

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253023

研究課題名(和文) 肝臓の炎症・再生・病態を制御する細胞間相互作用

研究課題名(英文) Cellular interaction in liver inflammation and regeneration

研究代表者

宮島 篤 (Miyajima, Atsushi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：50135232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：種々の病因による肝炎から肝幹/前駆細胞の活性化を介した再生応答を、肝臓構成細胞間の相互作用に着目して解析を行った。炎症により肝前駆細胞の活性化を伴う胆管増生は胆管の増殖を伴うリモデリングであることを細胞系譜解析および肝臓の3次元構造の可視化法により示した。さらに、増殖性の胆管細胞は胆管の末端部に局在すること、増殖を始めた細胞の運命はstochasticに決まることを見いだした。また、肝臓でのサイトカインの過剰発現による新規肝線維化モデルを開発し、線維化誘導機構の一端を明らかにした。IL-4過剰発現により特徴的なNK細胞が出現することを見いだしその性状解析を行った。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at elucidating the cellular basis of liver inflammation and regeneration. Ductular reaction in chronic liver injuries is characterized by amplification of duct like cells. We developed novel methods for imaging and cell fact tracking to reveal the mode of remodeling of bile ducts. Proliferating duct cells were found to be localized at the periphery of the ducts and their fate was stochastically determined. We found that expression of Oncostatin M in the liver induces fibrosis without inflammation and using this system we revealed cellular interactions among liver cells, which lead to fibrosis. Over expression of IL-4 in the liver induces a distinct class of NK cells that possess strong cytotoxic activity against tumor cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：炎症 再生 線維化 サイトカイン イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は代謝や各種生体分子の合成機能の中心臓器であるとともに、腸管から外来物質や腸内細菌の菌体成分が流入する自然免疫系の前線基地でもある。代謝異常やウイルス感染、薬物等に起因する種々の肝障害により障害を受けた肝臓では、炎症反応の惹起と共に再生応答が誘導される。とりわけ、慢性的な障害・炎症時には、特殊な肝幹/前駆細胞 (LPC) を介する肝実質組織の再生機構が活性化される。一方で、持続的な炎症反応は星細胞や類洞内皮細胞の機能異常を伴った肝線維化や毛細血管化を引き起こし肝硬変や肝癌へと進行する。すなわち、肝臓における炎症反応、LPC 活性化、線維化の誘導ならびに発癌の間には密接な関連があると推察されるが、その実態は未だ大部分が不明なままである。従来の肝臓研究は特定の細胞にのみ注目した断片的なものが多く、肝臓を構成する細胞社会を俯瞰する研究は国内外問わず極めて少ない。肝疾患の発症メカニズムを明らかにするためには、肝臓を構成する細胞群を厳密に分離・同定した上での分子細胞生物学的な解析が必要とされていた。

## 2. 研究の目的

我々は、マウス肝臓の構成細胞に発現する膜タンパク質を多数同定し、それらに対する抗体を使って肝芽細胞(胎児肝前駆細胞)、肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、星細胞、中皮細胞を同定・分離する方法を確立してきた。そこで本研究では、こうした基盤技術を使い、肝臓を構成する細胞間の相互作用という視点から、種々の病因による肝障害発症と再生の機構、および肝炎から肝線維化を経て発癌へと進行するメカニズムの解明を目指す。肝硬変や肝癌の診断、予防、治療法を確立する上での基盤となる重要な知見をもたらすことが期待される。

## 3. 研究の方法

正常肝臓および障害肝臓において、細胞膜タンパク質の発現を指標にフローサイトメトリーにより細胞を分離して、遺伝子発現および細胞培養による機能解析を行った。また、肝臓内の位置情報を免疫組織染色やイメージング等により検討した。遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析と肝臓の3次元構造の可視化法により LPC の起源とその肝細胞および胆管への分化を *in vivo* で解析した。また、肝線維化における肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞など肝臓構成細胞をセルソータで分離培養して細胞間の *interaction* を解析するとともに単球および好中球の肝線維化に対する作用を検討した。さらに、病態モデルの作製のために、ヒト iPS 細胞から肝臓構成細胞への分化誘導系を開発した。

