

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02518

研究課題名（和文）ダイナミックに変貌する胆管の上皮組織構造を維持するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Studies on the mechanisms that ensure the biliary epithelial tissue integrity during the dynamic tissue remodeling process

研究代表者

伊藤 暢 (Itoh, Tohru)

東京大学・定量生命科学研究所・協力研究員

研究者番号：50396917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓は代謝における中心的な役割を担う臓器であり、高い再生能力を有しています。肝臓が種々の障害を受けると、内部にある胆管の組織構造がダイナミックに変化（リモデリング）し、これが肝臓の再生に寄与することが知られています。このような胆管リモデリングの誘導制御機構の解明を目的として、胆管に発現する転写因子Klf5に注目した解析を行いました。その結果、Klf5によって細胞外マトリクス構成分子の一種であるラミニンの発現が誘導され、これがリモデリング時における胆管組織の構造を安定に維持するために重要な役割を担うことを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの胆管リモデリングに関する研究は、もっぱら胆管周囲の組織・細胞からのシグナルによる細胞の「増殖」の制御機構に注目して進められてきました。本研究では、胆管組織に自律的なシグナル機構が「組織構造の維持」という新たな細胞機能を介して胆管リモデリングに重要な役割を担うことを初めて明らかにしました。胆管をはじめとする生体内の種々の管腔上皮組織の構造が適切に維持されるメカニズムについてはこれまでほとんど明らかにされておらず、こうした課題にアプローチするための新規かつユニークな解析プラットフォームを提供するものです。

研究成果の概要（英文）：Under various types of liver injury conditions, the intrahepatic biliary epithelial tissue forming the bile duct undergoes dynamic and adaptive structural transformation, also known as the biliary remodeling or the ductular reaction, which plays key roles in the organ regeneration and pathophysiology. In this research project, we aimed to clarify the regulatory mechanisms of the biliary remodeling in liver regeneration, with a particular focus on the biliary-enriched transcription factor Klf5. We have identified a novel cellular mechanism governed by the Klf5-Laminin axis whereby the biliary epithelial tissue maintains its integrity while undergoing unstable structural transformation during the biliary remodeling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：上皮管腔組織 胆管 組織リモデリング 肝再生 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、代謝や解毒、胆汁の分泌をはじめとする多彩な生理機能を担う、生体の恒常性維持に必須の役割を果たす臓器である。肝臓には腸管から門脈を介して多種多様な外来分子や薬物等が日常的に流入するため、肝臓はそれらの物質や代謝異常、ウイルス感染等に起因する様々な障害を受けやすい状況にあり、これに対抗するために高い再生能力を有している。こうした肝臓のもつ高い再生能力は古来より多くの学術的興味を集め、一世紀以上にわたり研究が行われてきた。その一方で、持続的・慢性的な肝障害の状況下では、こうした再生能力は破綻し、組織の線維化を通じて肝硬変や肝がんの発症へとつながる。肝臓の再生と病態の制御メカニズムを理解することは、種々の肝疾患の予防・診断・治療法の開発を進める上できわめて重要な課題である。

肝臓の中には、肝細胞が産生・分泌する胆汁を排出するための流路である「胆管」という上皮管腔組織が張り巡らされている。我々は以前に、独自の3次元組織構造解析手法をもちいた研究から、肝臓が様々な障害を受けた際に胆管の上皮組織の樹状構造の変化、すなわち「胆管リモデリング」が誘導されることを世界で初めて見出し、報告した(Kaneko et al., *Hepatology*. 2015)。胆管リモデリングは肝疾患の病態に適応する形で多彩な様式で誘導されており、障害を受けた肝組織の再生に寄与することが示唆された(Takase et al., *Genes Dev.* 2013; Kaneko et al., *Hepatology*. 2015; Kamimoto et al., *eLife*. 2016)。

こうした胆管リモデリングのもつ生理機能や肝再生における作用機序、その誘導・制御に関わるメカニズムの解明を目指して、我々はこれまで種々の解析に取り組んできた。その過程で、Krüppel-like factor 5 (Klf5) と呼ばれる転写因子が胆管で高発現していることを見出し、その機能解析を行った(Okada et al., *J. Biol. Chem.* 2018)。肝臓特異的 Klf5 遺伝子欠損マウスを作成して種々の肝障害モデルでの検討を行ったところ、胆汁うっ滞性の肝障害モデルにおいては Klf5 の欠損に伴い胆管の細胞増殖が抑制され、胆管の組織増生が阻害されることが明らかとなった。さらに、3次元組織構造解析の結果、Klf5 欠損マウスの障害肝では樹状組織構造の崩壊・断片化という興味深い現象が生じていることを見出した(図1)。これは、Klf5 が「組織構造の維持・安定化」という新たな生理機能にも重要な役割を担うことを示唆するものであった。

