

平成22年5月29日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890229

研究課題名（和文） 肝幹前駆細胞の運命決定における制御機構の解明

研究課題名（英文） Analyses of cell fate determination in fetal hepatoblast

研究代表者

及川 恒一 (OIKAWA TSUNEKAZU)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20514491

研究成果の概要（和文）：肝幹前駆細胞は肝細胞と胆管上皮細胞の両方に分化できる能力を持ち合わせているが、この二方向性分化の運命決定を制御する詳細なメカニズムは不明である。転写因子 *Sall4* は胎児発生や器官形成、ES 細胞の未分化性維持や分化に重要な役割を果たすことが知られている。われわれは今回、肝幹前駆細胞における *Sall4* の発現・機能解析から *Sall4* が肝幹前駆細胞の肝細胞分化を抑制する一方で胆管上皮細胞分化を促進し、肝幹前駆細胞の二方向性運命決定に重要な役割を担う可能性を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Fetal hepatoblasts differentiate into both hepatocytes and cholangiocytes. The precise molecular mechanisms regulating this lineage commitment remain unknown. *Sall4* has been shown to be among the regulators of embryogenesis, organogenesis, maintenance of pluripotency, and early embryonic cell fate determinations in ES cells. We here provide their first description in hepatoblasts. *Sall4* plays a key role in regulating the lineage segmentation of hepatoblasts, not only inhibiting their differentiation into hepatocytes, but also driving their differentiation toward cholangiocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：幹細胞・再生医療・分化

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は恒常性の維持に必須の臓器であり、代謝、生合成、解毒など機能は多岐にわたる。発生初期において、前腸内胚葉後端の前腸門領域の gut endoderm cell が、前腸に隣接する心臓中胚葉の fibroblast growth factor (FGF) と横中隔由来の bone morphogenetic protein (BMP) の刺激によって、肝幹前駆細胞へと分化する (Rossi et al. *Genes Dev*, 2001, Jung et al. *Science*, 1999). 最近の研究から Dlk, Liv2, E-cadherin, EpCAM 等が肝幹前駆細胞の細胞表面マーカーとして同定されている。低密度培養系などを用いた解析によって、Dlk<sup>+</sup>肝幹前駆細胞が高い増殖能および肝細胞と胆管上皮細胞の両方に分化できる二分化能を併せ持つことが知られている (Tanimizu et al. *J Cell Sci*. 2003). 胎生中期から後期にかけてほとんどの肝幹前駆細胞は成熟肝細胞へ分化する一方で、門脈周囲のごく一部の肝幹前駆細胞が胆管上皮細胞へ分化していく。胎生 13-14 日くらいに胆管特異的なサイトケラチン陽性の肝幹前駆細胞が出現し、それらが門脈周囲に並ぶことが胆管への分化の最初のステップとして考えられている。その後、一層の ductal plate と呼ばれる構造が形成され、その一部が二層の管腔構造をとり、将来的な胆管となる。最近、Activin/TGFβ (Clotman et al. *Genes Dev*. 2005), Notch-Jagged (Tanimizu et al. *J Cell Sci*. 2004, Kodama et al. *Gastroenterology*. 2004) や Wnt/β-catenin (Decaens et al. *Hepatology*. 2008) シグナル経路が成熟肝細胞胆管細胞への分化に関与することが報告されているが、この二方向の分化制御の分子メカニズムについて不明な点が多岐にわたる。将来的な肝細胞移植または肝幹前駆細胞移植や創薬研究の応用のためにも、肝幹前駆細胞の分化メカニズムの解明は重要である。そこで肝幹前駆細胞における二方向性分化の運命決定を制御する分子機構を明らかにするため、われわれは今回ジクフィンガー蛋白質 Sall14 に注目した。

## 2. 研究の目的

Sall1 は哺乳類では少なくとも 4 種類 (Sall1 ~4) が知られ、ショウジョウバエからヒトまで広く保存されている。Sall1 ファミリーの一つである Sall14 は、ES 細胞では Nanog と結合し Oct4 の発現を制御することで多分化能の維持や分化決定を行う regulator として働くこと、Sall14 ノックダウン ES 細胞は trophectoderm lineage へ分化する一方、Sall14 強制発現 ES 細胞では primitive endoderm lineage への分化が促進される (Elling et al. *PNAS*, 2006, Zhang et al. *Nat Cell Bio*, 2006). つまり、Sall14 は ES 細胞において未分化性の維持および分化運命決定を行う分子として重要な役割を果たしている。Sall14 ノックアウトマウスの解析では、ヘテロマウスの大半は正常に生育・繁殖するものの、一部に直腸や脳の奇形、発育遅延が確認されている。ホモマウスは胎児致死であり、エピブラスト (原始外胚葉：多能性幹細胞集団) 由来の組織に著しい形態的異常を来たす (Sasaki-Yumoto et al. *Development* 2006). Sall14 は初期発生に重要な機能を担う分子であると考えられるが遺伝子欠損マウスが初期の胎生致死であるため、各臓器での細胞分化に関する知見は得られていなかった。そこで、本研究では特に胎生期の肝臓に注目し、肝幹前駆細胞における Sall14 の関与を解析し肝発生のメカニズムを解明することを目標とした。

## 3. 研究の方法

まず胎生期マウス肝臓由来 Dlk<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> 肝幹前駆細胞を fluorescence activated cell sorting (FACS) で分離し、Sall14 遺伝子発現を RT-PCR で解析した。次に Magnetic cell sorter (MACS) によって分離した胎生 14 日マウス肝臓由来 Dlk<sup>+</sup> 肝幹前駆細胞の Sall14 遺伝子をウイルスを用いることで強制発現またはノックダウンし、肝細胞分化または胆管分化を誘導し in vitro 培養を行った。また MACS 分離した胎生 14 日マウス肝臓由来 Dlk<sup>+</sup> 肝幹前駆細胞の Sall14 遺伝子を強制発現し、4, 4'-diaminodiphenylmethane (DAPM) 投与に

より胆管障害を惹起した KSN ノードマウスへ移植することで in vivo での胆管分化能を解析した。

#### 4. 研究成果

FACS を用いて胎生中期マウス肝臓由来  $D1k^+ CD45^- Ter119^-$  肝幹前駆細胞と  $D1k^- CD45^+ Ter119^+$  血球細胞を分離し, *Sall14* 遺伝子発現を RT-PCR で解析したところ, *Sall14* は  $CD45^+ Ter119^+$  血球細胞分画にも認められたが,  $D1k^+ CD45^- Ter119^-$  肝幹前駆細胞でさらに強い発現を認めた. *D1k* は胎生後期以降では発現が消失していくため肝幹前駆細胞のマーカーとして使用しにくいことから, 細胞接着による分離法により肝細胞を分離し, 胎生後期肝臓の *Sall14* 発現を解析した. 胎生 14 日以降, *Sall14* の発現は肝発生が進むにつれて徐々に減少し, 成体の肝細胞では全く発現は認められなかった.

マウス胎児肝幹前駆細胞を in vitro で IL-6 サイトカインファミリーに属する Oncostatin M (OSM) や細胞外マトリクスで刺激することで, 肝細胞の分化・成熟を誘導可能であることが報告されている. この培養系において MACS を用いて分離した胎生 14 日マウス肝臓由来  $D1k^+$  肝幹前駆細胞にレトロウイルスを用いて *Sall14* 遺伝子を強制発現し 7 日間培養すると, 形態的また肝成熟化遺伝子 tyrosine aminotransferase (TAT), tryptophan-2, 3-deoxygenase (T0), carbamoyl phosphate synthetase (CPS) 等の発現が有意に減少し, 肝細胞への分化が顕著に抑制されることがわかった. 一方で胆管特異的マーカー遺伝子である cytokeratin19 (CK19), CK7 の発現は有意に増加した. また in vitro で胆管上皮細胞への分化を誘導する系としてコラーゲン包埋培養が過去に報告されている. このコラーゲン包埋培養において *Sall14* 遺伝子の強制発現することで, 胆管上皮細胞に発現する CK19<sup>+</sup> 胆管様樹枝状構造の数および大きさが顕著に増加した. ウェスタンブロット解析から, *Sall14* 強制発現により Akt や ERK のリン酸化が誘導された. また *Sall14* 遺伝子を強制発現した肝幹前駆細胞由来の胆管様樹枝状構造の数は PI-3K 阻害剤や MEK1 阻害剤で有意に抑制された. 一方で *Sall14* 遺伝子をノックダウンすることで, これらの胆管様樹枝状構造形成が有意に減少した.

