

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19579001
 研究課題名（和文） 3次元培養を用いた肝臓の胆管チューブ構造形成の分子メカニズムの解析
 研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms governing tubular morphogenesis of hepatic bile ducts using three dimensional culture
 研究代表者
 谷水 直樹（Naoki Tanimizu）
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
 研究者番号：00333386

研究成果の概要：肝臓の胆管のチューブ構造は、様々な上皮系臓器に共通する組織構造である。本研究では、肝芽細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現を比較することで、胆管チューブ構造の形態形成を制御する分子の候補を得た。また、このような分子の機能を詳細に検討するために、*in vitro* において肝前駆細胞から胆管様のチューブ構造を誘導する系を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：肝臓 胆管 形態形成 組織形成 チューブ構造 肝前駆細胞 サンドウィッチ培養

1. 研究開始当初の背景

胆管が形成するチューブ構造は、肝臓の他に肺、膵臓、腎臓などの上皮系臓器に共通に存在している組織構造である。

しかしながら、その形態形成の分子メカニズムは明らかになっていなかった。肝臓では、細胞特異的な表面抗原の同定が他の固形臓器に比べて進んでおり、チューブを形成する細胞である胆管上皮細胞を分取することが可能であった。そこで、胆管上皮細胞特異的な遺伝子を同定することで、胆管の形態形成の分子メカニズムを明らかにすることができる

のではないかと考えた。

2. 研究の目的

胆管上皮細胞と肝芽細胞（前駆細胞）をマウス胎児および新生児より分離し、遺伝子発現を比較することで、チューブ構造形成を制御する遺伝子の候補を探索することにした。さらに、本研究代表者によって確立された肝前駆細胞の3次元培養系を改良して *in vitro* で胆管様チューブ構造を誘導する系を確立することで、遺伝子発現解析によって得られた遺伝子の機能解析を *in vitro* で行うことを可能にし、胆管の形態形成を制御する分子メ

カニズムを詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイを用いて胎児の肝芽細胞と新生児の胆管上皮細胞を比較することで、チューブ構造の形成過程で胆管上皮細胞に特異的に発現している遺伝子を探索する。また、マイクロアレイの結果得られた遺伝子群の発現を定量 PCR によって確認する。

(2) *in vitro* において、肝前駆細胞から胆管様のチューブ構造を誘導する培養系を確立する。

4. 研究成果

(1) 胆管上皮細胞特異的な遺伝子の同定

マイクロアレイの結果の解析

肝芽細胞と胆管上皮細胞の比較を行った結果、新生児の胆管上皮細胞特異的に発現している遺伝子を複数得た。

発現パターンをもとに3つのグループに分類することができた(図1)。それぞれの遺伝子群の機能としては、肝芽細胞から胆管上皮細胞への運命決定を制御する(グループ1)、胆管の形態形成を制御する(グループ2)、との両方を制御する(グループ3)ことが考えられた。次に、グループ2に属する遺伝子群については、定量 PCR を行うことで胆管上皮細胞での特異的な発現を確認した。

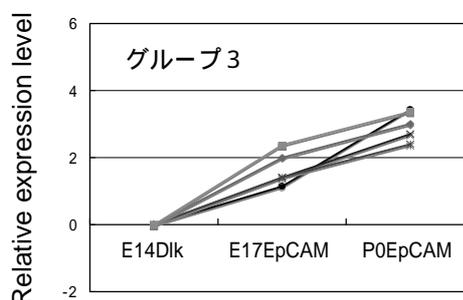
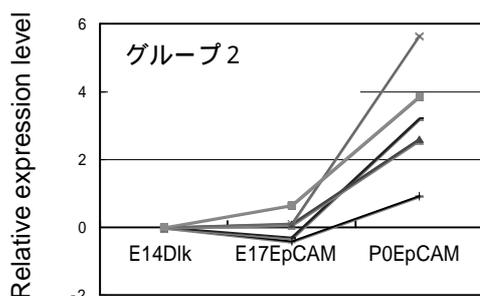
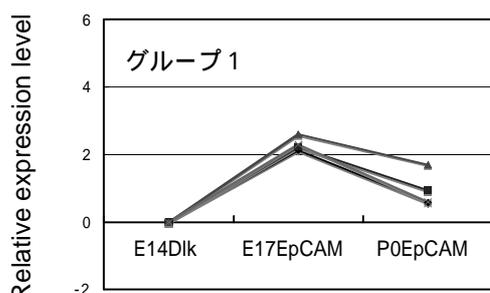


図1、胆管上皮細胞に発現する遺伝子の発現パターン

Sox9 の発現パターンの解析

上記グループ2に属する転写因子に Sox9 があつた。Sox9 は軟骨の発生を制御していることや膵臓で発現していることなどが知られていたが、肝臓での発現については報告がなかった。そこで、市販の抗体を購入し、新生児肝臓での発現パターンを解析した。その結果、Sox9 は胆管上皮細胞の核に局在していることが明らかになった。

