

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460271

研究課題名(和文) 肝臓をモデルとした、発生・再生過程での組織幹細胞の性状変化の解析とその応用

研究課題名(英文) Role of liver stem/progenitor cells in development and regeneration

## 研究代表者

谷水 直樹 (Tanimizu, Naoki)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00333386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓の肝幹前駆細胞(liver stem/progenitor cell; LPC)をEpCAM(+)細胞として分離し、その増殖・分化能を検討した。新生仔期のEpCAM(+)細胞は、高い増殖能と肝細胞への分化能を有していた。一方、発生が進むとEpCAM(+)細胞の肝細胞への分化能が著しく低下することが明らかになった。肝細胞への分化を抑制する分子として、発生とともにEpCAM(+)細胞で発現が上昇する転写因子grainyhead-like 2 (Grhl2)を同定した。Grhl2は肝細胞分化に必要なmiR122の発現を抑制することで、LPCの肝細胞分化を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We isolated liver stem/progenitor cells (LPCs) as EpCAM(+) cells from developing livers. Neonatal EpCAM(+) cells clonally proliferated and differentiated to functional hepatocytes in the presence of OSM and Matrigel in vitro. When they were transplanted to nude mice treated with retrorsine and 70% partial hepatectomy, neonatal EpCAM(+) cells are engrafted as hepatocytes and cholangiocytes in recipient liver tissue. In contrast, adult EpCAM(+) cells barely differentiate to hepatocytes. A transcription factor grainyhead-like 2 (Grhl2), which is strongly expressed in adult EpCAM(+) cells, suppressed hepatocytic differentiation of neonatal EpCAM(+) cells. Moreover, by comparing hepatocyte progenitor cell lines with or without Grhl2, miR122 was identified as a microRNA downregulated by Grhl2. We conclude that Grhl2 suppresses hepatocytic differentiation of EpCAM(+) cells by downregulating miR122.

研究分野：細胞生物学

キーワード：組織幹細胞 肝臓 肝細胞 胆管上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は高い再生能力を有しているが、慢性的な傷害に晒されて肝細胞が増殖能を失うと、肝幹前駆細胞 (Liver stem/progenitor cells; LPCs) が活性化して、組織の再生に参与すると考えられてきた。しかしながら、LPC が肝発生過程のどの時期に出現するのか、また発生過程を通じてその増殖・分化能などが一定に保たれているのか、など不明な点が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

我々は、肝発生の様々な段階および傷害肝臓から、EpCAM(+)LPC を FACS で分離し、その増殖能および分化能を検討することにより、発生・再生過程における LPC の分化・増殖能を明らかにするとともに、恒常性維持および再生における生理的な役割を明らかにしようと考えた。また、LPC の分化能を制御する分子メカニズムについても解析を試みることにした。

### 3. 研究の方法

新生仔および成体マウスの肝臓から、2-step collagenase perfusion とその後の酵素処理を行って、EpCAM(+)LPC を含む細胞分画を得た。さらに、FACS を用いて、EpCAM(+)LPC を単離した。増殖および分化能を調べるために、in vitro コロニーアッセイと移植実験を行った。また、発生過程における LPC の性状変化を明らかにするために、新生仔と成体肝臓から EpCAM(+)細胞を分離し、Microarray 解析を行って両者の遺伝子発現プロファイルと比較した。傷害肝臓における LPC の挙動を明らかにするために、DDC および胆管結紮したマウス肝臓について、SOX9、HNF4a、OPN など肝細胞や胆管上皮細胞マーカーの発現変化を、免疫染色を行うことで比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) LPC の発生過程での分化能の変化

胎生後期から成体にかけての肝臓から FACS を用いて EpCAM(+)細胞を分離し、個々の細胞のコロニー形成能を検討した。また、コロニーを形成する細胞のうち ALB(+)細胞の割合を比較することで、EpCAM(+)細胞の肝細胞への分化能について検討した。生後2週間目までは、EpCAM(+)細胞は高いコロニー形成能を示したが、その後の発生過程でコロニー形成能は著しく低下した。さらに、発生が進むにしたがって、コロニーに含まれる ALB(+)細胞の数が激減していた。この結果は、発生が進行すると、LPC の肝細胞への分化能力が大きく低下することを示唆していた。

