

## 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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13801  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22570063  
 研究課題名（和文）肝臓成熟化欠損マウスを用いた肝臓の基本単位（肝小葉）の新規構築メカニズムの解明  
 研究課題名（英文）EXPERIMENTAL STUDIES ON MECHANISMS OF HEPATIC LOBULE FORMATION USING MUTANT MICE LACKING C/EBP $\alpha$   
 研究代表者  
 塩尻 信義 (SHIOJIRI NOBUYOSHI)  
 静岡大学・理学部・教授  
 研究者番号：70162568

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝細胞の成熟化が進まず、種々の組織異常を示す C/EBP $\alpha$  遺伝子欠失マウスを用い、肝小葉を構成する細胞間で働く新規相互作用とその分子実体の解析を行った。ヌル型肝臓では、胆管形成不全、肝星細胞の活性化・線維化、類洞内皮細胞の成熟不全がおり、これらより肝細胞は、胆管上皮細胞、肝星細胞、類洞内皮細胞と密接に相互作用することが示唆された。その相互作用には、PDGFC、angiopoietin-like 3 等各種細胞増殖因子が関わりうる。また、胆管上皮細胞マーカーとして、Sox4、Sox9 や osteopontin 等が優れることが証明された。

研究成果の概要（英文）：The present study was undertaken to demonstrate novel cell-cell interactions of liver lobule formation using C/EBP $\alpha$ -knockout mice, in which hepatocyte maturation was severely impaired. In the knockout liver, abnormal bile duct formation, activation of hepatic stellate cells and immature sinusoidal endothelial cells were noted, suggesting that hepatocytes intimately interact with biliary cells, hepatic stellate cells and sinusoidal endothelial cells to develop liver lobules. Growth factors such as PDGFC and angiopoietin-like 3 could be involved in these phenomena.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：肝小葉、C/EBP $\alpha$ 、胆管形態形成、アレイ、門脈トライアド、組織構築、遺伝子欠失マウス

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は代謝の中心臓器で、その基本単位は、六角柱状の肝小葉である。肝小葉は、肝臓の主な機能を担う成熟肝細胞と、他の細胞群（類洞内皮細胞、肝星細胞、Kupffer細胞、胆

管上皮細胞等 [以上を総称して非実質細胞という]) との密接な相互作用を経て初めて構築され、高次の肝機能が営まれる。しかし、肝小葉構築に関わる細胞間相互作用にどのような相互作用があり、また各相互作用がどの

ような分子によって担われるかは必ずしも明らかではない。C/EBP $\alpha$ は肝特異的転写因子の1つで、尿素合成や糖新生などに関わる肝特異的酵素遺伝子群の転写調節を行うが、この遺伝子欠失マウス肝臓では、尿素回路酵素や糖新生酵素などの発現がおこらないために肝細胞の成熟化が進まず、偽腺管構造が肝臓全体に形成される。さらにそれらに加え、門脈域の肝内胆管構造も偽腺管構造との接続が切れず、異常なままにとどまる。C/EBP $\alpha$ は、本来、胆管上皮細胞では発現抑制されるため、胆管発生には必要ないと考えうるが、肝内胆管発生に異常を示したということは、肝細胞の成熟化と肝内胆管発生がカップルしていることを示唆している。一方、野生型およびヌル型マウス胎児肝臓間でcDNAアレイ解析を行い、肝小葉構築に関わりうる、ヌル型で大きくアップする遺伝子ならびに大きくダウンする遺伝子を得た。これらには、胆管上皮細胞などの分子マーカーとなるものが含まれている可能性も高い。以上を受け、肝臓内で種々の組織異常を示すC/EBP $\alpha$ 遺伝子欠失マウスを用い、その異常を、実験形態学的手法や*in situ* hybridization法などをふくめ詳細に解析することで、肝小葉構築の新規細胞間相互作用を発見できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、C/EBP $\alpha$ 遺伝子欠失マウスを用いて、肝小葉の構築原理、特に肝小葉を構成する細胞間で働く新規相互作用とその分子実体を解明することを目的とした。具体的には、(1) 野生型およびヌル型マウス胎児肝臓間で行ったアレイ解析で得た、肝小葉構築に関わりうる、ヌル型で大きくアップする遺伝子群ならびに大きくダウンする遺伝子群の発現解析を、RT-PCR法、*in situ* hybridization法、免疫組織化学法を用いて行い、どの細胞で各遺伝子が発現されるか証明する。また野生型とヌル型肝臓の組織構築を分子形態学的に比較解析し、肝臓構築における新規細胞間相互作用を推察する。(2) 野生型胎児肝臓細胞培養系に、アレイ解析で得たヌル型肝臓でアップあるいはダウンした遺伝子にコードされるタンパク質のうち分泌型因子を添加することで、肝細胞の増殖・成熟化、胆管形態形成、門脈結合組織細胞等の線維化、類洞構成細胞(肝星細胞と類洞内皮細胞)の成熟化への効果を調べる。肝芽細胞(肝細胞の