Map17 の発現パターンの解析

上記グループ2に属する膜タンパク質として Map17 を同定した。Map17 は腎臓での発現などが調べられていたが、肝臓での発現パターンは不明であった。そこで市販の抗体を購入し、新生児および成体肝臓での発現パターンを解析した。その結果、成熟した胆管構造において、Map17 は細胞のアピカル面に局在していることが明らかになった。

(2) *in vitro* での胆管様のチューブ構造の誘導

シストからのチューブ構造の誘導

肝前駆細胞 HPPL は、3次元培養を行うことで、成熟した胆管上皮細胞と同様な極性と分泌機能を獲得する。このシスト構造からのチューブ構造の誘導を試みた。HGF, FGF, TGFb などの液性因子の影響や、マトリックスをマトリゲルからコラーゲンへ変換するなどの条件を検討した。

その結果、シストをマトリゲルから取り出しコラーゲンに包埋した後に高濃度の HGF で処理することで、チューブ状構造を誘導することに成功した。しかしながら、その効率は非常に低かった。

サンドウィッチ培養系の確立

発生中の肝臓では、門脈周囲に形成される

ductal plate と呼ばれる細胞層がチューブ構造に再構成されることで胆管が形成される。そこで、肝前駆細胞株 HPPL を培養して monolayer を形成させた後、細胞外マトリックスを重層する培養方法（サンドウィッチ培養）を行い、胆管様のチューブ構造を誘導することができるかどうかを検討した。その結果、ゲルを重層して2日後には、F-actin に裏打ちされたチューブ構造のネットワークが形成されることがわかった（図2）。この系を用いて、チューブ構造形成には、細胞増殖は必要ないが PI3K/Akt シグナル伝達系依存的な細胞の migration が必須であることを明らかにした。また、転写因子 HNF1b は肝腔構造の形成および拡張に重要な役割を担っていることも明らかにした。サンドウィッチ培養は、生体内での胆管の形態形成の特徴のうち、単層の細胞層がチューブ構造に再構成される、細胞増殖を伴わずにチューブ構造が形成される、の2点を再現していた。したがって、胆管様の構造の形成過程の分子メカニズムを解析するために有用な培養系であるとともに、胆管形成が異常となる疾患（一般に ductal plate malformation と呼ばれる）の原因を探るためにも有用なツールとなることが期待できる。

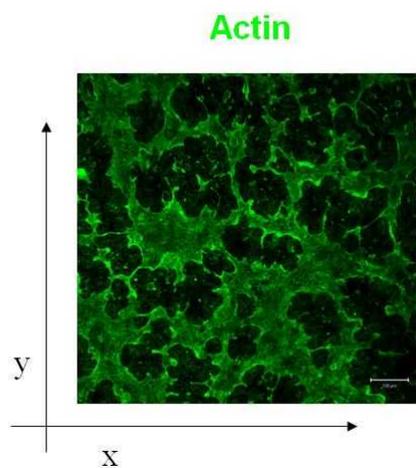


図2、サンドウィッチ培養において形成されるネットワーク状のチューブ構造

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 2件)

谷水 直樹、宮島 篤、Keith Mostov
 “Liver Progenitor Cells Fold Up a Cell Monolayer into a Double-layered Structure during Tubular Morphogenesis.”
 Molecular Biology of the Cell

掲載巻及び項は未定、2009年、
 査読有

谷水 直樹、宮島 篤、Keith Mostov
 “Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture.”
 Molecular Biology of the Cell
 18巻、1472 - 1479、2007年、
 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

谷水 直樹
 「肝臓の胆管上皮細胞の形態形成における細胞 細胞外マトリックス間相互作用の解析」
 生命科学ネットワークシンポジウム
 平成20年9月23日
 東京大学工学部2号館

谷水 直樹
 “Liver progenitor cells differentiate to functional cholangiocytes in three dimensional culture”
 FASEB summer research conferences
 平成20年8月5日
 Snowmass, Colorado, USA

谷水 直樹
 「肝前駆細胞の3次元培養を用いた胆管の管腔形成の分子メカニズムの解析」
 第15回肝細胞研究会
 平成20年6月28日
 静岡県男女共同参画センター「あざれあ」

谷水 直樹
 「肝前駆細胞の3次元培養を用いた胆管形態形成の分子メカニズムの解析」
 第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会 合同学術集会
 平成20年5月29日
 こまばエミナース

谷水 直樹
 「肝前駆細胞の3次元培養を用いた胆管形態形成の分子メカニズムの解析」
 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会
 平成19年12月
 パシフィコ横浜

谷水 直樹
 「肝前駆細胞株の3次元培養を用いた胆管形態形成の分子メカニズムの研究」
 第10回日本組織工学会
 平成19年11月8日

大手町サンケイプラザ

谷水 直樹
「3次元培養中での肝前駆細胞の胆管上皮細胞への分化」
第14回肝細胞研究会
平成19年6月23日
城山観光ホテル

〔図書〕(計 1件)

谷水 直樹、宮島 篤
“Molecular mechanism of liver development and regeneration.”
International Review of Cytology
259巻、1 - 48、2007年

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷水 直樹 (Naoki Tanimizu)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

(2)研究分担者

西条 栄子 (Eiko Saijo)
東京大学・分子細胞生物学研究所・技術職員

(3)連携研究者

なし