

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590426

研究課題名（和文）肝細胞の細胞管化生の in vivo における証明およびそのメカニズムの研究  
 研究課題名（英文）Ductular metaplasia of hepatocytes: its demonstration in vivo and the study of the mechanism

研究代表者

西川 祐司（NISHIKAWA YUJI）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90208166

研究成果の概要（和文）：Alb<sup>Cre/WT</sup>ROSA26R マウス肝細胞（β-galactosidase 陽性）を C56BL/6J マウス肝に移植する肝細胞追跡系を用い、CCl<sub>4</sub>や DDC などの肝傷害部において、肝細胞が胆管上皮細胞に分化転換することを証明した。また、JNK の上流キナーゼである MKK7 をノックアウトしたマウス肝細胞（MKK7<sup>fl/fl</sup>Alb<sup>Cre/WT</sup>）はコラーゲンゲル内での樹枝状形態形成が対照肝細胞（MKK7<sup>fl/+</sup>Alb<sup>Cre/WT</sup>）と比べ、弱いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To demonstrate transdifferentiation of hepatocytes to bile ductular cells in vivo, we established a hepatocyte-lineage tracing system, in which hepatocytes from Alb<sup>Cre/WT</sup>ROSA26R (β-galactosidase-positive) were transplanted into the livers of C56BL/6J mice. In chronic liver injury induced by CCl<sub>4</sub> or DDC in these mice, we often found β-galactosidase-positive and cytokeratin 19-positive ductules, demonstrating that ductular transdifferentiation actually occurs in vivo. In addition, we found that hepatocytes from MKK7 KO mice (MKK7<sup>fl/fl</sup>Alb<sup>Cre/WT</sup>) showed less prominent branching morphogenesis as compared with those from control mice (MKK7<sup>fl/+</sup>Alb<sup>Cre/WT</sup>).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：肝細胞，胆管上皮細胞，慢性肝傷害，細胆管反応，分化転換，JNK - c-Jun 経路

## 1. 研究開始当初の背景

種々の原因による傷害肝において、細胆管構造が異常に増加する現象が観察される。この現象は細胆管反応（ductular reaction）と総称され、通常、定型的（typical）および非定型的（atypical）の2つに分類されている。前者は急激な胆道閉鎖でみられる比較的規則正しい細胆管の増加であり、既存の肝内胆

管の増殖である可能性が高い。後者は線維化を伴う慢性肝疾患（慢性肝炎、肝硬変など）でみられる不規則な形状の細胆管増生で、ときに肝組織の大部分を置換するほど進行する。多くの研究者は、非定型的細胆管反応が成熟肝に少数存在する肝幹細胞が再生性に増殖したものであるとみなしている。しかし、これに関する実験的な証拠は乏しく、実証さ

れたとは言い難い。一方、非定型細胆管反応で増生する細胆管と既存肝細胞との間に移行像がしばしば観察され、傷害後の線維化に伴って肝細胞が細胆管上皮細胞に化生する可能性が以前から指摘されてきた。

我々は、成熟した肝細胞が胆管上皮細胞に分化しうるかを検討するため、ラット肝細胞の凝集塊（スフェロイド）をコラーゲンゲル内で三次元培養する *in vitro* の肝線維化モデルを作製し、肝細胞は一旦成熟した後も、胆管上皮にきわめて類似した細胞に分化転換（*transdifferentiation*）しうることを証明した。以上の結果から成熟肝細胞は細胆管方向に分化する可塑性を保持していることが明らかになり、細胆管反応のメカニズムの1つとして肝細胞の細胆管化生を考慮すべきであることが示唆される。

## 2. 研究の目的

これまで *in vivo* において実際に肝細胞の細胆管化生が起こることは証明されていない。これを証明するためには、標識された肝細胞の形質変化を長期間にわたり追跡する新しい実験系を開発する必要がある。本研究の第一の目的は、Cre リポーターマウスである ROSA26R を用いた肝細胞追跡系を確立し、マウス肝傷害に伴う細胆管反応における成熟肝細胞の関与（細胆管化生）を検討し、我々の仮説を *in vivo* で検証することである。