## 4. 研究成果

### (1) 胆管増生 (LPC) の解析

我々はすでに、FGF7 が LPC の増殖を誘導し、その産生細胞として門脈域の Thy1 陽性細胞であることを見いだしていたが、この細胞の詳細な解析を行い、星細胞とは明らかに異なる細胞であり、胆汁鬱滞により活性化されて collagen の産生促進と Timp1 の発現上昇により門脈域の線維化に寄与することを示した。

肝臓内の胆管を可視化する独自の技術を開発し、肝障害時における LPC の活性化を伴う胆管増生は胆管の増殖を伴う *remodeling* であることを示した。可視化技術に細胞系譜解析を組み合わせ、増殖性胆管細胞は胆管の末端部に局在すること、増殖を始めた細胞の運命は *stochastic* に決まることを見いだした。さらに、蛍光の胆汁酸を注入して二光子顕微鏡で胆汁の流れを *in vivo* で可視化する方法の開発に成功し、肝障害による *bile canaliculi* の崩壊と

胆管増生による胆汁の流れを捉えることにも成功した。

K1f5の欠損により細胆管反応が顕著に抑制されていた。詳細な解析を行ったところ、細胞増殖マーカーであるKi67陽性の胆管上皮細胞の割合が有意に低下していた。また、胆管上皮細胞由来の細胞株の培養系においても、K1f5のノックダウンにより増殖が抑制された。K1f5欠損マウスではDDC肝障害時に胆汁うっ滞の増悪が認められ、致死率が有意に上昇した。以上により、K1f5はDDC肝障害時に胆管上皮細胞の増殖を誘導することで細胆管反応を制御し、肝臓の恒常性維持に必須の役割を担う分子であることが示唆された。

肝細胞で産生された胆汁の排出路である胆管は、肝臓内に張り巡らされた肝内胆管と肝臓と十二指腸の間を結ぶ肝外胆管に分類される。近年、肝外胆管に肝細胞、胆管上皮細胞、膵内分泌細胞への分化能を有する **Biliary tree stem/progenitor cell (BTSC)** と呼ばれる組織幹/前駆細胞が存在することが報告された。BTSC は、肝外胆管に存在する付属線である **Peribiliary gland (PBG)** に存在すると考えられている。しかし、これまでBTSCの単離は、特定のマーカー分子を指標としない選択培養によって行われてきた。そのため、BTSCの存在部位がPBGであるという直接的な証拠は存在しない。また、BTSCの生理的意義についても未だに不明な点が多い。そこで本研究では、特定のマーカー分子を指標としたBTSCの単離法の確立とその生理的意義を明らかにすることを試みた。TROP2という膜タンパク質が肝外胆管の管腔を形成する上皮細胞(EH-BEC)で発現する一方、PBGでは発現していないことを見出した。そこで、TROP2を指標としてPBGとEH-BECを分離した後、平面培養によりコロニー形成能の比較を行った。その結果、

EH-BECと比較してPBG構成細胞は、コロニー形成能が有意に高いことが明らかとなった。

## (2) 線維化

肝臓で **Oncostatin M** を過剰発現すると、肝障害を誘導することなく線維化が進行する新たな線維化モデルを開発し、線維化のメカニズムを解析した。**Oncostatin M** は星細胞へ直接して **Timp1** の発現に作用するのみならずマクロファージを介して線維化誘導因子の発現を亢進して線維化を誘導する様子が明らかになった。さらに、慢性炎症に伴う線維化において、肝臓に好中球が集積すると **metalloproteinase, MMP** などの発現により線維溶解に寄与することを、**Trib1** 欠損マウス、肝臓での **CCL1** 発現による好中球の肝臓への遊走、好中球投与により示した。

## (3) 免疫

Th2 応答の開始因子として知られる **IL-4** を肝臓で発現すると、定常状態に存在するNK細胞とは明らかに異なる特徴的なNK細胞、**IL-4-induced NK細胞(B220<sup>high</sup>/CD11b<sup>low</sup>/IL-18R<sup>low</sup>; IL4-NK細胞)** を劇的に増加させることを見出した。IL4-NK細胞の増殖には、IL-4に応答し増殖したマクロファージが産生する **IL-15** が寄与していた。また、IL4-NK細胞は通常のNK細胞に比べて高い **IFN- $\gamma$** , **IL-10**, **GM-CSF** の産生能と強い細胞傷害活性を示す、活性化NK細胞であった。単離した通常のNK細胞を **IL-4** と **IL-15** を添加して培養することでIL4-NK細胞と類似したマーカー発現、機能が獲得されたことから、IL4-NK細胞の誘導に **IL-4** の直接的な刺激と **IL-15** を介した間接的な刺激が重要であることが示唆された。さらに、生理的なTh2応答を示す寄生虫感染において、IL-4依存的にIL4-NK細胞に類似したマーカー発

現を示す細胞が誘導されることが明らかになった。加えて、感染時に NK 細胞を除去した場合に、好酸球や好中球と言った Th2 応答誘導性の免疫細胞を誘引するケモカインの発現が低下したことから、寄生虫感染時に NK 細胞が過剰な Th2 応答を抑制していることが示唆された。

#### (4) iPS 細胞からの肝臓細胞分化誘導

肝臓病態モデルを構築する目的で、ヒト iPS 細胞から肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞を分化した。マウス胎児肝臓中の肝前駆細胞に Carboxy peptidase M (CPM) が発現することを見だし、これを指標にヒト iPS 細胞から肝臓への分化途中の段階から肝芽細胞を分離して培養するシステムを開発した。この CPM 陽性細胞は肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を保持したまま増幅が可能であった。肝細胞の成熟化をさらに促進するためには非実質細胞が必要であることを示し、ヒト iPS 細胞から類洞内皮細胞および星細胞の分化誘導系を樹立した。これらの細胞の共培養により、肝細胞の機能が増強されることを見いだした。

#### 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 10 件)

- ① Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A and Itoh T. Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology* 61(6):2056-66.2015; doi: 10.1002/hep.27685. 査読有り
- ② Kok C, Miyajima A, and Itoh T. Ductular reaction and liver progenitor cells. *J. Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2015 Jul;22(7):546-50. doi: 10.1002/jhbp.250. 査読有り
- ③ Inagaki N, Inagaki F, Kokudo N and Miyajima A. Cell-based therapy for preventing postoperative adhesion and promoting regeneration after hepatectomy. *J. Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2015 Jul;22(7):524-30. doi:

- 10.1002/jhbp.247. 査読有り
- ④ Kido T, Koi Y, Suzuki K, Kobayashi A, Miura Y, Chen Y-R, Tanaka M, and Miyajima A. CPM is a useful cell surface marker to isolate expandable bi-potential liver progenitor cells derived from human iPS cells. *Stem Cell Reports*. 5, 508-515, 2015. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.08.008 査読有り
- ⑤ Kaniwa T, Enomoto Y, Omi A, Miyata N, Ishiwata K and Miyajima A. NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 113, 10139-10144,2016. doi: 10.1073/pnas.1600112113 査読有り
- ⑥ Kamimoto K, Kaneko K, Kok C, Miyajima A and Itoh T. Heterogeneous and stochastic growth regulation of biliary epithelial cells dictate dynamic epithelial tissue remodeling. *eLife* 2016;5:e15034. DOI: 10.7554/eLife.15034. 査読有り
- ⑦ Tanaka M and Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflammation and Regeneration* 36:19, 2016. DOI 10.1186/s41232-016-0025-2. 査読有り
- ⑧ Yagai T, Matsui S, Harada K, Inagaki F, Saijou E, Miura Y, Nakanuma Y, Miyajima A and Tanaka M. Expression and localization of sterile alpha motif domain containing 5 is associated with cell type and malignancy of biliary tree. *PLOS One* e0175355. doi: 10.1371/journal.pone.0175355. 査読有り
- ⑨ Katsumata L, Miyajima A, and Itoh T. Portal fibroblasts marked by the surface antigen Thyl contribute to pathogenesis of liver fibrosis in mouse models of cholestatic liver injury. *Hepatology Communications* 1,198–214, 2017, DOI:10.1002/hep4.1023 査読有り
- ⑩ Tanimizu N, Kaneko K, Itoh T, Ishii M, Mizuguchi T, Hirata K, Miyajima A, and Mitaka T. Intrahepatic bile ducts are developed through formation of homogeneous continuous luminal network and its dynamic rearrangement. *Hepatology* 64, 175-188, 2016. doi: 10.1002/hep.28521. 査読有り

