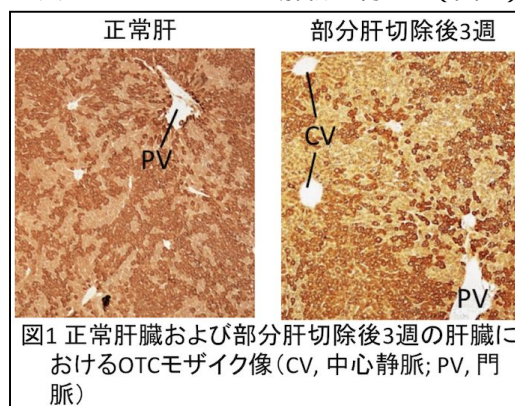


図1 正常肝臓および部分肝切除後3週の肝臓におけるOTCモザイク像(CV, 中心静脈; PV, 門脈)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

塩尻信義・太田考陽 (2019) 脊椎動物における肝臓構築の多様性と進化. **肝細胞研究会ホームページ「研究交流」** (<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu49.html>). 査読有

Fukuda, T., Fukuchi, T., Yagi, S. and Shiojiri, N. (2016) Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse. *Exp. Anim.*, 65, 135-146. 査読有 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/65/2/65_15-0082/_article]

〔学会発表〕(計 3 件)

伊藤昌幸・小池亨・佐藤信一・塩尻信義(2018) *spf-ash* ヘテロ型マウスを用いた種々の肝再生系における肝細胞増殖パターンの数理解析 第 25 回肝細胞研究会(東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール・東京) 7月 12-13 日

福地智一・山本太一・野口民夫・塩尻信義(2018) 肝臓特異的 *Hhex* 欠失マウス肝臓における嚢胞発生に関わる遺伝子ネットワークの解析 第 25 回肝細胞研究会(東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール・東京) 7月 12-13 日

吉井亮裕・塩尻信義(2016) 三次元培養系を用いたマウス胎仔肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化メカニズムの解析 平成 28 年度日本動物学会中部支部大会(静岡大学大学会館・静岡市) 9月 11 日

〔図書〕(計 2 件)

塩尻信義(2018) 排出機能—その進化は環境適応の鍵である. 『動物学の百科事典』(日本動物学会編、丸善出版)、pp354-355.

塩尻信義他編著(2019) 『発生生物学～基礎から応用への展開～』、培風館、pp1-169.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

塩尻・小池研究室ホームページ

<http://liverlovers95.wix.com/shiojiri-koike-lab>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 昌幸

ローマ字氏名：ITO, Masayuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。