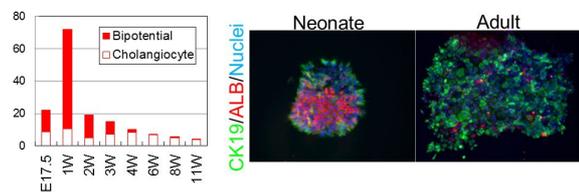
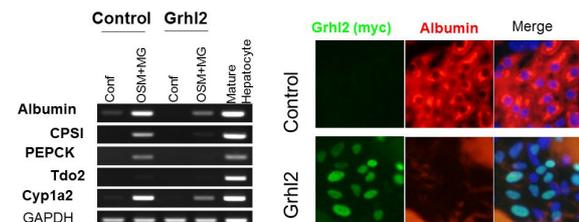


図1. EpCAM(+)細胞からのコロニー形成  
発生中の肝臓から EpCAM(+)細胞を FACS で分離し、低密度で培養した。コロニーは ALB(赤) および CK19(緑)に対する抗体で染色した。

#### (2) LPC の分化能の制御機構の解析 転写因子 Grh12 による制御

成体にかけて LPC が肝細胞への分化能が低下する原因を明らかにするために、1W と 8W の肝臓から分離した EpCAM(+)細胞について、Microarray 解析により遺伝子発現プロファイルと比較した。特に、転写因子について注目して解析を行ったところ、Sox9, Hes1, Grh12 などの転写因子の発現が、8W EpCAM(+)細胞で高いことが明らかになった。転写因子のうち、Grh12 を 1W EpCAM(+)細胞に導入すると、肝細胞への分化が抑制された。一方、8W EpCAM(+)細胞に Grh12 に対する siRNA を導入したところ、一部の肝細胞分化マーカーの発現が誘導されることも明らかになった。以上に結果は、Grh12 の発現量が高くなることで、LPC の肝細胞への分化が抑制されている可能性を示していた。



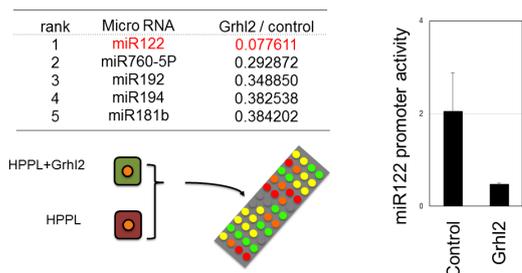
#### 図2. Grh12 による肝細胞分化の抑制

新生仔の EpCAM(+)細胞にレトロウイルスベクターを用いて Grh12 を導入した。OSM と Matrigel によって誘導される肝細胞分化が抑制されている。

#### LPC での miR122 の発現制御

Grh12 が肝細胞分化を制御しているメカニズムを明らかにするために、肝前駆細胞株 HPPL と HPPL に Grh12 を導入した細胞について、microRNA 発現について Microarray 解析を行った。その結果、miR122 の発現が Grh12 導入によって低下していることが明らかになった。miR122 は、肝発生が進行すると肝細胞での発現が非常に高くなる microRNA であることが知られていた。我々の解析結果も、miR122 が肝細胞特異的に発現が増強することを示していたため、miR122 の発現は肝細胞分化に必要な因子であることが予想された。

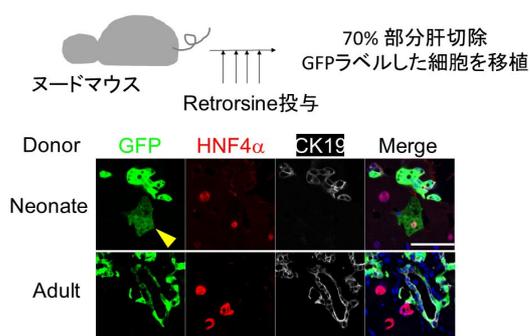
そこで、8W EpCAM(+)細胞に miR122 mimic を導入したところ、一部の肝細胞マーカーが誘導された。以上の結果から、Grhl2 は miR122 の発現を負に制御して、LPC の肝細胞への分化を抑制していることが明らかになった。



**図3 . Grhl2 による miR122 の制御**  
Microarray による比較を行い、Grhl2 を発現する細胞で発現が低下している microRNA として miR122 が同定された。Grhl2 は miR122 のプロモーターを負に制御している。

### (3) In vivo での LPC の分化能の検討

ヌードマウスに Retrorsine を投与して肝細胞増殖を阻害した後、部分肝切除を行って新生仔および成体の LPC 由来の細胞を移植した。新生仔の EpCAM(+)細胞は肝細胞として生着した。長期間の観察では、一部の細胞が duct 様の形態を示して生着していた。一方、成体の EpCAM(+)細胞由来の細胞は、非常に生着率が低く、また生着した細胞も肝細胞として生着している細胞は、ごくまれであった。以上の結果から、新生仔の EpCAM(+)細胞は、in vivo においても、肝細胞および胆管上皮細胞に分化する2分化能を有した肝管前駆細胞であることが示された。



**図4 . 移植による前駆細胞分化能の検討**  
新生仔および成体から分離した EpCAM(+)細胞を GFP でラベルして移植を行った。新生仔由来の細胞は、HNF4a(+)肝細胞として生着していた。

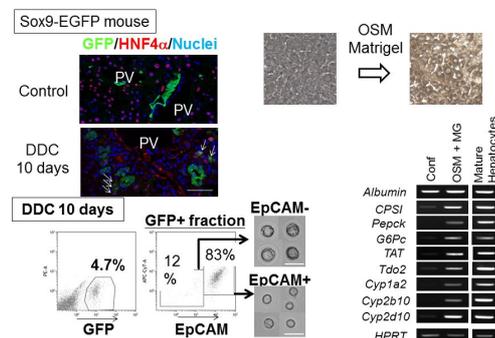
### (4) 再生肝臓の LPC および前駆細胞の解析 LPC の分化能の解析

マウスに 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC) を含む餌を

与えると慢性肝傷害が誘導される。DDC 傷害肝臓から、EpCAM(+)細胞を分離してコロニーアッセイを行った。高い増殖能を示す細胞が存在していたが、コロニーには ALB(+)細胞がほとんど含まれていなかった。したがって、慢性肝傷害が誘導されても、EpCAM(+)で分離される細胞は、肝細胞への分化能を示す細胞には変化していないと考えられた。

### 肝前駆細胞の解析

DDC 傷害肝臓における、胆管上皮細胞マーカーの発現を解析していたところ、正常肝では胆管上皮細胞時局的な転写因子である SOX9 を発現している肝細胞様の細胞が出現していることが明らかになった。SOX9(+)肝細胞は、SOX9-EGFP マウスから GFP(+)EpCAM(-)細胞として分離することができた。GFP(+)EpCAM(-)細胞は、in vitro においてクローナルに増殖し、成熟肝細胞に分化した。したがって、肝前駆細胞として機能している細胞であることが示された。



### 図5 . SOX9(+)肝細胞の分離と分化誘導

DDC 餌を投与すると、SOX9(+)HNF4a(+)EpCAM(-)の肝細胞が出現する。SOX9-EGFP マウスから SOX9(+)肝細胞を GFP(+)EpCAM(-)細胞として分離することができる。OSM と Matrgel を添加して培養すると、成熟肝細胞へ分化する。

### 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)

1. Tanimizu N.,\* Kobayashi S, Ichinohe N, Mitaka T. Downregulation of miR122 by grainyhead like-2 restricts the hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells. *Development* 141, 4448-4456 (2014) doi: 10.1242/dev.113654. 査読有
2. Tanimizu N.,\* Nishikawa Y, Ichinohe N, Akiyama H, Mitaka T. Sry HMG box protein 9-positive (Sox9<sup>+</sup>) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM<sup>-</sup>) biphenotypic cells derived from

- hepatocytes are involved in mouse liver regeneration. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289, 7589-98 (2014) doi: 10.1074/jbc.M113.517243. 査読有
3. Nakamura Y, Mizuguchi T, Tanimizu N, Ichinohe N, Ooe H, Kawamoto M, Meguro M, Hirata K, and Mitaka T. Preoperative hepatocyte transplantation improves the survival of rats with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis after partial hepatectomy. *Cell Transplant.*, 23, 1243-54 (2014) doi: 10.3727/096368913X668645. 査読有
  4. Tanimizu N.\*, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. *J. Cell Sci.*, 126, 5239-46 (2013) doi: 10.1242/jcs.133082. 査読有
  5. Ichinohe, N., Tanimizu, N., Ooe, H., Nakamura, Y., Mizuguchi, T., Kon, J., Hirata, K., and Mitaka, T., Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. *Hepatology* 57, 1192-202 (2013) doi: 10.1002/hep.26084. 査読有
- [学会発表](計 15 件)
1. 谷水直樹、三高俊広 「成体の肝前駆細胞を用いた Ex vivo での機能的肝細胞の増幅」第 15 回日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 17 日~19 日 大阪国際会議場、大阪
  2. 谷水直樹、三高俊広 「Notch と TGFbeta シグナルによる肝細胞の分化可塑性の制御」BMB2015 2015 年 12 月 1 日~4 日 神戸ポートアイランド、神戸
  3. 谷水直樹、西川祐司、三高俊広 「肝上皮細胞の分化可塑性の制御機構」第 22 回肝細胞研究会 シンポジウム「肝再生の update」2015 年 6 月 4 日~5 日 米子コンベンションセンター、米子
  4. 谷水直樹、三高俊広 「慢性肝傷害時に誘導される Sox9(+)肝前駆細胞の組織再生への寄与」第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 3 月 19 日~21 日 パシフィコ横浜、横浜
  5. 谷水直樹、小林誠司、三高俊広 「転写因子 Grhl2 によるマウス胆管上皮細胞の分化可塑性の制御」第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 日~27 日 パシフィコ横浜、横浜
  6. Naoki Tanimizu and Toshihiro Mitaka “Plasticity of cholangiocytes and hepatocytes” 第 18 回日本肝臓学会大会 International Session (Symposium) Stem cells in liver regeneration and therapy: Present and future scope 2014 年 10 月 23 日~25 日 神戸ポートアイランド、神戸
  7. Naoki Tanimizu, Toshihiro Mitaka “Molecular mechanisms defining the lineage plasticity of cholangiocytes.” FASEB summer research conference 2014 年 7 月 6 日~11 日 米国コロラド州キーストン
  8. 小林誠司、谷水直樹、三高俊広 「胆管上皮細胞の分化能を制御する分子メカニズムの解析」第 2 1 回肝細胞研究会 2014 年 6 月 27 日~28 日 東京医科歯科大学、東京
  9. 谷水直樹、三高俊広 「細胆管反応を伴うマウス障害肝臓に出現する肝前駆細胞の増殖および分化能の解析」第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日~6 日 国立京都国際会議場、京都
  10. 谷水直樹、三高俊広 「細胆管反応を伴うマウス障害肝臓に出現する肝前駆細胞の性状解析」第 4 6 回北海道病理談話会 2013 年 10 月 12 日 札幌医科大学、札幌
  11. Naoki Tanimizu and Toshihiro Mitaka “Lineage plasticity of cholangiocytes and hepatocytes” The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic cells. 2013 年 9 月 26 日~27

日 大阪国際会議場、大阪

12. 谷水直樹 「肝臓の上皮細胞の分化可塑性および組織形成を制御する分子メカニズムの解析」 2013年度日本生化学会北海道支部・生物物理学会北海道支部・北海道分子生物学研究会合同シンポジウム「生命現象の分子レベルでの解明」2103年11月22日 北海道大学、札幌
13. 谷水直樹、三高俊広「転写因子 Grainyhead like-2 による上皮細胞の形態形成及び分化可塑性の制御」ワークショップ「器官形成・再生過程における上皮細胞による組織構築と修復のメカニズム」第36回分子生物学会年会2013年12月3日～6日 神戸ポートアイランド、神戸
14. 谷水直樹、三高俊広 Lineage plasticity of cholangiocytes and hepatocytes. 第20回肝細胞研究会2013年9月26日～27日 大阪国際会議場、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：小型肝細胞の継代培養方法  
発明者：三高俊広、石井雅之、市戸義久、谷水直樹、水口徹、平田公一  
権利者：札幌医科大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-16210  
出願年月日：2016年1月29日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学  
研究所組織再生学部門  
[http://web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue\\_Development\\_%26\\_Regeneration/Tissue\\_Development%26Regen.html](http://web.sapmed.ac.jp/canpath/Tissue_Development_%26_Regeneration/Tissue_Development%26Regen.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷水 直樹 (TANIMIZU Naoki)  
札幌医科大学・医学部・准教授