肝傷害時に増加する炎症性サイトカインは肝細胞や胆管上皮細胞の分化、増殖に影響を与えると考えられる。我々は、三次元培養系における肝細胞の細胆管上皮への分化転換が TNF- $\alpha$  により著明に促進されることを見出した。この変化は JNK-c-Jun 経路の活性化を伴っており、ラット、マウス傷害肝における細胆管反応でも c-Jun の活性化が認められた。JNK は上流の2つのキナーゼ（SEK1/MKK4, MKK7）の支配下にあり、いずれかが欠損するとその活性化が強く抑制されることが知られている。本研究の第二の目的は、MKK7 の肝特異的ノックアウトの表現型を検討することである。

## 3. 研究の方法

(1) ラットおよびマウス肝細胞の三次元培養—肝を門脈からコラーゲナーゼで灌流し、肝細胞を分離し、プライマリア・ディッシュ上で培養し、凝集塊（スフェロイド）を形成させた後、I型コラーゲンゲル内に包埋した。一部の実験では門脈から digitonin を注入し、グリソン鞘および周囲組織を破壊した後、肝静脈からコラーゲナーゼ灌流を行い、小葉中心部肝細胞を採取した。培養は EGF および insulin を含む血清添加 Williams' E 培地で行い、継時的に細胞を採取し、RNA および蛋白を抽出し、それぞれ RT-PCR, Western blotting で各種細胞マーカーの発現を検討した。ラットの系では、コラーゲンゲル内で細

胆管へ分化転換した細胞をコラーゲナーゼ処理により回収し、マトリゲル上で無血清培養し、肝細胞に再分化させる実験を行った。

(2) 肝細胞の *in vivo* 追跡系の確立と肝傷害の誘導—ROSA26R マウス (Soriano, Nat. Genet 21:70-71, 1999) では、すべての細胞で遺伝子発現が起こる ROSA26 遺伝子座に  $\beta$  ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) 遺伝子が存在するが、この遺伝子の内部に loxP 配列にはさまれた短い断片が挿入されており、通常、 $\beta$ -gal の発現は完全に遮断されている。しかし、Cre リコンビナーゼが発現した細胞においては、この断片が切り出され、 $\beta$ -gal が恒常的に発現するようになる。実験には、①ROSA26R マウスの尾静脈から pCAGGS-Cre ベクターを急速注入し、肝細胞を  $\beta$ -gal 標識するモデル、②Tamoxifen 投与により transthyretin (TTR) 発現細胞に Cre が発現する TTR-CreTam マウスと ROSA26R マウスを掛け合わせた F1 に tamoxifen を投与するモデル、③アルブミン発現とともに Cre が発現する Alb-Cre マウスを ROSA26R マウスと掛け合わせた F1 から肝細胞を採取し、あらかじめ retrorsine 投与と部分肝切除を行った C57BL/6J マウス肝に移植するモデルを用いた。慢性肝傷害は四塩化炭素, thioacetamide (TAA), 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC), 総胆管結紮, lithogenic diet などにより誘導した。

## 4. 研究成果

(1) ラット肝細胞三次元培養系における肝細胞と胆管上皮細胞間の相互可塑性—ラット肝細胞スフェロイドをコラーゲンゲル内で TNF- $\alpha$  存在下で培養し、細胆管様に分化させた後にゲルから回収し、マトリゲル上で無血清培養を行うと、肝細胞形質が回復するが、特に dexamethasone および IL-6 (または oncostatin M) を添加した場合、肝細胞特有の形態も回復した (図1)。定量 PCR により、肝細胞形質の喪失と回復が確認された (図2)。また、cDNA マイクロアレイでの検討でも、コラーゲンゲル内で変化した mRNA 発現パターンがマトリゲル上培養で回復することが明らかになった。これらの結果は、肝細胞と胆管上皮の間に微小環境変化に応じた相互可塑性があることを示唆している。

図1 ラット肝細胞の胆管上皮への分化転換と再分化の *in vitro* モデル

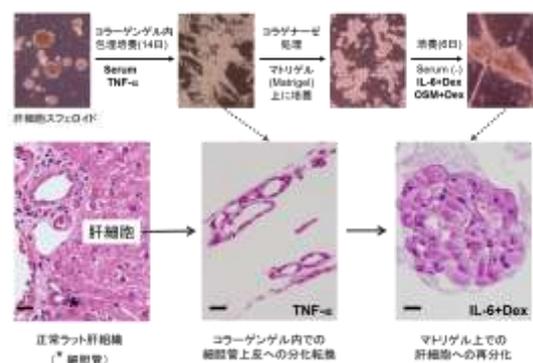
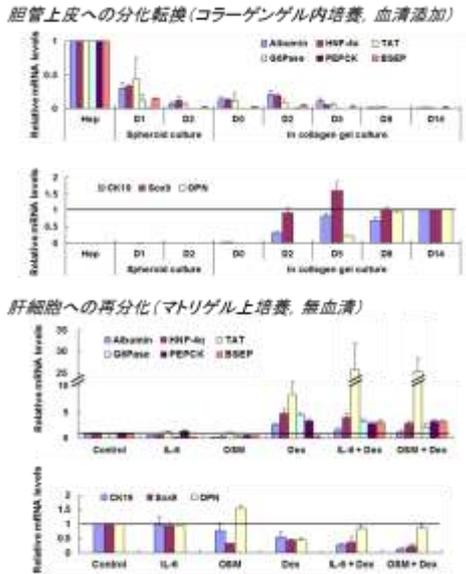
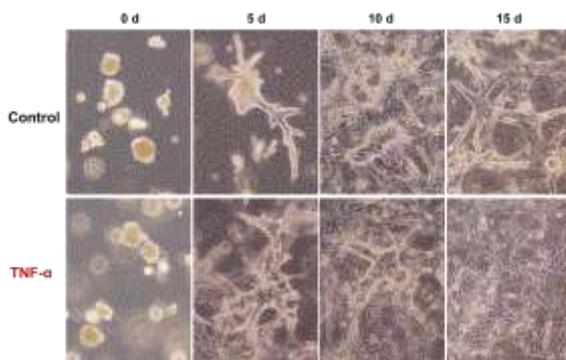


図2 ラット肝細胞培養系における各種マーカーの発現



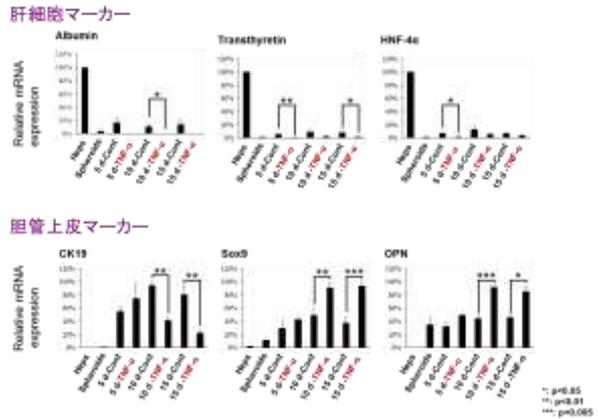
(2) マウス肝細胞の *in vitro* における細胆管への分化転換—正常マウス肝細胞を分離し、スフェロイドを形成させた後、コラーゲンゲル内に包埋し、培養すると、ラットと同様に、胆管様の樹枝状管腔形成が誘導された(図3)。この変化は albumin, transthyretin, HNF-4αなどの肝細胞マーカーの消失と胆管上皮のマーカーである cytokerin 19 (CK19), Sox9, osteopontin (OPN)の発現を伴っていた(図4)。一方、肝幹細胞マーカーである delta-like の発現は認められなかった。また、これらの変化は、ラット肝細胞と同様、TNF-αにより促進された。Digitonin 処置肝から得られた小葉中心部肝細胞を用いても上記とまったく同様の結果が得られた。これらの結果は、マウス肝細胞も *in vitro* において胆管上皮方向に分化転換することを示している。

図3 コラーゲンゲル内培養マウス肝細胞の形態変化



(3) *In vivo* 肝細胞追跡系①: Cre 発現ベクター急速静注法—ROSA26R マウス尾静脈から Cre 発現ベクターを急速に静注すると、肝細胞が特異的に β-gal 標識された。これらの動物に、四塩化炭素, TAA, DDC 食などで慢性肝傷害を惹起し、細胆管反応を誘導し、X-gal と CK19 を同時に染色したところ、

図4 培養マウス肝細胞の遺伝子発現変化 (qRT-PCR)

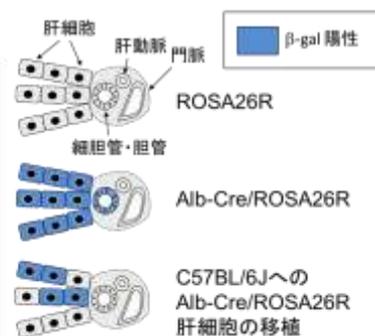


CK19 陽性細胆管を構成する上皮細胞のごく一部に X-gal 陽性所見が認められた。しかし、この方法は肝細胞の標識効率が数%にとどまるため、肝細胞追跡系としては不十分と考えられた。

(4) *In vivo* 肝細胞追跡系②: TTR-CreTam マウス—TTR-CreTam マウスと ROSA26R マウスと掛け合わせ、tamoxifen で Cre 発現を誘導した。肝組織の X-gal 染色で、10%程度の肝細胞に陽性所見が確認されたが、小葉間胆管の一部も陽性となることが判明した。したがって、本モデルは DDC や総胆管結紮などゾーン1で細胆管反応が起こる傷害での検討には使えないが、四塩化炭素や TAA によるゾーン3の細胆管反応の検討には有効である。実際、四塩化炭素, TAA による傷害に伴い増生した細胆管の一部に X-gal 陽性所見が認められ、細胆管反応に肝細胞が関与することが明らかになった。

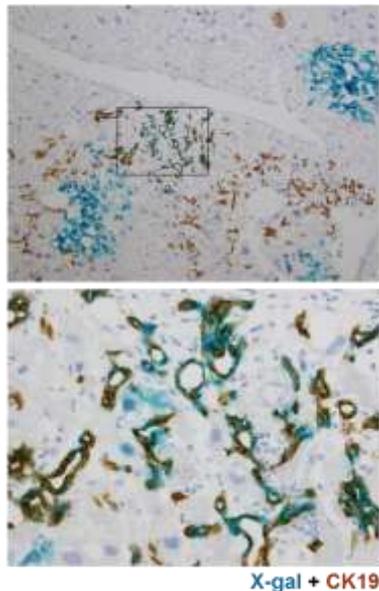
(5) *In vivo* 肝細胞追跡系③: β-gal 陽性肝細胞移植モデル—Alb-Cre/ROSA26R マウスの肝細胞 (β-gal 陽性) を分離し、C57BL/6J マウス肝内に移植する実験で、レシピエントに正常肝細胞の増殖を抑制する retrorsine を投与し、移植直前に部分肝切除を行った場合に、生着した肝細胞が大小のコロニーを形成した(図5)。

図5 *In vivo*肝細胞追跡系 (β-gal陽性肝細胞移植モデル)



このモデルでは retrorsine, 肝切除による肝傷害による軽度の細胆管反応が起こっており, 増生した細胆管の一部に明瞭な X-gal 陽性所見が認められた. さらに, 四塩化炭素, TAA, DDC による肝傷害を与えたところ, いずれにおいても線維化を伴う細胆管反応の一部に X-gal 陽性所見が確認された. 特に四塩化炭素, TAA による肝傷害では, 細胆管反応は glutamine synthase 陽性の小葉中心部に起こっていた (図 6).

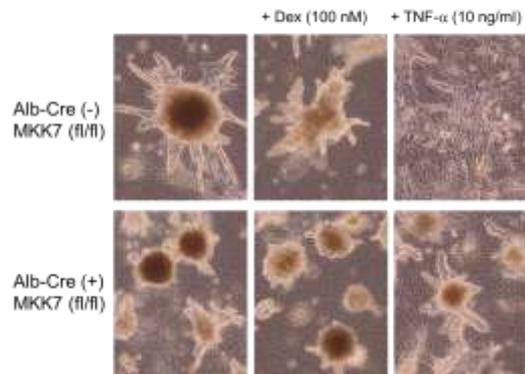
図6 In vivoにおける肝細胞の細胆管化生(慢性CCl<sub>4</sub>傷害)



移植に用いる肝細胞分画内の胆管上皮細胞や肝幹細胞の混入を完全に防ぐために, digitonin を門脈から注入し, 門脈周囲組織を死滅させた後に下大静脈からコラゲナーゼ灌流を行い, 小葉中心部の肝細胞を選択的に採取して, 移植に用いた. 移植が成立した個体においては, 四塩化炭素, TAA, DDC, lithogenic diet による肝傷害で出現する CK19 陽性の細胆管反応に X-gal 陽性像が確認された. また, 頻度は少ないが, DDC や総胆管結紮においても, 一部の細胆管に X-gal 陽性所見が認められた. 以上の結果から, in vivo においても肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換が起こりうるということが明確に証明された.

(6) *MKK7* ノックアウトの肝細胞の細胆管上皮への分化転換に対する影響—Alb-Cre/*MKK7*(fl/fl)マウスから採取した肝細胞はコラーゲンゲル内での樹枝状形態形成が対照細胞に比べ, 減弱しており, JNK-c-Jun 経路が形態形成に影響を与えることが示唆された (図 7). しかし, Alb-Cre/*MKK7*(fl/fl)マウスに種々の肝傷害刺激を加え, 肝病理組織像を対照マウスと比較検討し

図7 コラーゲンゲル内培養マウス肝細胞の形態変化に与える*MKK7*ノックアウトの影響



たが, 明瞭な違いは認められなかった. そこで, 成熟肝で肝細胞特異的な遺伝子組換えを起こさせ, *MKK7* ノックアウトの効果を検討するため, *Mx1-Cre* マウスを導入した. 予備実験の結果, *Mx1-Cre* においては, poly (I:C) 投与により肝細胞特異的に 100%近い効率で組換えを誘導できることが確認され, 現在, *MKK7*(fl/fl)との交配を進めている. また, *Mx1-Cre/ROSA26R* マウスを用いて, 肝傷害に伴う肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換を検討し, 肝細胞に由来する細胆管反応があることを示すデータが得られつつある.

本研究により, *ROSA26R* を用いたさまざまな肝細胞追跡系で, 肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換が in vitro のみならず, in vivo でも起こることが証明された. また, ラットの系で, 肝細胞と胆管上皮細胞の間に相互可塑性があることも示唆された. 現在, 肝細胞の胆管上皮への分化転換が実際に起こりうるかは, いまだ肝臓研究者の間で議論が続いており, 可能な限り早く, 今回得られた結果を論文として公表する予定である.

##### 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 3 件)

1. Nishikawa Y, Transdifferentiation of mature hepatocytes into bile duct/ductule cells within a collagen gel matrix, *Methods Mol. Biol.* 826:153-60, 2012  
DOI: 10.1007/978-1-61779-468-1\_13
2. 西川祐司, 肝臓病理学—細胆管反応をめぐる, *病理と臨床* 29:1263-1269, 2011
3. Inagaki M, Furukawa H, Satake Y, Okada Y, Chiba S, Nishikawa Y, Ogawa K, Replacement of liver parenchyma in albuminemic rats with allogenic hepatocytes is facilitated by intrabone marrow-bone marrow transplantation, *Cell Transplant.* 20:1479-891, 2011

doi.org/10.3727/096368910X547453

4. Kawasaki Y, Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Ishikawa K, Enomoto K, Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell population in human HuH7 hepatoma cells by enhancing its self-renewal. *Int J Cancer* 128:51-62, 2011

doi: 10.1002/ijc.25308.

5. Yoshioka T, Nishikawa Y, Ito R, Kawamata M, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Omori Y, Kotanagi H, Masuko T, Enomoto K, Significance of integrin  $\alpha 5$  and  $\text{erbB3}$  in enhanced cell migration and liver metastasis of colon carcinomas stimulated by hepatocyte-derived heregulin. *Cancer Sci* 101:2011-2018, 2010  
doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01640.x.

6. Yoshida M, Nishikawa Y, Yamamoto Y, Doi Y, Tokairin T, Yoshioka T, Omori Y, Watanabe A, Takahashi N, Yoshioka T, Miura I, Sawada K, Enomoto K, Mast cell leukemia with rapidly progressing portal hypertension. *Pathol Int* 59:817-822, 2009  
DOI: 10.1111/j.1440-1827.2009.02451.x

7. Nishikawa Y, Ohi N, Yagisawa A, Doi Y, Yamamoto Y, Yoshida M, Tokairin T, Yoshioka T, Omori Y, Enomoto K, Suppressive effect of orthovanadate on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Am J Pathol* 174:881-890, 2009

doi.org/10.2353/ajpath.2009.080261

[学会発表] (計 22 件)

1. 西川祐司, 曾根正行, 土井優子, 大森泰文, 吉岡年明, 梅津哉, 姜淑英, 内藤眞, 榎本克彦, 肝細胞および胆管上皮の分化における HNF-4 $\alpha$  アイソフォームのスイッチング, 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 平成 23 年 4 月 28-30 日

2. 永濱康晴, 曾根正行, 陳錫, 岡田陽子, 吉岡年明, 大森泰文, 榎本克彦, 西川祐司, 肝細胞追跡系を用いた肝細胞の細胆管化生の in vivo における証明, 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 平成 23 年 4 月 28-30 日

3. 西川祐司, 肺高血圧症による高度うっ血肝にみられた小葉中心性の細胆管反応—肝傷害に伴う細胆管反応の病理学的考察, 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 平成 23 年 4 月 28-30 日

4. 吉岡年明, 西川祐司, 山本洋平, 大森泰文, 南條博, 榎本克彦, 肝転移周辺部および傷害肝における肝細胞での heregulin 発現の検討, 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 平成 23 年 4 月 28-30 日

5. 永濱康晴, 曾根正行, 陳錫, 岡田陽子, 山本洋平, 吉岡年明, 大森泰文, 榎本克彦,

西川祐司, 成熟肝細胞由来の細胆管反応—肝細胞追跡系を用いた肝細胞の細胆管反応の証明, 第 18 回肝細胞研究会, 東京, 平成 23 年 6 月 24-25 日

6. 西川祐司, 陳錫, 永濱康晴, 岡田陽子, 四塩化炭素および DEN により誘導されたマウス肝癌の mRNA 発現プロファイルの検討, 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋, 平成 23 年 10 月 3-5 日

7. 吉岡年明, 西川祐司, 山本洋平, 大森泰文, 南條博, 榎本克彦, 肝転移および傷害肝における肝細胞での heregulin 発現の検討, 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋, 平成 23 年 10 月 3-5 日

8. 永濱康晴, 曾根正行, 陳錫, 岡田陽子, 榎本克彦, 西川祐司, 細胆管反応の細胞起源—マウス肝細胞追跡系を用いた検討, 第 44 回北海道病理談話会, 旭川, 平成 23 年 9 月 10 日