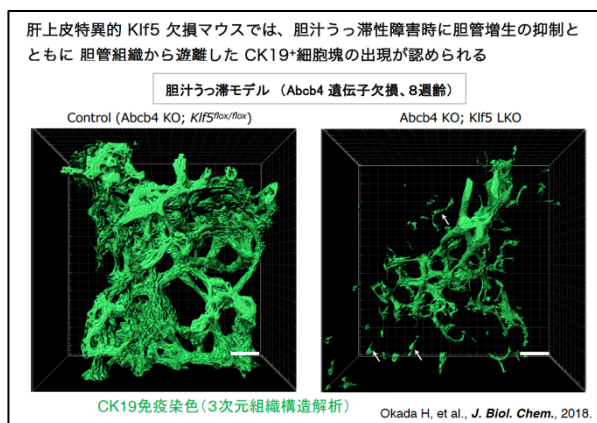


図1. Klf5 遺伝子欠損マウスで観察された胆管組織構造の崩壊

2. 研究の目的

生体組織が機能を発現するためには、秩序だった構造が安定に維持されることが不可欠である。組織構造維持のメカニズムの解明は、その破綻に起因する種々の疾患の発症機構や組織老化の仕組みを理解するうえで重要である。我々は、胆管リモデリングの過程において転写因子 Klf5 の機能欠損により胆管組織構造の崩壊が誘導されることを見出した。本研究課題では、こうした胆管組織の崩壊の過程を時系列を追って観察可能なユニークな *in vitro* 実験系(ディスオルガノイド Disorganoid)を中心とした種々の解析を通じて、胆管組織の崩壊と維持において鍵となる細胞動態と遺伝子機能を明らかにし、管腔上皮組織構造の維持に関わる新たな分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスモデルにおいて Klf5 遺伝子の欠損により胆汁うっ滞性肝障害時に胆管組織構造の崩壊が誘導されるという *in vivo* での知見にもとづき、こうした現象を再現した *in vitro* 実験系(ディスオルガノイド Disorganoid)を構築した。すなわち、Klf5 flox/flox マウス肝臓より胆管組織を単離して培養・株化したところに、薬剤(Tamoxifen)誘導性の部位特異的組換え酵素 CreERT2 の遺伝子をレトロウイルスベクターをもちいて安定的に導入した。こうして樹立した細胞株を3次元培養することで胆管の樹状組織構造を模したオルガノイドを形成させたのちに、培養液中に Tamoxifen を添加することで Klf5 遺伝子欠損を誘導し、これに伴い胆管組織構造の崩壊が誘導される培養系を構築した。Tamoxifen 添加後に多次元(3次元+タイムラプス)イメージング観察を行うことで、崩壊の過程を時系列を追って観察した。

ディスオルガノイド系において、胆管樹状組織が構築された初期状態($t = 0$)、および、Tamoxifen 添加により崩壊を誘導した12時間後、24時間後のそれぞれの胆管組織から RNA を

回収し、RNA シークエンシング (RNA-seq) 解析により遺伝子発現プロファイルの変動を明らかにした。以前に実施していた *in vivo* 系での遺伝子発現変動解析のデータ (Klf5 遺伝子欠損およびコントロールマウスの胆管組織をもちいた RNA-seq 解析: Okada et al., *J Biol Chem* 2018) とも照合し、*in vitro*、*in vivo* の両解析において相関のある変動パターンを示す遺伝子に注目して、崩壊の過程に関連する遺伝子・パスウェイの候補を抽出した。

崩壊の過程に関連する候補遺伝子・パスウェイの発現・活性化状態について、生体組織 (肝障害を受けた KLF5 遺伝子欠損マウスの胆管組織構造) をもちいた検討を行った。こうした解析により絞り込んだ候補遺伝子について、マウス個体レベル (*in vivo*) での機能の検証を行った。すなわち、肝臓上皮組織特異的な遺伝子欠損マウスを作製し、種々の肝障害モデルを適用した上で胆管リモデリングの誘導・組織構造の状態について 3 次元レベルでの解析を行った。

4. 研究成果

Klf5 遺伝子欠損マウスにおいて初めて見出された「胆管組織構造の崩壊」という生体内 (*in vivo*) での現象は、胆管リモデリングの過程を模した胆管オルガノイド培養系 (*in vitro*) をベースに構築したディスオルガノイド培養系において Tamoxifen 投与後の Klf5 遺伝子欠損に依存して誘導された (図 2)。ディスオルガノイド培養系は胆管由来細胞単独で構成されていることから、胆管組織に自律的 (tissue-autonomous) な組織構造安定化機構が存在し、その破綻により組織構造の崩壊が誘導されることが明らかとなった。

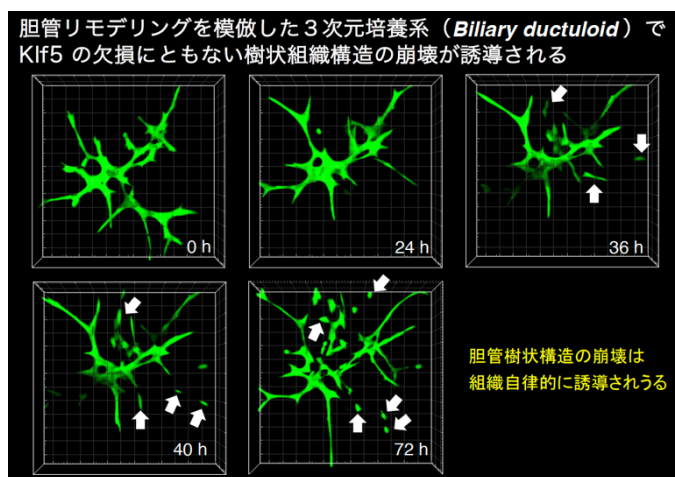


図 2. ディスオルガノイド培養系における胆管組織構造の変化・崩壊

RNA-seq 解析 (*in vitro* 系および *in vivo* 系) の結果にもとづき、Klf5 下流で胆管組織構造の崩壊あるいは維持に関与する可能性のある遺伝子・パスウェイの探索を行った (図 3)。Gene Ontology 解析の結果からは、Klf5 が主に細胞結合の形成 (cell junction organization) や細胞間接着の制御 (regulation of cell adhesion) といったパスウェイに正に作用することが示された。候補となる遺伝子・パスウェイについて発現パターン/活性化プロファイルの確認や、機能の検証・解析を実施した結果、胆管組織構造の安定化に関わる候補分子の一つとして細胞外マトリクスタンパク質の一種 Laminin-332 の構成サブユニットである Laminin- β 3 (Lamb3) を同定した。

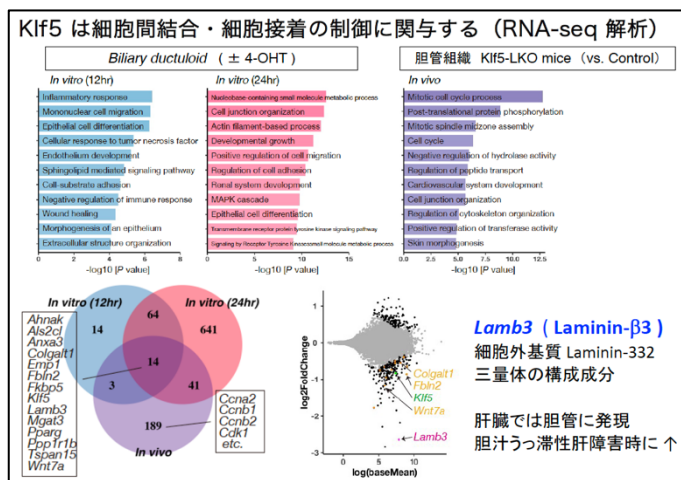


図 3. RNA-seq 解析による Klf5 下流の解析

Lamb3 は肝臓においてはもっぱら胆管特異的に発現していた。さらに、この発現は肝臓特異的な Klf5 欠損マウスにおいては消失していた。Lamb3 flox マウスをもちいて肝臓特異的な Lamb3 遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスに胆汁うっ滞性肝障害モデルを適用したところ、胆管の細胞増殖には影響が無かった一方で、胆管組織構造の崩壊が顕著に誘導されることが明らかとなった。以上により、胆管自身で発現・作用する Klf5-Lamb3 シグナル経路が、組織構造の安定化・維持を介して胆管リモデリング誘導に関わっていることが明らかとなった (図 4)。また、Klf5-Lamb3 シグナル経路が肝臓内の胆管以外の組織構築に及ぼす影響についても肝臓特異的な Klf5 または Lamb3 遺伝子欠損マウスをもちいた検討を行った。病因の異なるマウス肝疾患モデルでの比較検討から、Klf5-Lamb3 シグナル経路が病態特異的に肝線維化の誘導にも関与する可能性が見出された。

Klf5 下流で作用する Lamb3 以外の候補遺伝子・パスウェイについて、*in vitro* 系および *in vivo* 系での機能検証を行った。その結果、それら候補遺伝子のうちで胆管に発現する膜タンパク質の 1 つ、および、受容体分子の 1 つが、胆管組織構造の維持にそれぞれ関わる可能性が示

唆された。また、成体肝臓への遺伝子導入法をもちいた解析からは、同じく胆管に発現する 2 種類の分泌タンパク質が、それぞれ肝線維化の誘導・維持に関わる可能性が示唆された。これらをはじめとして胆管は、周囲の肝臓構成細胞・組織へと作用しうる多数の分泌タンパク質を発現しており、それらを介して肝臓の種々の病態の制御に関わる「シグナルセンター」としての機能を果たしうるということが明らかとなった。

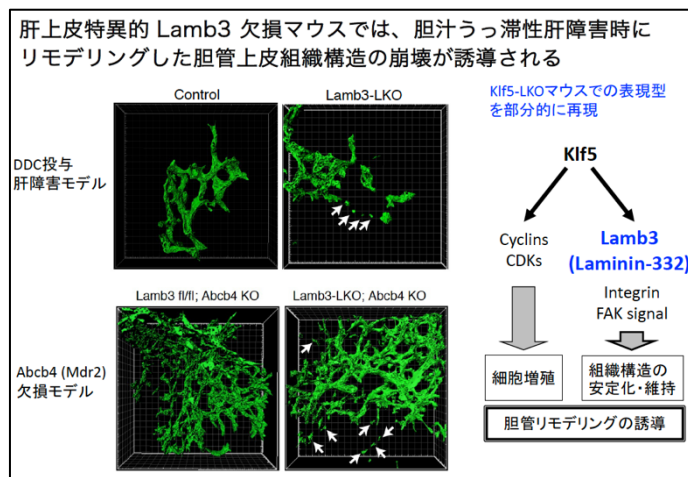


図 4. Klf5-Lamb3 シグナル経路による胆管組織構造の維持機構

引用文献

- Kenji Kamimoto, Kota Kaneko, Cindy Yuet-Yin Kok, Hajime Okada, Atsushi Miyajima, and Tohru Itoh (2016). Heterogeneity and stochastic growth regulation of biliary epithelial cells dictate dynamic epithelial tissue remodeling. *eLife* 5: e15034. DOI: 10.7554/eLife.15034.
- Kota Kaneko, Kenji Kamimoto, Atsushi Miyajima, and Tohru Itoh (2015). Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology* 61: 2056-2966.
- Hajime Okada, Minami Yamada, Kenji Kamimoto, Cindy Yuet-Yin Kok, Kota Kaneko, Masatsugu Ema, Atsushi Miyajima, and Tohru Itoh (2018). The transcription factor Klf5 is essential for intrahepatic biliary epithelial tissue remodeling after cholestatic liver injury. *Journal of Biological Chemistry* 293: 6214-6229.
- Hinako M. Takase, Tohru Itoh, Seitaro Ino, Ting Wang, Takehiko Koji, Shizuo Akira, Yasuhiro Takikawa, and Atsushi Miyajima (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes & Development* 27: 169-181.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakano Yasuhiro, Itoh Tohru, Tanaka Minoru, Miyajima Atsushi, Kido Taketomo	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a high throughput system to screen compounds that revert the activated hepatic stellate cells to a quiescent-like state	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.11.01.564270	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Minami, Okada Hajime, Ema Masatsugu, Kikkawa Yamato, Miyajima Atsushi, Itoh Tohru	4. 巻 -
2. 論文標題 KLF5-regulated extracellular matrix remodeling secures biliary epithelial tissue integrity against cholestatic liver injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.01.25.477619	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 The truth lies somewhere in the middle: the cells responsible for liver tissue maintenance finally identified	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Regeneration	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13619-021-00090-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Vartak Nachiket, Drasdo Dirk, Geisler Fabian, Itoh Tohru, P.J.Oude Elferink Ronald, van de Graaf Stan F.J., Chiang John, Keitel Verena, Trauner Michael, Jansen Peter, Hengstler Jan G.	4. 巻 74
2. 論文標題 On the Mechanisms of Biliary Flux	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 3497 ~ 3512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.32027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤 暢
2. 発表標題 肝臓の病態と再生における胆管組織リモデリングの役割と制御機構
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Nakano, Atsushi Miyajima, Tohru Itoh
2. 発表標題 Behavior of Reactive Cholangiocytes in the Tissue Repair Stage from Chronic Liver Injury
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference 2021 in Osaka（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 泰博, 宮島 篤, 伊藤 暢
2. 発表標題 慢性肝障害からの組織修復過程における胆管細胞の挙動解析
3. 学会等名 第28回 肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------