

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：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22249011

研究課題名（和文） 発生・病態における肝幹細胞を中心とする細胞間相互作用

研究課題名（英文） Cellular interaction in liver development and pathogenesis

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

研究成果の概要（和文）：

肝臓は再生能を備えたユニークな臓器として知られている。本研究では、肝臓の一部を切除した後の肝再生においては、肝細胞が肥大することが重要であることを示し、従来の再生モデルに大幅な修正を加えた。また、炎症を伴う肝障害においては、しばしば門脈域に肝前駆細胞の出現することが知られている。本研究により、肝前駆細胞の出現には FGF7 が必要であること、肝前駆細胞の出現が肝障害からの回復に重要であることを明確にした。

研究成果の概要（英文）：

Liver is a unique organ with an extraordinary capacity to regenerate. This study showed importance of cellular hypertrophy of hepatocytes and proposes a revised model of liver regeneration after partial hepatectomy. Liver progenitor cells develop around the portal veins in some types of liver injuries, we found that FGF7 is essential for the induction of liver progenitors, and that they are important for the recovery from the liver injuries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2011 年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2012 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
年度			
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：発生、再生、肝炎、線維化、細胞増殖、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

肝臓では、肝機能を担う肝細胞が中心静脈から周囲に放射状に配列し、その間を類洞

と呼ばれる肝特有の毛細血管が走っている。類洞は、有窓構造をもつ特殊な類洞内皮細胞と肝星細胞から構成される。胆管は肝細胞より産生される胆汁を十二指腸に排する。

肝細胞と胆管上皮細胞は、発生過程において共通の前駆細胞である肝芽細胞から分化する。また、肝臓の表面は中胚葉由来の肝中皮細胞からなる一層のシートに覆われている。このように、肝臓は種々の細胞から構成され、それらの相互作用を通じて、極性を持った肝細胞の索構造、類洞構造、胆管の管腔構造など特有の構造を形成して機能を発現する。しかし、従来の肝臓の発生・分化の研究は、特定の細胞にのみ注目した断片的なものが多く、細胞間相互作用を基盤とする肝臓の細胞社会全体を俯瞰する研究は国内外問わずほとんど行われていなかった。また、成体肝臓において持続的な肝障害が生じると、肝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が引き起こされ、肝硬変や肝癌へと進行する。こうした肝疾患の発症メカニズムを明らかにする上でも、肝臓を構成する細胞社会全体を俯瞰した研究が必須である。

そのためには、肝臓を構成する個々の細胞群を厳密に分離・同定した上で分子細胞生物学的な解析が求められる。しかし、従来の肝臓研究では、細胞の同定・分離技術が不十分であり、未だに肝細胞を実質細胞、その他の細胞を一括りに非実質細胞とする旧来の分類が頻用されていることが、肝臓学の現状を如実に表している。我々はこの点にいち早く着目し、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て、それらに対する抗体を使って肝芽細胞、肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、肝星細胞、肝中皮細胞を厳密に同定・分離する方法を確立してきた。さらに、分離した肝臓構成細胞の初代培養系を確立し、肝臓分化に関与するサイトカイン、細胞膜分子、シグナル伝達系、転写因子などの解析を行ってきた。こうした細胞の分離法と培養系を基盤技術として、本研究では胎児肝と成体肝における肝幹細胞および肝非実質細胞の動態を中心に以下の課題に取り組む。

2. 研究の目的

肝臓は体内における最大の臓器で、生命活動の維持に必須の各種の代謝、解毒、胆汁の産生、血清タンパク質の産生などの様々

な機能を担っている。しかし、その重要性にも関わらず、肝臓の発生・分化および恒常性維持・肝疾患発症の機構については未だ不明な点が多く残されている。その原因の一つとして、これまでの研究は特定の細胞や分子のみに着目した限局的なものが大半であった点が挙げられる。本研究では、肝臓の発生・分化、成体肝臓における病態と障害からの再生機構を中心に、肝臓構成細胞間の相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、申請者がこれまでに独自に開発してきた肝臓構成細胞の分離・培養法を基盤技術として遺伝子改変マウスを使い、肝臓の発生および病態に関わる分子メカニズムを、肝幹細胞を中心とした各種肝臓構成細胞間での相互作用という視点から統一的に理解することを目指す。

4. 研究成果

肝臓は再生能をもつユニークな臓器であり、マウスでは、肝臓の70%を切除しても1週間程度で元の肝重量に回復する。この肝再生過程においては、肝幹/前駆細胞は関与せず、残存する肝細胞が分裂すると一般には考えられていた。我々はこの課題を、細胞のイメージング解析と遺伝的系譜解析を用いて再検討し、この再生は単純な残存肝細胞の分裂ではなく、細胞分裂とともに肝細胞の肥大化が再生に重要であるとの結果を得た。すなわち、30%部分肝切除では細胞肥大のみで肝再生が起こり、70%部分肝切除においてもまず細胞肥大が起こり、細胞増殖はその後に始まることから、細胞肥大が肝切除からの修復には重要であることが示された。さらに、70%肝切除後に細胞周期に入った肝細胞の一部のみがM期に入るために、ploidyが増大することなど再生時における肝細胞のユニークな細胞周期制御が明らかとなった。