[学会発表] (計 35 件)

- ① Kenji Kamimoto, Kota Kaneko, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima, Stochastic conversion of the growth mode of biliary epithelial cells controls tissue remodeling in regenerating mouse liver, Keystone Symposia 2016, Stem Cells and Regeneration in

- Digestive Organs, 2016. 3. 13, Colorado, USA
- ② Kiniwa T, Enomoto Y, Omi A, Miyajima A, Interleukin 4 induces a unique NK cell population in vivo and in vitro, IMMUNOLOGY 2015 AAI Annual Meeting 2016. 5. 11, New Orleans, USA
- ③ 松井理司、田中稔、宮島篤、マウス肝外胆管からの Biliary Tree Stem/Progenitor Cell (BTSC) の単離・同定とその性状解析、BMB 2015 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ④ 岡田甫、金子洗太、神元健児、勝又廉、山田みなみ、コック シンディ、依馬正次、宮島篤、伊藤暢、The transcription factor Klf5 regulates biliary epithelial tissue growth in liver regeneration upon cholestatic injury、第 14 回 幹細胞シンポジウム 2016. 5. 20 淡路夢舞台 (兵庫県淡路市)
- ⑤ Kamimoto K, Kaneko K, Kok CY, Itoh T, Miyajima A, Heterogeneity and stochastic growth regulation of biliary epithelial cells dictate dynamic epithelial tissue remodeling, Frontiers 2016 Symposium, 2016. 12. 7. Lausanne, Swiss
- ⑥ Michitaka Matsuda, Atsushi Miyajima, Minoru Tanaka. Oncostatin M plays a crucial role in liver fibrogenesis by regulating cooperation between hepatic stellate cells and macrophages. AASLD The liver meeting 2016. 2016. 11. 14, Boston, USA
- ⑦ 松井理司、宮島篤、田中稔. TROP2 を指標とした胆道系幹/前駆細胞 (BTSC) の同定. 第 89 回 日本生化学会大会 2016. 9. 26 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)
- ⑧ 厚井悠太、木戸丈友、大山裕棋、Chen Shin-Wei、宮島篤、ヒト iPS 細胞由来肝非実質細胞の樹立、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/7-9 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ⑨ Kiniwa T, Enomoto Y, Omi A, Miyajima A. A unique subset of NK cells induced by IL-4 during Th2 responses. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2016. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑩ 木戸丈友、厚井悠太、小林彩香、大山裕棋、田中稔、宮島篤、ヒト iPS 細胞由来 CPM 陽性肝前駆細胞からの成熟肝細胞の誘導、第 15 回日本再生医療学会総会 2016. 3. 17-19 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

〔図書〕 (計 1 件)

Itoh T, Kok C., Takase H, and Miyajima A. Liver Stem Cells. Regenerative Medicine: from Protocol to Patient. 2. Stem Cell Science and Technology (Springer International Publishing) pp201-240, 2016. Doi: 10.1007/978-3-319-27610-6\_8

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 肝細胞及び肝非実質細胞、並びにそれらの調製方法  
 発明者: 宮島篤、木戸丈友、厚井悠太、小林彩香  
 権利者: 国立大学法人東京大学  
 種類: 特許  
 番号: PCT/JP2016/58411  
 出願年月日: 2016 年 3 月 16 日  
 国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ:  
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/miyashima/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮島篤 (MIYAJIMA Atsushi)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
 研究者番号: 50135232

(2) 研究分担者

該当無し ( )

(3) 連携研究者

田中稔 (TANAKA Minoru)  
 国立国際医療研究センター・室長  
 研究者番号: 80321909

伊藤暢 (ITOH Tohru)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
 研究者番号: 50396917

榎本豊 (ENOMOTO Yutaka)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号: 20608210

木戸丈友 (KIDO Taketomo)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号: 00401034

西條栄子 (SAIJOU Eiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・技術専門員  
 研究者番号: 60376647