胎生期前駆細胞)が、それ以外の非実質細胞の分化成熟・遺伝子発現等にどのような役割を担うか、肝芽細胞を特異的に除去した細胞培養系で明らかにする。(3) 肝小葉の実質細胞である肝細胞の成熟化が進まず、偽腺管構造をはじめとする種々の組織異常を示すC/EBP $\alpha$ 遺伝子欠失マウスヌル型細胞と野生型細胞からなるキメラマウスを作り、肝臓内キメリズムと組織構築の回復状況を比較解析することで、肝小葉構築における新規細胞間相互作用を証明する。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型およびヌル型胎児肝臓において、ヌル型でアップする遺伝子群(*Spp1*, *Epcam*, *Cadh1*, *Hnf6*, *Hnf1b*, *Sox4*, *Sox9*, *Jag1*, *Notch2*, *Pecam1*, *desmin*, *Foxf1*, *PDGFC*, *CTGF*等)とダウンする遺伝子群(*Cps1*, *G6pc*, *Tat*, *Tdo2*, *FGF1*, *angiopoietin-like 3*, *neuritin 1*等)の発現解析を、RT-PCR法ならびに*in situ* hybridization法を用いて行った。抗体が入手できるもの(*Sox9*, *HNF6*, *HNF1 $\alpha$* , *HNF4 $\alpha$* , *osteopontin* (*Spp1*の翻訳産物)、*EpCAM*, *desmin*, *Cps1*, 胆管特異サイトケラチン等)に関しては、免疫組織化学法による発現解析を行った。

(2) 胎生12.5日(E12.5)マウス(野生型)の肝臓細胞の初代培養系に、ヌル型でアップする分泌型因子(PDGFC等)とダウンする分泌型因子(FGF1等)を添加し、その効果を調べた(培養期間は5日)。また、肝芽細胞が、それ以外の細胞の分化成熟・遺伝子発現にどのような役割を担うか、E12.5肝臓細胞の培養系から、抗E-cadherin抗体を結合させた磁気ビーズを用いて肝芽細胞だけを除去し、他の細胞の増殖・遺伝子発現などに与える影響を調べた。

(3) *DsRed2*マウス(C/EBP $\alpha$ 遺伝子座は野生型)同士、あるいはC/EBP $\alpha$ 遺伝子欠失マウスヘテロ型同士(胚は+/:+/-:-/=1:2:1を含む)をかけあわせ、妊娠雌より8細胞期胚をそれぞれインビトロに取り出し、常法により集合キメラ胚を作成した。その後、偽妊娠マウスの子宮に注入し着床させ、キメラ個体を得た。キメラ個体において、ヌル型肝臓で認められる各種異常が野生型細胞の存在でレスキューされるか調べた。

## 4. 研究成果

(1) アレイ解析の結果、野生型とヌル型肝臓で発現に差のあった肝機能マーカーならびに胆管マーカーの RT-PCR 法による発現解析を行ったところ、肝細胞様細胞が偽腺管構造を多数つくるヌル型肝臓では、*Cps1*、*G6pc*、*Tat*、*Tdo2* などの代謝に関わる酵素遺伝子が著しく低下していた。一方で、*Spp1* や *Epcam* などの胆管マーカーとされる遺伝子が高発現していた。次に、これらの遺伝子の転写調節を行いうる転写因子の発現を調べると、肝特異的転写因子をコードする *Foxa2*、*Foxa3*、*Hnf1a*、*Hnf4a* の発現は野生型、ヌル型で差がないが、*Hhex*、*Cebpb* の発現がヌル型で大きく減少していた。さらにヌル型肝臓では、*Hnf1b*、*Hnf6*、*Sox4*、*Sox9* の発現が著しく促進されていた。これらのデータより、C/EBP $\alpha$  の働きとして、*Foxa2*、*Foxa3*、*Hnf1a*、*Hnf4a* の作用と独立か、あるいはこれらの下流にあって肝細胞の成熟化を促進すると考えられる。また *Hhex*、*Cebpb*、*Hnf1b*、*Hnf6*、*Sox4*、*Sox9* については、C/EBP $\alpha$  の下流にあるか、あるいは C/EBP $\alpha$  と相互作用して働く可能性が高いと考えた。今後、ChIP アッセイやレポーターアッセイなどを行い、各転写因子間での相互作用や上流下流関係を証明していく必要がある。

HNF4 $\alpha$ 、HNF1 $\alpha$  などの肝特異的転写因子に加え、胆管形成転写因子 *Sox9* と *Hnf1b*、胆管形成因子 *Jag1*、*Notch2*、胆管マーカーであるサイトケラチンなどの発現解析を免疫組織化学法や *in situ hybridization* 法を用いて行った。その結果、C/EBP $\alpha$  を欠失すると、HNF4 $\alpha$  や HNF1 $\alpha$  陰性、*Sox9*、*Jag1*、*Notch2* 陽性の胆管上皮様細胞が門脈周囲以外の実質部に出現し、門脈からの胆管誘導シグナルがなくとも、C/EBP $\alpha$  の発現抑制がおこれば胆管上皮細胞への分化が進みうることが示された。また胆管上皮様細胞の出現は肝被膜下で顕著で、本来胆管が分化しない中心静脈周囲にも時折認められた。これらより、C/EBP $\alpha$  は肝芽細胞から成熟肝細胞と胆管上皮細胞に分化がおこる際のスイッチになる、非常に大事な転写因子と考えられる。また、C/EBP $\alpha$  の発現抑制は肝臓実質部では、胆管上皮細胞の分化を促進するが、門脈周囲の胆管構造では、胆管形成転写因子と肝特異的転写因子がモザイク的に発現し、胆管上皮細胞の分化は必ずしも正常におこっているわけではなかった。この結果は、肝

臓実質部の成熟化が門脈周囲の胆管上皮細胞の分化に密接に関わることを示唆している。また、この胆管上皮細胞の分化不全が、門脈域の肝内胆管構造と偽腺管構造との接続が切られず、肝内胆管構造が未熟なままにとどまる原因でもありうる。いずれにせよ、以上の成果は、肝臓構築のメカニズムを考える上で、新規かつ基盤的な発見である。

アレイ解析で注目した因子のうち、*Sox9* や *Sox4*、*osteopontin* などの発現は胆管上皮細胞に限局しており、これらは胆管上皮細胞に特異的な分化マーカーになると推察できる。

肝細胞の成熟化不全、胆管形成異常に加え、他の肝臓構築に異常がないかさらに詳細に解析した。アレイ解析では種々の細胞外マトリックス成分や肝星細胞マーカーの発現上昇が認められたので、これらの点を RT-PCR 法や免疫組織化学法などにもとづいて調べたところ、*desmin* や *Foxf1* の著しい発現上昇、肝臓本体にタイプ I コラーゲンなど細胞外マトリックスの沈着上昇が認められた。さらに類洞内皮細胞の成熟化が損なわれていること、造血細胞の肝臓外への移動が遅れていることなどがわかった。これらの結果は、肝細胞の成熟化が肝星細胞や類洞内皮細胞、造血細胞などの挙動に大きく影響を与え、これらの細胞間でも密接な相互作用があることが推察された。

