

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21106

研究課題名(和文)新規オルガノイド培養法による肝芽細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis on molecular mechanisms regulating fetal liver stem cells, hepatoblasts, by using a novel organoid culture system

研究代表者

今城 正道 (Imajo, Masamichi)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00633934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎生期の肝臓幹細胞(肝芽細胞)の制御機構とその破綻が肝芽腫をもたらす機構の解明を目指した。独自の肝芽細胞培養法を用いた実験により、Hippo経路のエフェクター分子YAPの活性化が長期増殖能を、 β -カテニンの活性化はWnt非依存性を、またYAPと β -カテニン両方の活性化はIGF-1の誘導を介して増殖因子非依存性を賦与することが分かった。さらに免疫不全マウスへの移植実験により、YAPと β -カテニンに加えてc-Mycの活性化により腫瘍が形成されることが示された。以上の結果は、肝芽細胞の制御機構と肝芽腫の発生機構の一端を解明するものであり、今後の肝芽腫の治療法の研究に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal mechanisms regulating fetal liver stem cells, hepatoblasts, and also to understand how disturbance of such mechanisms leads to the childhood liver cancer, hepatoblastoma. By using a newly developed in vitro culture method of hepatoblasts, we found that activation of the Hippo pathway effector, YAP, confers long-term self-renewal ability on hepatoblasts, while activation of β -catenin promotes Wnt signaling-independent growth of hepatoblasts. Activation of both YAP and β -catenin induced expression of IGF-1, thereby promoting growth factor-independent survival and proliferation of hepatoblasts. Moreover, transplantation of cultured and genetically modified hepatoblasts showed that simultaneous activation of YAP, β -catenin, and c-Myc induces formation of hepatoblastoma-like tumors in immunodeficient mice. These results identify novel mechanisms regulating hepatoblast cell fate and suggest that disturbance of the mechanisms leads to hepatoblastoma.

研究分野：細胞生物学

キーワード：肝芽細胞 肝芽腫 幹細胞 Hippoシグナル Wntシグナル オルガノイド培養法

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝芽細胞 (Hepatoblast) は胚発生の過程で肝臓に一過的に出現し、肝細胞と胆管上皮細胞の両方を生み出す胎児期の幹細胞である。高い増殖能を持ち、損傷を受けたマウス肝臓に移植すると再生に寄与することから、人工的に誘導された肝芽細胞の再生医療への応用が検討されている (Li et al., *Gastroenterology*, 139: 2158-2169 (2010))。また、肝芽細胞は小児性肝臓がんである肝芽腫の起源細胞であり、肝芽細胞の増殖や分化を制御する機構の解明は医学的な観点からも重要な意義を持っている。

(2) 肝芽細胞の培養法については、幾つかの報告があった (Tanimizu et al., *J. Cell Sci.* 117: 6425-6434 (2004); Takayama et al., *Stem Cell Rep.* 1: 322-325 (2013))。けれども、それらの方法はフィーダー細胞の使用や本来の性質 (増殖能や遺伝子発現状態) が徐々に損なわれるなどの欠点があり、肝芽細胞の培養法は確立されていない状況であった。また、肝芽細胞に特異的なマーカー遺伝子 (Dlk1 等) は他の組織でも発現しており、マウス遺伝学を用いて肝芽細胞特異的に遺伝子を改変することも困難であった。このような背景から、肝芽細胞を制御する機構の研究は進んでおらず、成体の肝幹細胞の研究と比較しても立ち遅れていた。

本研究代表者らは、他組織のオルガノイドの培養技術に習熟しており、その技術を応用することで肝芽細胞の培養を試みた。様々な試行錯誤の結果、数種類の増殖因子と阻害剤の組み合わせにより、マトリゲル中で肝芽細胞が効率良く増殖する条件を決定した。増殖した肝芽細胞はマーカー遺伝子の発現パターンを保持し、一ヶ月以上にわたり継代可能であった。そこで本研究では、この新しい培養方法を用いて、肝芽細胞を制御する分子機構を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した肝芽細胞の培養法を用いて、この細胞の増殖と分化を制御する機構を解明することを目的とした。さらに解明された制御機構の異常が小児性肝臓がんである肝芽腫の発生や進行にどのように関わるか明らかにするとともに、治療法の開発に有用なマウスモデルを構築することを目指した。

3. 研究の方法

上記のように、本研究代表者らはこれまでの研究で肝芽細胞の培養法を独自に開発していた。この方法では、マウス胚から単離した肝芽細胞をマトリゲルに包埋し、GSK3 阻害剤、TGF 受容体阻害剤、FGF10、Insulin などを含んだ培地で培養する。この方法により、一月以上の長期間に渡って肝芽細胞を培養することが出来る。本研究ではまず、この方法

で培養した肝芽細胞に様々な増殖因子やサイトカイン、生理活性物質などを投与し、肝芽細胞への増殖や分化に与える影響を調べた。また、レンチウイルスベクターを用いて様々な遺伝子をノックダウンもしくは恒常的に活性化し、肝芽細胞の運命に与える影響を解析した。さらに遺伝子操作した肝芽細胞を免疫不全マウスの肝臓に移植し、腫瘍形成能の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) まず初めに、培養環境下において肝芽細胞の運命を制御する分子の同定を試みた。そのために、肝芽腫において高頻度に活性化や変異が認められる分子に注目し、機能解析を行った。今回用いた培養法では、肝芽細胞は一月を過ぎた頃から徐々に細胞老化を起し、増殖を停止する。しかしながら、Hippo 経路のエフェクター分子である YAP を活性化させると、この細胞老化が抑制され、半年以上の長期間にわたり増殖可能であることが分かった。すなわち、YAP の活性化は肝芽細胞に長期増殖能を賦与すると考えられる。

この作用に加えて、我々は YAP の活性化が NF- κ B 経路の阻害を介して炎症性サイトカインの分泌を抑制することを見出している。YAP のこの機能が肝芽細胞において果たす役割は現在のところ不明であるが、他の様々な組織の細胞でも同様の現象が起きることを見出しており、重要な生理的意義のある現象ではないかと考えている。この点については、今後さらなる解析が必要である。

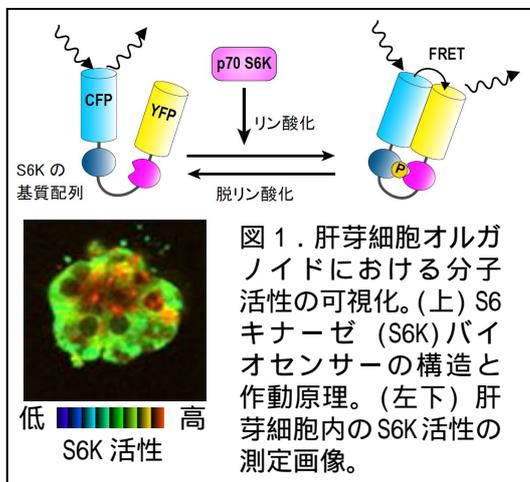
(2) 次に、肝芽腫において高頻度に遺伝子変異による恒常的な活性化が見られる β -catenin の機能を検討した。その結果、変異型 β -catenin の発現により、肝芽細胞が GSK3 阻害剤非依存的に増殖可能になることが示された。今回用いた培養法では GSK3 阻害剤は Wnt 経路を活性化するための使用しており、 β -catenin の活性化により Wnt 経路の恒常的な活性化が模倣されたため、肝芽細胞の GSK3 阻害剤要求性が低下したと考えられる。

肝芽細胞における YAP や β -catenin の機能解明が進んだ一方、以前の論文で肝芽細胞における機能が報告されていたものの本研究ではその機能を再現できなかった分子も存在した。例えば、BMP やレチノイン酸は肝芽細胞の増殖を促進することが報告されていたが、今回の実験ではそのような作用は確認できなかった。これまでの研究の多くはマウス初期胚を用いた研究に基づいていることから、肝芽細胞以外の細胞を介した間接的な影響や肝芽細胞が発生する以前に生じた表現型の影響を見ている可能性があると考えている。また、レチノイン酸については増殖因子-ERK 経路の活性化がレチノイン酸受容体の活性を抑制することを見出しており (Imajo et al., *Mol. Cell. Biol.* 37: e00012-17 (2017))、今回の研究では培養に

使用した多量の増殖因子の作用のためにレチノイン酸の影響が観察できなかった可能性がある。これらの可能性については、今後の研究の課題である。

(3) 上記 1 および 2 の実験では、YAP と β -catenin の単独での作用を明らかにした。一方で YAP と β -catenin の両方を同時に活性化させると新たにもう一つの作用を発揮することを見出した。すなわち、YAP と β -catenin の両方が活性化した肝芽細胞は増殖因子要求性が低下し、培地から増殖因子 (Insulin, FGF10) を除いても生存し、増殖した。そこで、YAP と β -catenin が何らかの増殖因子の発現を誘導することで、肝芽細胞の生存と増殖を促進しているのではないかと考え、遺伝子発現解析を行った。その結果、YAP と β -catenin の活性化が IGF-1 の発現を誘導すること、それにより細胞の増殖を促進することが明らかになった。