9. 今了資, 関智行, 松尾康博, 永濱康晴, 陳錫, 岡田陽子, 西川祐司, 肝癌における肝細胞形質と胆管細胞形質の異常発現, 第 44 回北海道病理談話会, 旭川, 平成 23 年 9 月 10 日

10. 曾根ら, 分化転換後の肝細胞形質回復における副腎皮質ホルモンとサイトカインの相互作用, 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 平成 22 年 4 月 27-29 日

11. 曾根正行, 西川祐司, 大森泰文, 吉岡年明, 榎本克彦, 胆管方向に分化転換した肝細胞の再成熟化, 第 17 回肝細胞研究会, 秋田市, 平成 22 年 6 月 18-19 日

12. 西川祐司, 曾根正行, 吉田正行, 大森泰文, 吉岡年明, 榎本克彦, 肝内・肝外胆管系の発生, 第 17 回肝細胞研究会, 秋田市, 平成 22 年 6 月 18-19 日

13. 曾根正行, 西川祐司, 大森泰文, 吉岡年明, 榎本克彦, 胆管上皮方向に分化転換した肝細胞の再成熟化, 第 17 回肝細胞研究会, 秋田市, 平成 22 年 6 月 18-19 日

14. 西川祐司, 永濱康晴, 藤井瑞恵, 蛋白チロシン脱リン酸化酵素阻害剤オルトバナジン酸のマウス肝発癌抑制効果に関する検討, 第 69 回日本癌学会総会, 大阪, 平成 22 年 9 月 22-24 日

15. 川寄洋平, 大森泰文, 西川祐司, 吉岡年明, 吉田正行, 石川和夫, 榎本克彦, 細胞質に局在する connexin 32 は HuH7 肝癌細胞において癌幹細胞の自己複製を促進する, 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 平成 21 年 5 月 1-3 日

16. 吉岡年明, 西川祐司, 大森泰文, 吉田正行, 川寄洋平, 曾根正行, 榎本克彦, 前立腺細胞における TRAIL 誘導アポトーシスに対する integrin  $\beta 4$  の役割, 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 平成 21 年 5 月 1-3 日

17. 曾根正行, 西川祐司, 大森泰文, 吉岡年

明, 吉田正行, 榎本克彦, 肝細胞の胆管上皮への形質転換: その可逆性および Kupffer 細胞由来サイトカインの影響, 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 平成 21 年 5 月 1-3 日

18. 西川祐司, 曾根正行, 大森泰文, 吉岡年明, 吉田正行, 榎本克彦, マウス肝傷害における細胆管反応の検討, 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 平成 21 年 5 月 1-3 日

19. 西川祐司, 曾根正行, 吉田正行, 大森泰文, 吉岡年明, 榎本克彦, マウス肝内・肝外胆管系の接合に関する発生的検討, 第 16 回肝細胞研究会, 山形, 平成 21 年 6 月 26-27 日

20. 曾根正行, 西川祐司, 大森泰文, 吉岡年明, 榎本克彦, 分化転換後の肝細胞形質回復に対する炎症性サイトカインの影響, 第 16 回肝細胞研究会, 山形, 平成 21 年 6 月 26-27 日

21. 西川祐司, 榎本克彦, 胆管系の発生と細胆管反応-肝細胞追跡系を用いた検討, つくば, 平成 21 年 7 月 31 日-8 月 1 日

22. Nishikawa Y, Sone M, Omori Y, Yoshioka T, Enomoto K, Stem cell-independent ductular reaction and carcinogenesis in the mouse liver, 第 68 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 1-3 日

[図書] (計 0 件)

[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

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/patholl/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 祐司 (NISHIKAWA YUJI)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90208166

(2)研究分担者

榎本 克彦 (ENOMOTO KATSUHIKO)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号: 20151988

大森 泰文 (OMORI YASUFUMI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 90323138

吉岡 年明 (YISHIOKA TOSHIAKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 80302264

(3)連携研究者

なし