一方、重篤な肝障害時には、肝細胞および胆管上皮細胞への二分能をもつ増殖性の肝前駆細胞（オーバル細胞）が出現する。しかしながら、オーバル細胞の

起源や性状、その動態を制御するシグナルの実体と作用機序については、ほとんど不明である。一般的に、幹/前駆細胞はニッチと呼ばれる微小環境により制御を受けており、オーバル細胞にもニッチを提供している細胞が存在すると想定される。我々は、DDC食餌投与によるマウス肝障害モデルにおいて、Thy1陽性細胞が門脈域周辺で増加し、オーバル細胞と近接して存在することを見出した。一方で、オーバル細胞誘導肝において発現が強く誘導されるサイトカインとしてFGF7を同定した。肝臓の細胞を分画し定量的PCR法を用いて解析したところ、Thy1陽性細胞がFGF7を、オーバル細胞がFGF7の受容体であるFGFR2bを、それぞれ特異的に発現していることが判明した。さらに、FGF7ノックアウトマウスではDDCなどによる肝障害によりオーバル細胞の出現が劇的に低下していた。一方、肝臓特異的にFGF7を発現するトランスジェニックマウスでは肝障害がなくてもoval細胞が出現し、FGF7の強制発現は肝障害を緩和した。従って、oval細胞の誘導にはFGF7が必要且つ十分であること、oval細胞は肝障害からの回復に重要であることが明確に示された。

オンコスタチンM受容体欠損マウスは肝障害に対する感受性が高く、さらに高脂肪食により肥満/脂肪肝になる減少を詳細に解析し、OSMはマクロファージのフェノタイプを炎症性サイトカイン(TNF α)産生型のM1マクロファージから抗炎症性サイトカイン(IL-10)産生型のM2マクロファージへとスイッチすることでIRを改善していることを示唆する結果を得た。

肝臓の発生過程において、肝中皮細胞が肝細胞の増殖促進因子を産生して臓器形成に積極的に関与することを見いだしているが、さらに胎児肝臓造血において、中皮組織やそれに由来する肝星細胞などが関与する可能性を示した。

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 17 件)

1. Miyaoka Y., Tanaka M., Imamura T., Takada S. and Miyajima A. A novel regulatory mechanism for FGF18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and Delta-like protein (Dlk). *Development* 137, 159-167, 2010. (査読あり)
2. Onitsuka I., Tanaka M., and Miyajima A. Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* 138, 1525-1536, 2010. (査読あり)
3. Yamauchi S., Ito H., and Miyajima A. I κ B η , a nuclear I κ B protein, positively regulates the NF- κ B-mediated expression of pro-inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 11924-11929, 2010. (査読あり)
4. Yanai H., Nakura K., Hijioka S., Kamei A., Ikari T., Ishikawa, Y., Shinozaki E., Mizunuma N., Hatake K., and Miyajima A. Dlk-1, a cell surface antigen on hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J. Biochem.* 148, 85-92, 2010. (査読あり)
5. Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N. and Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* 149, 231-239, 2011. (査読あり)
6. Miyaoka Y., Kato H., Ebato K., Saito S., Miyata N., Imamura T., and Miyajima A. Retention in the Golgi apparatus and expression on the cell surface of Cfr/Esl-1/Glg-1/MG-160 are regulated by two distinct mechanisms. *Biochemical Journal.* 44, 33-41, 2011. (査読あり)

り)

7. Tsukahara Y., Tanaka M. and Miyajima A. TROP2 expressed in the trunk of the ureteric duct regulates branching morphogenesis during kidney development. *PLoS One* 6, e28607, 2011. (査読あり)

8. Hirose Y., Saijou E., Sugano Y., Takeshita F., Nishimura S., Nonaka H., Chen Y.-R., Sekine K., Kido T., Nakamura T., Kato S., Kanke T., Nakamura K., Nagai R., Ochiya T. and Miyajima A. Inhibition of Stabilin-2 elevates the circulating hyaluronic acid level and prevents tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 4263-4268, 2012. (査読あり)

9. Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012. (査読あり)

10. Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012. (査読あり)

11. Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A. α 1- and α 5-Containing laminins regulate the development of bile ducts via β 1-integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586-28597, 2012. (査読あり)

12. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T.,

Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013. (査読あり)

13. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development* 27, 169-181, 2013. (査読あり)

[学会発表] (計 64 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称: NAFLD の進展度合いを判定する方法

発明者: 寺井崇二、大石俊之、坂井田功、

桑代紳哉、宮島篤

権利者: 山口大学, 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-128364

出願年月日: 平成 22 年 6 月 4 日

国内外の別: 日本

名称: オンコスタチンM受容体シグナリン

グ制御によるメタボリック症候群の治療

発明者: 森川吉博、宮島篤、田中稔、小森忠祐

権利者: 和歌山県立医科大学, 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-208354

出願年月日: 2011 年 9 月 26 日

国内外の別: 日本

名称: 非アルコール性脂肪肝炎モデル非ヒ

ト哺乳動物及びその作製方法

発明者: 宮島篤、田中稔

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-144737

出願年月日: 2012 年 6 月 28 日

国内外の別: 日本

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

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

該当なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 稔 (TANAKA MINORU) (東京大学・分子
細胞生物学研究所・准教授)

研究者番号：80321909

伊藤 暢 (ITO TOHRU) (東京大学・分子細胞
生物学研究所・講師)

研究者番号：50396917

宮岡佑一郎 (MIYAOKA YUICHIRO) (東京大学・
分子細胞生物学研究所・助教)

研究者番号：20549521

西條 栄子 (SAIJOU EIKO) (東京大学・分子
細胞生物学研究所・技術職員)

研究者番号：60376647