(4) 次に、YAP と β -catenin によって誘導された IGF-1 が、実際に下流のシグナル伝達経路を活性化しているか解析した。通常オルガノイド培養法は細胞の大量培養に向かず、ウェスタンブロッティングなどの生化学的解析が困難である。そこで、蛍光バイオセンサーを用いた生体イメージングの手法により、IGF-1 経路の下流で活性化すると予想される S6 キナーゼ (S6K) の活性を測定することを試みた。その結果、肝芽細胞オルガノイドにおいて単一細胞レベルで S6K の活性を可視化することに成功した (図 1 参照)。この解析により YAP と β -catenin 両方の活性化は IGF-1 の誘導を介して、S6K を活性化することが示された。従って、YAP と β -catenin はこれらの作用を介して、肝芽細胞の増殖因子非依存的な増殖を促進すると考えられる。また、今回用いたオルガノイドのイメージング技術は、他の様々な分子、組織に応用可能であり、今後の生命科学研究において有用な研究手法になることが期待される。実際に、研究代表者らは腸オルガノイドにおいて、細胞増殖に重要な役割を果たす ERK の活性を単一細胞レベルの解像度で経時的に観察するこ



とに成功している (Muta et al., Nature Commun. (2018) in press)。このように本研究課題では、もともとの主目的ではないものの、今後のオルガノイド研究にとって技術的に重要な知見も得られた。

(5) YAP や β -catenin の活性化は高頻度に肝芽腫で観察されることが報告されている。そこで、培養下で YAP や β -catenin を活性化させた肝芽細胞を免疫不全マウスの肝臓に移植し、腫瘍形成を誘導するか検討した。その結果、YAP と β -catenin の活性化だけでは腫瘍は形成されなかったが、さらに c-Myc も同時に活性化すると効率良く腫瘍が形成された (図 2 参照)。この c-Myc については、培

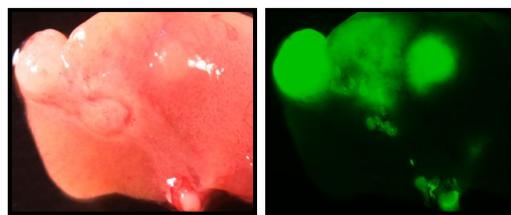
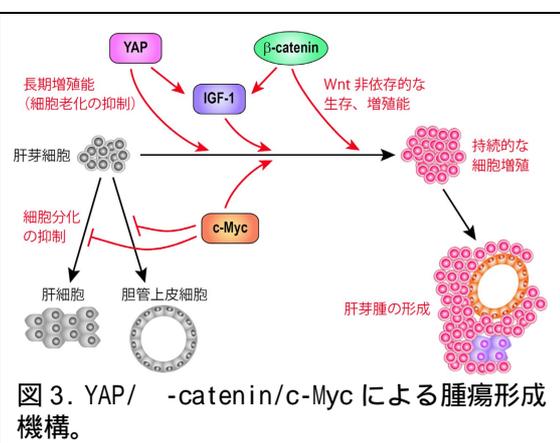


図 2. YAP/ β -catenin/c-Myc を発現する肝芽細胞 (GFP を共発現) により形成された腫瘍。左: 明視野、右: GFP 蛍光像。

養環境下において肝芽細胞の分化を抑制することを見出しており、腫瘍細胞の未分化性の維持に寄与しているものと考えられる。形成された腫瘍内には肝芽細胞様の細胞に加えて、肝細胞様および胆管上皮様の細胞が混在していた。様々な細胞型の混在は肝芽腫の特徴の一つであり、形成された腫瘍は実際の肝芽腫との類似性を示唆している。

以上のように、本研究により YAP/ β -catenin/c-Myc の 3 因子が肝芽細胞の運命制御や肝芽腫の形成に重要な役割を果たすことが明らかになり、またそれぞれの因子の果たす役割も示された (図 3 参照)。また、今回の研究で確立された 3 因子の導入による腫瘍形成法は肝芽腫の研究に新しいマウスモデルを提供するものであり、今後の肝芽腫の分子機構と治療法の研究に寄与することが期待される。



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 6 件)

(1) Yu Muta, Yoshihisa Fujita, Kenta Sumiyama, Atsuro Sakurai, Makoto M. Taketo, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno, Kazuhiro Aoki, Michiyuki Matsuda, Masamichi Imajo*. Composite regulation of ERK activity dynamics underlies tumour-specific traits in the intestine. *Nature Commun.* (2018) in press (査読有)

(2) Yumi Konagaya, Kenta Terai*, Yusuke Hirao, Kanako Takakura, Masamichi Imajo, Yuji Kamioka, Norio Sasaoka, Akira Kakizuka, Kenta Sumiyama, Tomoichiro Asano, Michiyuki Matsuda. A highly sensitive FRET biosensor for AMPK exhibits heterogenous AMPK responses among cells and organs. *Cell Reports* 21, 2628-2638 (2017) (査読有)

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.113

(3) Masamichi Imajo*, Kunio Kondoh, Takuya Yamamoto, Kei Nakayama, May Nakajima-Koyama, Eisuke Nishida. Antagonistic Interactions between Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase and Retinoic acid Receptor Signaling in Colorectal Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00012-17 (2017) (査読有)

DOI: 10.1128/MCB.00012-17

(4) Takuya Hiratsuka, Takeshi Sano, Hisashi Kato, Naoki Komatsu, Masamichi Imajo, Yuji Kamioka, Kenta Sumiyama, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Michiyuki Matsuda*. Live imaging of extracellular signal-regulated kinase and protein kinase A activities during thrombus formation in mice expressing biosensors based on Förster resonance energy transfer. *J. Thromb. Haemost.* 15, 1487-1499 (2017) (査読有)

DOI: 10.1111/jth.13723

(5) Shunsuke Kon, Kojiro Ishibashi, Hiroto Katoh, Sho Kitamoto, Mihoko Kajita, Susumu Ishikawa, Hajime Yamauchi, Yuta Yako, Tomoko Kamasaki, Tomohiro Matsumoto, Hirotaka Watanabe, Riku Egami, Ayana Sasaki, Atsuko Nishikawa, Ikumi Kameda, Takeshi Maruyama, Yoshiteru Sasaki, Ryosuke Enoki, Sato Honma, Hiromi Imamura, Masanobu Oshima, Tomoyoshi Soga, Jun-ichi Miyazaki, Toshiro Sato, Michael Duchon, Takanobu Shirai, Shinya Tanaka, Rika

Narumi, Tomoko Morita, Jin-Min Nam, Yasuhito Onodera, Shingo Yoshioka, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, Masamichi Imajo, Eisuke Nishida, Yoichiro Fujioka, Yusuke Ohba, Yasuyuki Fujita*. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nature Cell Biol.* 19, 530-541 (2017) (査読有)

DOI: 10.1038/ncb3509

(6) Yoshihisa Okuchi, Masamichi Imajo, Rei Mizuno, Yuji Kamioka, Hiroyuki Miyoshi, Makoto Mark Taketo, Satoshi Nagayama, Yoshiharu Sakai, Michiyuki Matsuda*. Identification of Aging-Associated Gene Expression Signatures That Precede Intestinal Tumorigenesis. *PLOS ONE.* 11: e0162300 (2016) (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0162300

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 今城正道, 牟田優, 松田道行. 炎症応答の制御における Hippo 経路の新たな役割と分子機構の解明. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 6~9 日, 神戸ポートアイランド, ポスター発表

(2) Masamichi Imajo, Yu Muta, Michiyuki Matsuda. Novel role of Yes-associated protein as a regulator of inflammation. The EMBO Workshop (The Hippo pathway across species and disciplines), 2017 年 10 月 25~29 日, Rome, Italy, ポスター発表

(3) 今城正道, 牟田優, 松田道行. 炎症性シグナルの制御における Hippo 経路の新たな役割と分子機構の解明. 第 69 回細胞生物学会大会, 2017 年 6 月 13~15 日, 仙台国際センター・会議棟, 口頭発表

(4) 今城正道, 松田道行. 新規オルガノイド培養法を用いた肝芽腫発生機構の解析. 第 68 回細胞生物学会大会, 2016 年 6 月 15~17 日, 京都テルサ, 口頭発表

〔その他〕

雑誌論文と学会発表の一覧は研究代表者所属大学のホームページにて公開されている。
(<https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/hQ1mT>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今城 正道 (IMAJO, Masamichi)
京都大学・生命科学研究所・助教
研究者番号: 00633934

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし