

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790197

研究課題名(和文)肝芽細胞は肝類洞内皮細胞の発生に関与するのか

研究課題名(英文)Hepatoblasts might contribute to hepatic sinusoidal endothelial cells development

研究代表者

仁木 大輔(Niki, Daisuke)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・厚労科研研究員

研究者番号：10621914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肝類洞内皮細胞は肝臓の発生と再生、肝臓内の血流調整、さらには免疫反応など重要な役割を担っているがその発生機構はほとんど不明である。研究代表者は過去の肝類洞内皮細胞に関する文献より、発生過程における肝芽細胞が肝類洞内皮細胞の発生に関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、肝芽細胞欠損マウスとしてHhex機能不全マウスを作出した。今後、このマウスにおける肝類洞内皮細胞の発生状況を解析し、肝芽細胞が肝類洞内皮細胞の発生にどのように関与しているかを検討する。

研究成果の概要(英文)：Hepatic sinusoidal endothelial cells are an important roles for hepatic development and regeneration, control of blood flow in liver and immunoreaction. However, developmental mechanism of hepatic sinusoidal endothelial cells is not a little known. Based on several literatures, we formulated a hypothesis which hepatoblasts might contribute hepatic sinusoidal endothelial cells development. In order to examine the hypothesis, we generated Hhex knockout mice as hepatoblasts-less liver mice. Hereafter, development of hepatic sinusoidal endothelial cells and roles of hepatoblasts are examined using Hhex knockout mice.

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：肝芽細胞 肝類洞内皮細胞 肝臓発生

1. 研究開始当初の背景

肝類洞内皮細胞は肝臓固有の内皮細胞でありユニークな構造と機能を持つ。その構造は一般的な内皮細胞とは異なり、基底膜を欠損し有窓構造を有する。また、その機能は肝内血管系である肝類洞の構成、肝内血流の調節、異物や老廃物の除去、免疫反応への関与、肝細胞の発生と再生の促進など生命の発生と維持に必須である。このように、肝類洞内皮細胞は生体にとって必要不可欠の細胞でありながら、その発生機構の解明は充分に行われておらず、不明な部分が多い。肝類洞内皮細胞の発生機構の解明は肝臓内の血管系の発生機構と肝組織構築を理解する上で重要な知見となる。

また、このような発生生物学的な知見は、多能性幹細胞から肝類洞内皮細胞を分化誘導するための貴重な手がかりともなる。多能性幹細胞から肝類洞内皮細胞の分化誘導方法が確立されると、肝類洞内皮細胞の障害に関連する病態を治療するための細胞移植治療、バイオ人工肝臓またはヒト化肝臓マウスにおける肝内血管系の構築などに応用できるため、その利用価値は高いことが予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だ未解明な部分が多い肝類洞内皮細胞の発生機構を解明することである。

申請者はこれまでニワトリ胚とマウス胚を用いて肝臓の発生過程に関係する研究に従事してきた。そして、発生過程において肝細胞の前駆細胞である肝芽細胞が内皮細胞の発生に関与する可能性がある分泌因子を発現していることを見いだした (Niki et al. *Dev Growth Differ*, 2009)。それに加えて、肝臓発生、肝類洞内皮細胞、内皮細胞に関するこれまでの以下の報告から『肝芽細胞が肝類洞内皮細胞の発生に関与している』という仮説を立てた。

- ① 肝臓発生において、肝芽細胞周辺には常に内皮細胞が存在している。
- ② 肝類洞内皮細胞の成熟マーカーは肝臓発生中期より発現が開始する (Blood, 2002 and *Dev Dyn.*, 2007)。
- ③ 肝芽細胞と内皮細胞との細胞間相互作用が肝臓の器官形成において重要である (Science, 2001)。
- ④ 臓器に存在する内皮細胞は組織固有の微小環境により誘導・獲得されると考えられている (Circ Res, 2007)。
- ⑤ 成体の肝類洞内皮細胞の性質は周辺の肝細胞によって維持されている (Med Electron Microsc., 2004)。

この仮説が証明できると、知見が乏しい肝血管系の構築機構の解明につながるだけで

なく、肝芽細胞を利用した分化誘導方法を確立することが可能であると期待している。本研究では、肝類洞内皮細胞の発生に必要な因子として肝芽細胞に焦点をあて、肝類洞内皮細胞の発生機構の解明と肝類洞内皮細胞の分化誘導方法の2つの目標を達成する。

3. 研究の方法

肝芽細胞が肝類洞内皮細胞の発生に関与しているという仮説を検証するために、以下の2つの実験を行う。

①肝芽細胞欠損マウスによる肝類洞内皮細胞の発生状況の解析

Matsumoto らは肝内胚葉周辺の内皮細胞を欠損させることにより、肝内胚葉の細胞増殖と形態形成が起こらなくなることを示し、内皮細胞由来の発生因子が肝内胚葉の発生に必須であることを証明した (Science, 2001)。本実験はその逆の発想であり、肝芽細胞を欠損するマウスを作出し、その周辺の内皮細胞の発生状況を解析することにより肝芽細胞の役割を検討する。作出した肝芽細胞欠損マウスの肝臓領域の組織切片を作製し、内皮細胞のマーカーである Flk-1、VE-Cadherin、PECAM-1 と肝類洞内皮細胞のマーカーである Stabilin 2、Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve-1) を免疫染色、または in situ hybridization により検出することにより肝類洞内皮細胞の発生状況を評価する。

②肝芽細胞と内皮細胞または中胚葉組織の共培養解析による肝類洞内皮細胞への分化誘導実験

ES 細胞とマウス胚の中胚葉組織を用いた分化誘導系の実験により in vitro の系で本仮説を証明する。E10.5~E12.5 のマウス胚より FACS または MACS を用いて単離した肝芽細胞とマウス由来の ES 細胞を血管内皮細胞マーカーである Flk-1 の陽性細胞へと分化誘導した細胞を共培養する。数日後、内皮細胞マーカーである Flk-1、VE-Cadherin、PECAM-1 と肝類洞内皮細胞のマーカー遺伝子である Stabilin 2、Lyve-1 を RT-PCR で検出することにより、肝芽細胞が肝類洞内皮細胞の発生に関与する可能性の判定を行う。また、マウス胚の様々な中胚葉組織と共培養することにより、肝類洞内皮細胞の起源となる細胞種または組織の検討を行う。

4. 研究成果

①肝芽細胞欠損マウスによる肝類洞内皮細胞の発生状況の解析

当初の予定では、肝芽細胞欠損マウスとして肝細胞特異的プロモーターである Albumin promoter の下流にジフテリア毒素フラグメント A (DTA) を連結したコンストラクトを用いて作出する Alb-DTA マウスを考案していた。このマウスは肝細胞のみでジフテリア毒素が発現し、肝細胞を速やかに除去できると予想していたが、その作出と維持に困難が予想されたために Hematopoietically-expressed homeobox protein (Hhex) 欠損マウスに変更し、作出を試みた。すでに Hhex 欠損マウスは作出され、発生期に肝芽細胞が欠損することが報告されている (Martinez Barbera JP et al. Development, 2000)。この論文を参考に Hhex のターゲティングベクターを作製し、C57BL/6N マウス由来の ES 細胞にエレクトロポレーション法により導入した。168 クローンのターゲティングベクターを導入した ES 細胞を樹立し、サザンブロッティング解析により相同組み替えが起こっているクローンを検索したが、樹立した ES クローン中に相同組み換えを示すクローンは見つからなかった。

そこで、CRISPR-CAS9 システムを用いた Hhex 欠損マウスの作出を試みた。CRISPR-CAS9 は古細菌の外来遺伝子に対する免疫システムであり、近年ゲノム編集に応用されている。この技術を用いることで、数 bp から数十 bp の欠損を標的配列付近に生じさせることが可能であり、フレームシフト変異による標的遺伝子の機能不全を誘導することが可能である。また、受精卵への導入によりその世代にてホモマウスを得ることができるという利点もある。Hhex の First ATG 付近 20bp の配列 (図 1 赤字、青字は Hhex の第 1 エキソンを示す) を組み込んだ CRISPR-CAS9 発現ベクターを作製し、C57BL/6N 由来の 1 細胞期胚または 2 細胞期胚にマイクロインジェクション法により導入した。E13.5 の発生段階にてマウス胚を回収した結果、6 匹中、4 匹が Hhex のホモ欠損マウスの特徴である頭部・脳の低形成を示した (図 2)。この結果より、Hhex の First ATG 付近に欠損が生じ、First ATG の欠損またはその周辺におけるフレームシフト変異が発生し、Hhex の機能不全が生じていると推測した。また、これらホモ欠損マウス胚の特徴を示したマウス胚の組織切片を作製し H. E. 染色を行った結果、肝芽組織の低形成が確認された。今後、このホモ欠損胚の肝類洞内皮細胞の発生状況を解析する。

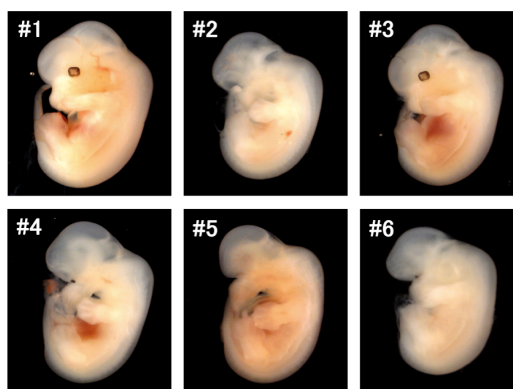
②肝芽細胞と内皮細胞または中胚葉組織の共培養解析による肝類洞内皮細胞への分化誘導実験

肝芽細胞欠損マウスの作出に集中したため、この実験を期間内に行う事はほとんどできなかった。

期間中には肝芽細胞欠損マウスの作出までしか達成することができなかった。今後、CRISPA-CAS9 システムを用いて作出した Hhex 機能不全マウス胚より肝臓領域の組織切片を作製し、肝類洞内皮細胞マーカーの抗体を用いた免疫染色と RNA プローブを用いた in situ hybridization を行い肝芽細胞が存在しない状況下での肝類洞内皮細胞の発生状況を解析する。

```
AGCCTATCGCCTGGAGGCGCAGAGGCCAAATAAATGTAGCGGGCCGCCGGCGGAGCTCTGTGCGA
GGGGCTGCGGAGCGGCCATGCAAGTTCCCGCACCGGGGCCCGCGCTGGGCCCGCGTGGAGATCCCGC
TGTATGCGCCACGCGCTGCTGCAGCCGCTCACCGACGCCCTTCTACATCGACGACATCTTGGG
```

(図 1)



(図 2)

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 Katsu K, Tatsumi N, Niki D, Yamamura K, Yokouchi Y Multi-modal effects of BMP signaling on Nodal expression in the lateral plate mesoderm during left-right axis formation in the chick embryo. Dev Biol. 2013 Feb 1;374(1):71-84. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.027. Equib 2012 Dec 1. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

① 昇地高雅、荒木喜美、舘山浩紀、仁木大輔、山村研一、高橋智 MSM/Ms 由来 ES 細胞を用いた c-Maf トランスジェニックマウスの作出と解析 日本遺伝学会第 85 回大会 (慶応義塾大学日吉キャンパス、横浜、2013 年 9 月 19 日~21 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://irda-genetics.kuma-u.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁木 大輔 (Niki Daisuke)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・

厚労科研研究員

研究者番号：10621914

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし