

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18590171

研究課題名 (和文) 肝初期発生における肝芽細胞分化および肝芽組織形成過程の分子機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the early liver morphogenesis during the embryonic period.

研究代表者

仲谷 和記 (NAKATANI KAZUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60295699

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：発生・分化、細胞・組織、解剖学、細胞間結合、組織化学、微細形態学

### 1. 研究計画の概要

本研究は肝臓の初期発生過程における肝芽細胞分化と肝芽組織形成の分子機構の一端を、組織化学的・微細形態学的手法を用いた解析により明らかにすることを目的とする。胚胎における肝臓の前駆組織は、心臓中胚葉の影響下で前腸の腹側内胚葉上皮より分化した肝芽細胞によって形成される。肝芽細胞に分化した内胚葉上皮細胞は、横中隔間充織に侵入し、横中隔内に肝芽組織を形成するが、その過程でシート状の構造を改変し、基底膜構造を一部破壊して横中隔内に侵入し、細胞遊走を行うといった、上皮-間葉移行現象に類似する現象が起こっていることが推測されている。本研究では、肝芽細胞が横中隔間充織に侵入・遊走し、上皮組織である肝芽組織を再構築する過程を解析する。

### 2. 研究の進捗状況

上皮-間葉移行現象では、上皮細胞で広く発現する E カドヘリンの発現が著名に減弱することが報告されている。本研究においても発現を検討し、横中隔に遊走する肝芽細胞で発現が著名に減弱し、肝芽組織が再構成されると再び発現が増強していた。

カドヘリンは接着結合に関与する分子であり、微細形態学的観察により、遊走している肝芽細胞は互いに接着結合を始めとする細胞間結合を維持していることが明らかとなったので、他のカドヘリン類として N カドヘリンの発現を検討し、肝芽細胞に分化した細胞に N カドヘリンが発現することを明らかにした (肝芽細胞に分化していない前腸の上皮細胞には発現しない)。

他の細胞接着分子としてインテグリン類を

検討し、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現を確認したが、他のインテグリン ( $\alpha 3, 4, 6, \beta 4, 5$  など) の染色は得られなかった (抗体の組織染色適合性の低い場合を含む)。

また、細胞間接着装置に関連する分子として Z0-1、クラウディン、オクルーディン、コネクシンの発現を検討したが、Z0-1 とコネクシン 32 以外の染色は得られなかった。

肝芽細胞が横中隔に侵入するには、基底膜構造を一部破壊することが必要であると想定し、基底膜成分のラミニン等を分解する事が報告されている、マトリックスメタロプロテナーゼ 2, 3, 9, 14 の発現を検討したが、有意な染色が得られなかった。

現在は細胞間結合に焦点を絞って、組織化学的・微細形態学的検討を継続している。

### 3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(理由)

肝芽細胞に N カドヘリンが発現することは、発見当初、他に報告がなく、また、成体の肝細胞でも発現報告はなかった。そのため、肝初期発生過程だけではなく、胎児期・新生児期を通じて発現を検討し、発現強度に差はあるものの、発生過程を通じて発現することを明らかにした。また、成体肝においても中心静脈周囲を中心として成熟肝細胞に発現が確認できたため、肝線維化モデルや肝再生モデルでの検討を加えて論文を執筆すべく準備していたところ、他のグループが論文を掲載した (Doi Y, et al. Hepatol Res 37(3), 230-237, 2007) ため、実験計画の大幅な修正を余儀なくされた。

#### 4. 今後の研究の推進方策

細胞間結合に関連する分子の細胞内局在を明らかにし、肝芽細胞における機能を確認するため、免疫電顕の手法を用いて解析を進めているが、標的分子の抗原性を維持しながら、微細形態観察に堪える組織構造を維持することが難しく、現在、胚胎全体に免疫組織化学染色を施す（whole mount immunohistochemistry: WM-IHC）方法を応用した、pre-embedding法の確立を進めている。また、post-embedding法も合わせて検討している。現在は横中隔に遊走している時期の肝芽細胞の微細形態観察を行っているが、肝芽組織を再構成した後の微細形態についても解析を進めていきたい。観察する対象が細胞接着装置であるから、形態を出来るだけ保持するために固定方法の再検討が必要となる。

成体肝と同様に灌流固定法を行うのが理想的であるが、手技的に難しい事と、臍帯静脈より灌流した場合、灌流圧により組織構造が変形する場合があるため、それに代わる固定法の開発が必要となる。

#### 5. 代表的な研究成果

（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8件）

① Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Pathology* (査読あり) 170; 967-980, 2007.

② Nakatani K, Tanaka H, Ikeda K, et al. Expression of NCAM in the activated portal fibroblasts during regeneration of the rat liver after partial hepatectomy. *Archives of Histology and Cytology* (査読あり) 69; 61-72, 2006.

〔学会発表〕（計3件）

① 仲谷和記. 肝線維芽細胞系研究の概説: 組織化学的解析を中心に. 第104回日本解剖学会総会・学術集会 シンポジウム. 平成21年3月30日. 岡山理科大学(岡山).

② Nakatani K, Sakabe M, Nakajima Y. Dynamic changes of expression of molecules related to the epithelial-mesenchymal transition in the early phase of liver development. 7th Joint Meeting of the Japanese Society of Histochemistry and Cytochemistry and the Histochemical Society. Aug 23-26, 2006, Waikoloa (HI).

〔図書〕（計2件）

① Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Seki S. Expression of molecules with a potential for modulating interaction with extra-cellular matrices on hepatic stellate cells: neural cell adhesion molecules and osteonectin. In: *Trends in Liver Cirrhosis Research* (Dillon KH. ed), Nova Science Publishers, Inc. (NY): pp. 89-127, 2007.