ヌル型および野生型マウス胎児肝臓間で行ったアレイ解析で得た、ヌル型で大きくアップする分泌型因子とダウンする分泌型因子 mRNA についてその発現解析を、RT-PCR 法、*in situ hybridization* 法を用いて行った。ヌル型で大きくダウンする分泌型因子/膜結合因子 *angiopoietin-like 3*、*neurtin 1* 等は肝細胞で発現しており、これらは肝細胞の成熟化や血管形成などの肝小葉構築に関わる可能性がある。ヌル型で大きくアップする分泌型因子 *PDGFC* は野生型では発現細胞があまりはっきりしなかったが、ヌル型の場合、発現細胞は門脈域胆管上皮細胞であった。ヌル型で大きくアップする分泌型因子 *CTGF* は肝細胞で発現していた。ヌル型肝臓における線維化は胆管上皮細胞によって産生される *PDGFC* や肝細胞様細胞で産生される *CTGF* によって引き起こされる可能性がある。ヌル型で大きくアップ

する分泌型因子 *PDGFD*、*TGF β*、*follistatin-like 1* 等、ダウンするものとして、*inhibin βA* 鎖、*FGF 1*、*IL-16* 等についても、RT-PCR 法を用いてアレイ解析の結果を確認することができた。

(2) 野生型マウス胎児肝臓細胞の初代培養系に、ヌル型肝臓で高発現した細胞増殖因子 (PDGFC 等) を添加し、肝芽細胞、肝星細胞、血管内皮細胞などの増殖や遺伝子発現を調べたところ、肝星細胞の増殖と線維化が促進された。PDGFC はヌル型肝臓に認められる肝星細胞の増殖と線維化に直接関わると考えられる。一方、ヌル型肝臓で低発現したもの (FGF1 等) を添加した場合は、肝細胞の成熟化、非実質細胞の増殖や遺伝子発現などでコントロールとあまり大きな差がなく、効果が認められなかった。また、免疫磁気ビーズ法により肝芽細胞を除去した胎生期肝臓細胞の培養系では、コントロール培養と比べ血管構築 (毛細血管網) が正常に形成されず、血管内皮細胞は単細胞状態にとどまり、ディッシュ上を伸展することはなかった。この結果より、肝臓内血管構築に肝芽細胞/肝細胞の存在が必要不可欠なことが示された。その効果は、VEGF ではレスキューされず、肝細胞の細胞膜に発現される *neuritin1* などの膜結合型因子が重要ではないかと推察された。さらに肝芽細胞の除去培養系では、肝星細胞の著しい増殖低下も認められ、肝芽細胞-血管内皮細胞間、肝芽細胞-肝星細胞間の密接な相互作用がおこなっていることが考察された。

(3) 肝小葉構築に関わる細胞間相互作用を明らかにするため、*DsRed2* マウス (*C/EBPα* 遺伝子座は野生型) と、*C/EBPα* 遺伝子欠失マウス間でキメラマウスを作出、現在、解析中である。肝臓構築における細胞間相互作用の直接的証明は将来の課題として残されている。

#### 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 5 件)

- ①Akai, Y., Oitate, T., Koike, T. and Shiojiri, N. (2013) Impaired hepatocyte maturation, abnormal expression of biliary transcription factors and liver fibrosis in *C/EBP α* (*Cebpa*)-knockout mice. *Histol. Histopathol.*, in press. 査読有

- ②Takabe, Y., Yagi, S., Koike, T. and Shiojiri, N. (2012) Immunomagnetic exclusion of E-cadherin-positive hepatoblasts in fetal mouse liver cell cultures impairs morphogenesis and gene expression of sinusoidal endothelial cells. *J. Anat.*, 221, 229-239. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01532.x. 査読有

- ③Umezū, A., Kametani, A., Akai, Y., Koike, T. and Shiojiri, N. (2012) Histochemical analyses of hepatic architecture of the hagfish with special attention to periportal biliary structures. *Zool. Sci.*, 29, 450-457. doi: 10.2108/zsj.29.450. 査読有

- ④Shiojiri, N. and Nitou, M. (2012) Purification and culture of fetal mouse hepatoblasts that are precursors of mature hepatocytes and biliary epithelial cells. *Methods Mol. Biol.*, 826, 3-10. doi: 10.1007/978-1-61779-468-1\_1. 査読有

- ⑤塩尻信義 (2012) 肝臓の発生・組織構築過程における細胞間相互作用ネットワーク. *生化学*, 84 (8), 629-634. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012872> 査読無

[学会発表] (計 13 件)

- ①白田将・小池亨・塩尻信義 (2012) メビオールゲルはマウス胎仔肝臓間葉系細胞の細胞死を誘導する 日本動物学会第 83 回大会 (大阪) 9 月 15 日

- ②上野友也・蒔田優・石原顕紀・小池亨・山内清志・塩尻信義 (2012) アフリカツメガエル変態過程における肝臓の組織学的変化 日本動物学会第 83 回大会 (大阪) 9 月 13 日

- ③亀谷治頌・赤井佑輔・小池亨・赤坂甲治・塩尻信義 (2012) 脊椎動物における肝臓構築の多様性と血管の分布 第 19 回肝細胞研究会 (札幌) 6 月 29 日

- ④塩尻信義 (2012) マウス胎仔肝臓の組織構築における細胞間相互作用と温度感応性ゲル内培養 第 12 回日本再生医療学会総会 (横浜) シンポジウム 2『再生組織の 3 次元培養は可能か』 3 月 21 日

- ⑤Shiojiri, N. (2011) Oval cells and biliary development. The Fausto Symposium, October 27, Seattle, USA.

- ⑥塩尻信義・梅津有理沙・上野友也・亀谷治頌・赤井佑輔・小池亨・赤坂甲治 (2011)

脊椎動物における肝臓構築の多様性 日本動物学会第 82 回大会 (旭川) 9 月 22 日

⑦赤井佑輔・小池亨・塩尻信義 (2011) 肝特異的転写因子 C/EBP $\alpha$  遺伝子欠失マウスを用いた cDNA マイクロアレイによる胆管形成遺伝子の探索と発現解析 日本動物学会第 82 回大会 (旭川) 9 月 21 日

⑧高部百合絵・小池亨・塩尻信義 (2011) マウス胎生期肝臓類洞形成と肝芽細胞の働き～免疫磁気ビーズ法による肝芽細胞除去と血管構築～ 第 18 回肝細胞研究会 (東京) 6 月 24 日

⑨赤井佑輔・小池亨・塩尻信義 (2011) 肝特異的転写因子 C/EBP $\alpha$  遺伝子欠失マウスを用いた cDNA マイクロアレイによる胆管形成遺伝子の探索 第 18 回肝細胞研究会 (東京) 6 月 24 日

⑩高部百合絵・杉山良典・小池亨・塩尻信義 (2010) マウス胎児肝臓における血管系の発生・分化とそのメカニズム 日本動物学会第 81 回大会 (東京) 9 月 25 日

⑪袁媛・小池亨・塩尻信義 (2010) マウス肝臓発生・組織構築過程における TNF ファミリー遺伝子の発現解析 日本動物学会第 81 回大会 (東京) 9 月 25 日

⑫杉山良典・富谷智明・池田一雄・小池亨・塩尻信義 (2010) マウス肝臓発生過程における syntaxin2 の発現と肝芽細胞の増殖・分化に対する影響 第 17 回肝細胞研究会 (秋田) 6 月 19 日

⑬塩尻信義 (2010) 肝血管系の発生と細胞間相互作用 第 17 回肝細胞研究会シンポジウム『肝構成細胞の発生と分化』(秋田) 6 月 18 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩尻 信義 (SHIOJIRI NOBUYOSHI)  
静岡大学・理学部・教授  
研究者番号: 70162568

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし