

令和元年5月31日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08716

研究課題名(和文)成熟肝細胞が示す分化可塑性の組織再生への寄与および癌化との関係の解明

研究課題名(英文)The lineage plasticity of mature hepatocytes during liver injury and regeneration

研究代表者

谷水 直樹 (Tanimizu, Naoki)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00333386

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)：慢性的肝障害や急性劇症肝炎モデルにおいて、肝上皮細胞が分化可塑性を示すことを見出した。肝臓発生・再生・疾患における肝上皮細胞の分化可塑性の変化とその生理的意義を明らかにすることを目的に研究を行った。急性劇症肝炎モデルでは、加齢によって肝細胞の分化可塑性が低下し生存率が低下した。肝細胞および胆管上皮細胞の分化可塑性が、Notchシグナルの活性化と転写因子Grhl2の作用によって制御されていることを見出した。また、化学発癌モデルの肝細胞癌形成の初期段階でSOX9(+)肝細胞が観察されたことから、腫瘍形成の過程で、肝細胞の脱分化が関与している可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝疾患形成過程において肝細胞の脱分化が組織保護に寄与している可能性を見出した。また、NotchシグナルとGrhl2が協調して、肝上皮細胞の分化可塑性を制御することが明らかになった。NotchシグナルやGrhl2の活性を制御することで、障害時に出現する内在性の肝前駆細胞から肝細胞への分化をコントロールし、肝組織再生の促進に活用できる可能性がある。また、腫瘍形成初期に現れるSOX9(+)肝細胞を解析することで、肝細胞が癌化する際の初期に現れる変化を明らかにできる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We focus on the lineage plasticity of hepatocytes and cholangiocytes during development and regeneration. After acetaminophen administration, SOX9(+) dedifferentiated hepatocytes appeared around the necrotic area, which was suppressed in aged livers. Given that the survival of mice was remarkably decreased, hepatocyte de-differentiation could be correlated with the protection of liver tissue. When hepatocytes were introduced with the intracellular domain of Notch 2 and Grhl2, they transdifferentiated into CK19(+) cholangiocyte-like cells after chronic injury. On the other hand, Grhl2 null cholangiocytes isolated from chronically injured liver differentiated into hepatocytes in vitro. Furthermore, we found that part of hepatocyte express SOX9 during formation of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine. Since SOX9 expression was observed before foci formation, de-differentiation could be involved in the early stage of tumorigenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：肝臓 再生 肝細胞 分化可塑性 脱分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性的に肝臓が障害されると、肝細胞の増殖が抑制され肝幹・前駆細胞(Liver stem/progenitor cell 以下 LPC と略)が活性化されて、肝臓を構成する 2 種類の上皮細胞である肝細胞と胆管上皮細胞に分化し、組織が修復されると考えられてきた。ところが、最近の研究によって、LPC は障害に対する組織保護には重要な働きをするが、肝細胞への分化能は低く、組織修復への寄与は極めて限定的であるが示された (Espanol-Suner, Gastroenterology, 2012, Tanimizu et al. JCS 2013, Tanimizu et al. Development 2014)。一方、慢性障害肝において、肝細胞が脱分化して前駆細胞化し、再生に寄与することが示された (Yanger et al Gene Dev 2013, Tarlow et al. Cell Stem Cell 2014, Tanimizu et al. JBC 2014)。これらの結果は、成熟肝細胞が終末分化した細胞ではなく、高い分化可塑性を有していることを示している。障害肝臓に出現した肝前駆細胞は高い増殖能を示すだけでなく、*in vitro* および *in vivo* において非常に効率よく成熟肝細胞に分化する。したがって、肝前駆細胞は *Ex vivo* での機能的肝細胞の大量作出の元となり、疾患組織で肝前駆細胞の増殖や機能的分化を促すことであれば、組織再生を補助・促進できる可能性がある。しかしながら、肝細胞の脱分化・増殖・再分化などを制御する分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞の分化可塑性に依存した組織修復システムの解明

慢性障害肝臓から Sox9(+)*CD24(-)*および Sox9(+)*CD24(+)*前駆細胞を分離して、成熟肝細胞および胆管上皮細胞と比較し、肝前駆細胞の分化状態を明らかにするとともに、脱分化・再分化のプロセスを解析する。

(2) 肝細胞の分化可塑性の制御メカニズムの解明

Sox9(+)*CD24(-)*前駆細胞をラットに免疫して前駆細胞に特異的なモノクローナル抗体を作製する。In vitro 培養系を用いて増殖あるいは肝細胞分化を促進する作用を持つ抗体を同定する。最終的には、肝障害を受けたマウス体内で前駆細胞を活性化し、再生を促す方法を検討する。

(3) 肝細胞の癌化の初期段階に關与する遺伝子の探索

癌化の引き金となる分子メカニズムについて明らかにすることも目標とする。Diethylnitrosamine (DEN)投与肝細胞癌誘導モデルから Sox9(+)*CD24(-)*肝細胞を分離し、Microarray 解析を行うことにより、再生肝臓から分離した Sox9(+)*CD24(-)*肝細胞との比較を行う。

3. 研究の方法

肝前駆細胞が肝再生に寄与するためには、肝細胞としての Lineage を保つことが必要である。肝細胞の分化可塑性を制御する機構としては、Notch シグナルなどが報告されているが、前駆細胞への脱分化と再分化、胆管上皮細胞への分化転換の抑制の詳細なメカニズムは不明である。障害肝臓に出現する Sox9(+)*CD24(-)*肝前駆細胞は、脱分化の程度により *CD24(-)*細胞と *CD24(+)*細胞に分画できる (図 3)。成熟肝細胞および胆管上皮細胞との比較して脱分化の過程と分化状態を決定する分子機構を解明することで『肝細胞の分化可塑性に依存した肝細胞供給システムの解明』に取り組む。また、Sox9(+)*CD24(-)*肝前駆細胞に対する抗体を作製し、『生体内で肝前駆細胞の増殖・分化を制御する』ことを目指した。一方、癌形成モデルと再生肝で出現する Sox9(+)*CD24(-)*肝細胞の比較を行い、『肝細胞の癌化の初期段階に關与する分子の同定』を試みた。

(1). 肝細胞の分化可塑性に依存した組織修復システムの解明

① 肝再生における Sox9(+)*CD24(-)*肝前駆細胞の役割の検討

アセトアミノフェン投与急性肝障害モデルにおいて、SOX9(+)*CD24(-)*肝細胞の誘導効率の変化と肝障害の重症度の関連を解析する。また、DDC-diet 投与モデル肝臓において、SOX9(+)*CD24(-)*肝細胞の誘導効率の変化と肝障害の重症度および障害を除いた後の再生の関係を解析する。

② SOX9(+)*CD24(-)*肝細胞の増殖分化能の制御機構

Sox9(+)*CD24(-)*肝細胞で上昇していることが示された分子について、Sox9(+)*CD24(+)*細胞での発現上昇を確認する。In vitro の肝前駆細胞の培養を用いた解析を行う。

(2) 肝上皮細胞の分化可塑性の制御機構

① 肝細胞の分化可塑性についての解析

肝細胞に N2ICD と Grhl2 を導入し、脱分化および胆管上皮細胞への分化転換を検討する。

② 胆管上皮細胞の分化可塑性の解析

Grhl2 KO マウスを用いて、胆管上皮細胞から肝細胞への分化転換を誘導するために必要な条件を検討する。

(3) 肝細胞脱分化と肝細胞の癌化の関連性の解析

① 肝細胞癌のもととなる細胞の分離

癌形成初期の細胞を得るため、DEN 投与 2～3 か月の肝臓から FACS を用いて Sox9(+)肝細胞を分離する。In vitro において増殖能の検討を行った。

② ヒト肝癌組織の解析

ヒトの肝細胞癌患者の組織を解析し、SOX9(+)細胞の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞の脱分化と肝障害の解析

8W および 80W マウスにアセトアミノフェンを投与して急性劇症肝炎を誘導したところ、80W マウスのおよそ半数のマウスが投与後 48 時間以内に死亡した(図 1)。p16 の発現上昇、Foxm1b の発現低下などにより細胞増殖が抑制されていた(図 2)。APAP 投与により一過性に酸化ストレスが誘導されるため、還元型グルタチオン(GSH)の量が低下する。8W マウスでは APAP 投与後 24 時間以内に血中 GSH が正常値に回復していたが、80W マウスでは GSH が低下したままで酸化ストレスが持続していた。8W マウスでは、中心静脈周囲の肝細胞 Necrosis 領域を囲むように肝細胞から脱分化した SOX9(+)肝細胞が出現していた。一方、80W マウスでは SOX9(+)肝細胞の数が減少していた。肝細胞は脱分化によって Cyp 関連遺伝子の発現が低下することから、8W マウスでは肝細胞脱分化によって APAP による毒性に対する耐性を獲得し、組織の保護に寄与している可能性が考えられた。

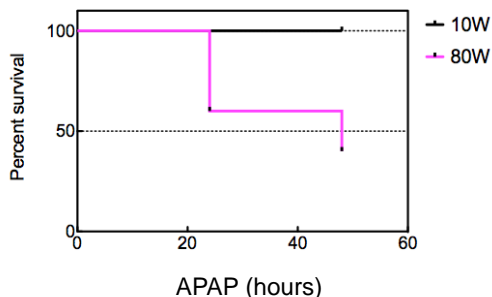


図 1. アセトアミノフェン投与後の生存率

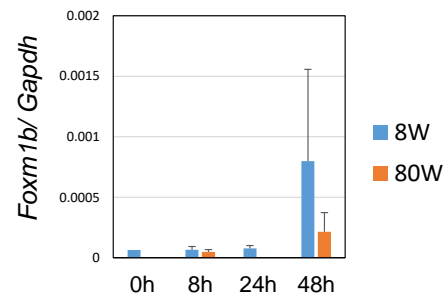


図 2. 肝細胞増殖に関与する Foxm1b の誘導

(2) 肝細胞の分化可塑性の制御

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi)を用いて肝細胞に Notch 細胞内ドメイン (活性化型) を導入すると肝細胞の脱分化が誘導されることがわかっていた。脱分化肝細胞を分離し、In vitro において転写因子 Grhl2 を導入すると、胆管上皮細胞への分化が誘導されることがわかった。そこで、HTVi 法を用いて N2ICD と Grhl2 を導入した際に、肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換が誘導されるかを検討した。しかしながら、肝細胞に胆管上皮細胞マーカーは誘導されなかった。そこで、遺伝子導入後に 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC) diet を与えて、慢性肝障害を誘導した。その結果、遺伝子導入されて GRHL2(+)となった肝細胞において CK19 が誘導されていた(図 3)。さらに、胆管上皮細胞様の細胞形態に変化している細胞も存在した。遺伝子導入後に、choline-deficient ethioine supplemented (CDE) diet を与えても、肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換は誘導されなかった。

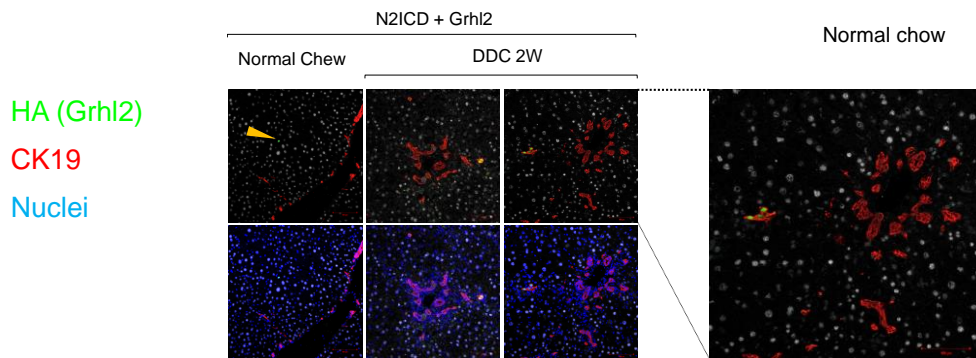


図 3. Grhl2 発現と慢性肝炎による肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換の誘導

肝上皮細胞の分化可塑性の制御における Grhl2 の機能を明らかにするために、肝臓特異的なノックアウトマウスを作成した。マウスは正常に発生した。Grhl2 のターゲットである Claudin4 が胆管上皮細胞で低下していたことから、バリア機能の変化があることが予想された。そこで、DDC-diet を与えるあるいは胆管結紮を行い、胆汁うっ滞を伴う慢性肝障害の影響を検討した。しかしながら、Grhl2LKO での障害の悪化は認められなかった。次に、胆管上皮細胞の分化能の変化について検討を行った。健常マウスから分離した細胞については、野生型、Grhl2LKO 細胞ともに肝細胞への分化は誘導されなかった。一方、CDE-diet を与えて慢性肝障害を負荷したマウスから EpCAM(+)肝細胞を分離したところ、Grhl2LKO 細胞は肝細胞への分化能を示した。胆管上皮細胞は新生仔期には肝細胞への分化能を持つが、成体になるとそのような能力を失う。Grhl2 は肝細胞への分化を抑制することがわかっている。今回の結果は、Grhl2 の阻害効果に加えて、発生過程で胆管上皮細胞の肝細胞への分化を阻害する変化が起こっていることを示している。

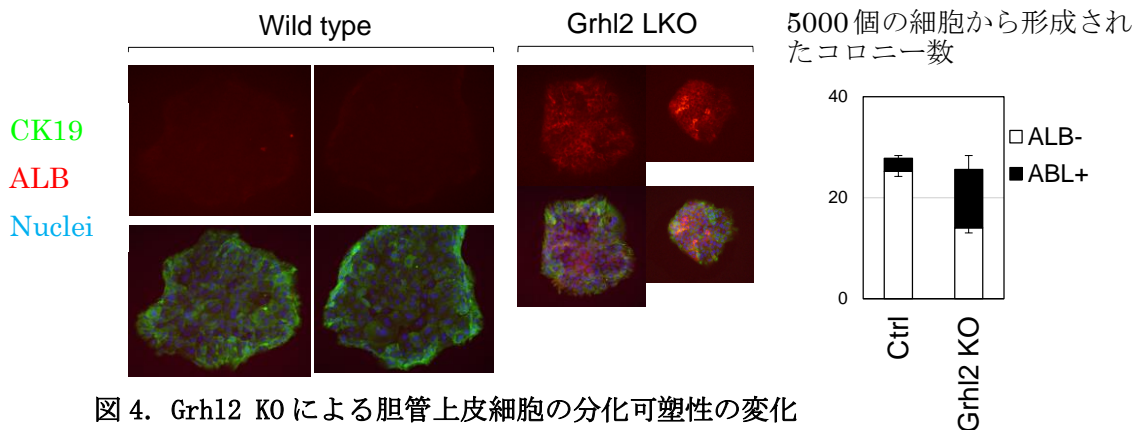


図 4. Grhl2 KO による胆管上皮細胞の分化可塑性の変化

(3) 肝細胞癌と肝細胞脱分化

肝細胞癌は、高分化型から低分化型へ変化すると悪性度が増すことから、成熟肝細胞が起源となっている可能性がある。マウスに DEN を投与して肝細胞癌を誘導したところ、腫瘍の Foci が確認できるより早く、SOX9(+)に変化している肝細胞が出現していることがわかった。また、DEN 投与後 3～4 ヶ月の腫瘍では多くの細胞が SOX9(+)出会ったのに対して、6 ヶ月で形成されている肝細胞癌では、一部の細胞に SOX9 の発現は認められたが、大部分の細胞は SOX9(-)であった。一方、ヒトの肝細胞癌患者の組織においても SOX9 の発現が誘導されていることも明らかになった。以上の結果から、肝細胞癌の形成過程では、マウス・ヒトともに成熟肝細胞の脱分化が関与していることが明らかになった。

DEN 投与後 2～3 週間後のマウスの肝臓から SOX9(+)肝細胞の分離を試みた。しかしながら、FACS 解析において、SOX9(+)肝細胞を確認することはできなかった。今後、細胞の分離方法などを再検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計7件）

- ① Tanimizu N. Isolation of Bipotential Liver Progenitor Cells from Neonatal Mouse Liver. *Methods Mol Biol.* 2019;**1905**:9-17.
- ② Tanimizu N. Identification and In Vitro Expansion of Adult Hepatocyte Progenitors from Chronically Injured Livers. *Methods Mol Biol.* 2019;**1940**:267-273.
- ③ Ichinohe, N., Ishii, M., Tanimizu, N., Kon, J., Yoshioka, Y., Ochiya, T., Mizuguchi, T., Hirata, K., Mitaka, T. Transplantation of Thyl1-positive cells accelerates liver regeneration by enhancing the growth of small hepatocyte-like progenitors via IL17RB signaling. *Stem Cells* 2017, 35, 920-931
- ④ Tanimizu, N., Ichinohe, N., Yamamoto, M., Akiyama, H., Nishikawa, Y., and Mitaka, T. Progressive induction of hepatocyte progenitor cells in chronically injured liver. *Sci. Rep.* 2017, 7, 3990
- ⑤ Tanimizu N. *, Ichinohe N, Ishii M, Kino J, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes in vitro and repopulate liver tissue. *Stem Cells*, 2016, 34, 2889-2901

〔学会発表〕（計23件）

- ① 谷水 直樹 「Ex vivoにおける肝臓の3次元組織構造の再構築とその応用」、2019年度日本農芸科学学会大会シンポジウム「食品機能研究の新時代～ex vivo, in vitro培養系にて生体機能を再現する～」、2019年3月24～27日、東京農業大学、東京都
- ② 谷水直樹、市戸義久、三高俊広。「Ex vivoにおける肝臓の上皮組織構造の再構築」第18回日本再生医療学会総会シンポジウム「Ex vivoでの機能的な肝組織の再構築」、2019年3月21～23日、神戸国際会議場、神戸市
- ③ 谷水 直樹 「障害肝臓における肝前駆細胞の誘導機構の解明」 第91回日本生化学会大会、2018年9月24日～26日、京都国際会館、京都市
- ④ 谷水直樹、三高俊広。「NGFを介した肝内胆管と自律神経ネットワークの相互作用」第25回肝細胞研究会 シンポジウム（1）「肝臓構築のための基盤整備」、2018年7月12日～13日、東京大学伊藤謝恩ホール、東京都
- ⑤ Naoki Tanimizu and Toshihiro Mitaka. “Interactions between intrahepatic bile ducts and autonomic nerves in developing and regenerating liver” FASEB SRC Fundamental Biology and Pathophysiology of the Liver, June 10-15, 2018, Scottsdale, Arizona, USA
- ⑥ 谷水直樹、市戸義久、三高俊広。「肝機能向上を目指した肝前駆細胞の培養条件の検討」第17回日本再生医療学会総会、2018年3月21～23日、パシフィコ横浜、横浜市
- ⑦ 谷水直樹、三高俊広。「肝臓の上皮細胞の分化可塑性の制御機構」Conbio2017 ワークショップ「多様な臓器再生機構の解明～肝臓を対象とした基礎・臨床からのアプローチ」、2017年12月6日～9日、神戸ポートピアホテル、神戸
- ⑧ 谷水直樹、三高俊広。「肝細胞のHeterogeneityと分化可塑性の制御機構」第24回肝細胞研究会 シンポジウム1 「肝再生と肝幹細胞～肝再生における肝細胞機能と組織修復」、2017年6月30日～7月1日、旭川市民文化会館、旭川市
- ⑨ 谷水直樹、三高俊広 「肝障害・再生過程において肝細胞が示す分化可塑性の制御機構の解明」JDDW2016、2016年11月3日～6日、神戸コンベンションセンター、神戸
- ⑩ 谷水直樹、三高俊広 「肝細胞の分化可塑性に依存した肝組織再生機構の解明」第89回日本生化学会大会、2016年9月25日～27日、仙台国際センター、仙台

〔図書〕（計1件）

Tanimizu, N “Development and Regeneration of Intrahepatic Bile Ducts” Leon V. Berhardt, Ed.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：肝細胞と胆管上皮細胞の接続部構造を有する肝上皮組織の培養方法

発明者：谷水直樹、三高俊広

権利者：北海道公立大学法人札幌医科大学

種類：特許

番号：特願 2019-52282

出願年：平成 31 年 3 月 20 日

国内外の別： 国内

[その他]

ホームページ等

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門

<https://www.smu-tisdevreg.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三高 俊広

ローマ字氏名：Mitaka Toshihiro

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：フロンティア医学研究所組織再生学部門

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50231618

※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。