さらに肝幹前駆細胞の in vivo における胆管への分化能を解析するため, DAPM 投与によ

り胆管障害を惹起した KSN ノードマウスへ肝幹前駆細胞を移植した. *Sall14* 遺伝子を強制発現した群において CK19 陽性の胆管への分化能の増強が確認された.

これらの結果から *Sall14* は肝幹前駆細胞の肝細胞への分化を抑制する一方で胆管上皮細胞への分化を促進し, 肝幹前駆細胞の 2 方向性の分化決定に重要な役割を担う可能性が示唆され, 将来の肝疾患に対する細胞移植療法への応用に有用であると考えられた.

本研究において, われわれは肝幹前駆細胞の二方向性分化における新たな知見を示した. 特に肝幹前駆細胞から胆管上皮細胞への分化制御メカニズムは依然として不明な点が多い. 肝幹前駆細胞の分化決定を制御する分子メカニズムの詳細な解析は, 単に肝発生の機構を探る生物学的意義だけでなく, 肝幹・前駆細胞の細胞移植療法への応用面での寄与も十分に期待でき, 今後の展開が期待される.

#### 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 1 件)

① Tsunekazu Oikawa, Akihide Kamiya, Sei Kakinuma, Mikio Zeniya, Ryuichi Nishinakamura, Hisao Tajiri and Hiromitsu Nakauchi. *Sall14* Regulates Cell Fate Decision in Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Gastroenterology*, 136:1000-1011, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① 及川恒一, 銭谷幹男, 中内啓光  
ジंकフィンガータンパク質 *Sall14* によるマウス肝幹・前駆細胞の肝/胆管細胞への分化制御機構 第 16 回日本消化器関連学会週間東京 グランドプリンスホテル新高輪 10 月 1-4 日 2008 年

② Tsunekazu Oikawa, Akihide Kamiya, Sei Kakinuma, Mikio Zeniya, Ryuichi Nishinakamura, Hiromitsu Nakauchi and Hisao Tajiri.  
*Sall14* Regulates Cell Fate Decision in Fetal Hepatoblasts. The 59th Annual Meeting of the American Association for Study of the Liver Diseases, Moscone West

Convention Center, San Francisco, CA,  
U.S.A, October 31-November 4. 2008

③ 及川恒一, 紙谷聡英, 柿沼晴, 銭谷幹男,  
西中村隆一, 中内啓光, 田尻久雄  
胎児由来肝幹・前駆細胞の胆管細胞分化過程  
におけるジンクフィンガータンパク質 Sal14  
の関与 第 16 回肝細胞研究会 山形テルサ  
6月26-27日 2009年

④ 及川恒一, 田尻久雄, 中内啓光  
マウス肝幹前駆細胞の胆管細胞分化過程に  
おけるジンクフィンガータンパク質 Sal14 に  
よる制御機構 第 17 回日本消化器関連学会  
週間 京都国際会議場 10月14-17日 2009  
年

〔図書〕 (計 1 件)

① 及川恒一, 紙谷聡英, 中内啓光  
ジンクフィンガー蛋白質 Sal14 による肝幹・  
前駆細胞分化決定の制御機構, 分子消化器病  
学, Vol. 6, No. 3, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

及川 恒一 (OIKAWA TSUNEKAZU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20514491