

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590342

研究課題名(和文) FGFシグナルを軸とした細胞間相互作用による肝臓の再生と病態の制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanisms for liver regeneration and pathogenesis based on the intercellular signaling network

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な障害を受けた肝臓では、未分化性を有する特殊な幹/前駆細胞(肝前駆細胞)が出現して、再生過程に寄与すると考えられている。しかしながら、肝前駆細胞の誘導・増殖・分化を制御する分子機構の詳細や、これと肝線維化や肝がん等の病態との関連の実態や機序は不明である。種々のマウス肝障害モデルを用いた、FGF7を中心とする細胞間相互作用に着目した解析により、肝前駆細胞の動態を制御する新たなシグナル伝達経路や転写因子の存在を明らかにした。また、肝前駆細胞と肝線維化との相互連関の基盤を成すメカニズムの一旦を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In severely damaged livers where hepatocyte proliferation is impaired, facultative liver stem/progenitor cells (LPCs) proliferate and are considered to contribute to the regenerative process. We sought to elucidate the detailed underlying mechanisms for LPC regulation as well as those connecting the LPC response and liver pathologies such as fibrosis and tumorigenesis, by focusing on the intercellular signaling network involving FGF7. We have newly identified several molecules that play critical roles in LPC regulation, including extracellular signals and a transcription factor. We have also found a cell population that coordinately regulates both the LPC induction and fibrogenic response, thereby revealing a part of the mechanisms linking these two cellular responses in injured liver.

研究分野：肝臓における障害と再生の制御メカニズム

キーワード：再生医学 シグナル伝達 肝臓 組織幹細胞 細胞・組織 線維化

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体における代謝機能の中心的な役割を担っており、生命活動の維持に必須の重要な臓器である。肝臓は、腸管から門脈血を介して流入する種々の化学物質や薬物、毒物等に起因する障害に常に晒されており、このため、哺乳動物の臓器としては例外的に、きわめて高い再生能力を有している。障害を受けた肝臓では、通常は残存する肝細胞（実質細胞）が分裂・肥大することで再生して機能を回復させる。一方で、重篤あるいは慢性的な障害を受けた肝臓では、未分化性を有する特殊な肝前駆細胞（オーバル細胞、liver progenitor cells）が活性化し、これが肝細胞や胆管上皮細胞へと分化することで再生に寄与すると考えられている。近年、肝前駆細胞の性状に関する理解が進みつつあるものの、その誘導・増殖・分化を制御する分子機構については未だ明らかとなっていない点が多く残されていた。また、肝前駆細胞は肝臓における線維化や発がん等の病態との密接な関連が予てより指摘されてきたものの、その実態や機序についても不明であった。

我々は、本研究課題の先行研究において、肝前駆細胞の制御に関わるシグナル分子として FGF7 を同定した。肝障害時に、細胞表面抗原 Thy1 を発現する間葉系細胞（以下、Thy1+細胞）が活性化され、これにより産生される FGF7 が肝前駆細胞の誘導・増殖にきわめて重要な役割を担うことを示した。すなわち、肝前駆細胞に対する「ニッチ」細胞の存在、および、両者の相互作用における制御シグナルの実体が明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、種々のマウス肝障害モデルを用いて、FGF7 を中心としたシグナルネットワークによる細胞間相互作用という視点からの解析により (1) 肝前駆細胞の誘導・増殖・分化を制御する分子機構を明らかにすること、および (2) 肝前駆細胞と肝線維化や肝がん等の病態との関連の実態や機序を明らかにすること、を目的とした。

### 3. 研究の方法

マウスにおいて肝前駆細胞が誘導される慢性肝障害モデルとして、肝毒素である 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) の含有食餌投与、コリン欠乏エチオン添加 (CDE) 食餌投与、チオアセトアミド (TAA) 飲水投与、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 頻回投与等の系を用いた。肝前駆細胞や、他の各種肝臓構成細胞群の性状・動態を、免疫組織化学染色法 / 蛍光免疫染色法や、特異的な細胞表面抗原に対する抗体を用いたフローサイトメトリー法等により解析した。特に、肝前駆細胞の動態を 3 次元レベルで観察するために、我々が独自に開発したマウス胆管系の可視化法を活用した。また、肝臓全体あるいは特定の細胞群における遺伝子発現パ

ターンについて、定量的 PCR 法により解析した。

FGF7 をはじめとする種々のサイトカイン・増殖因子やシグナル伝達経路構成因子、転写因子の、マウス肝臓における機能を個体レベルで解析するために、各種遺伝子欠損あるいはトランスジェニックマウスシステムを入手・交配・作製した。また、成体マウス肝臓への直接的遺伝子導入・発現系として、Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法や、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター系を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 肝前駆細胞の誘導・増殖・分化を制御する分子機構

肝前駆細胞に対して作用するシグナル経路として、新たに Notch シグナルを同定した。DDC 肝障害モデルにおいて、Thy1+細胞および他の細胞種が Notch リガンド Jagged1 を発現しており、Notch シグナルは肝前駆細胞の増殖を促進する作用があることを明らかにした。

これまでの研究により、FGF7 および TWEAK は、それぞれ単独で肝前駆細胞反応を誘導する活性を持つことが示唆されていた。今回、我々が独自に確立した胆管 / 肝前駆細胞系の 3 次元構造の可視化法を用いた解析により、両者の生理活性の違いを明らかにした。

肝前駆細胞の誘導・増殖に関わる重要な因子として、転写因子 F を新たに同定した。この転写因子は、肝前駆細胞自身に発現していた。転写因子 F を肝臓特異的に欠損するマウスを作成して解析を行った結果、DDC 肝障害モデルにおいては肝前駆細胞の誘導がほぼ完全に抑制されており、障害の増悪化と個体の致死がもたらされた。このときの転写因子 F の機能として、肝前駆細胞の増殖に関与することが明らかとなった。また、肝前駆細胞を含む胆管上皮組織の構造変化にも関与する可能性が見出された。一方で、DDC とは異なる種類の肝障害モデルにおいては、転写因子 F を欠損しても肝前駆細胞の誘導には顕著な影響が認められなかった。以上のことから、肝障害の種類に応じて、「肝前駆細胞」と呼ばれる細胞集団の性状・誘導機構が異なることを明らかにした。

また、この転写因子 F によって発現誘導される何らかのシグナル分子が、肝前駆細胞と、その周囲に集積する炎症性細胞（血液細胞）との相互作用を介して肝前駆細胞反応の促進に関わる可能性も見出した。

#### (2) 肝前駆細胞と肝線維化や肝がん等の病態との関連

先行研究において、マウス生体肝臓で FGF7 を強制発現させることで、肝前駆細胞の誘導・増殖を促進可能であることを既に明らかにしている。このときの肝臓における線維

化の誘導を検討したところ、人為的に誘導された肝前駆細胞の周囲ではコラーゲン線維の集積が認められた。これにより、肝前駆細胞が自身の周辺微小環境を自律的に構築・制御している可能性が示唆された。一方で、肝臓全体では線維質の有意な蓄積は認められなかったことから、将来的に FGF7 の治療への応用を進める上では線維化誘導への副作用は回避可能であると考えられた。

肝前駆細胞反応に伴って発現が誘導される炎症性サイトカイン T を新たに同定した。この分子を欠損するマウスでは、種々の肝障害モデルにおける線維化の誘導が顕著に抑制されている一方、これを肝臓で強制的に発現させることで線維化が誘導された。以上により、サイトカイン T が肝線維化誘導に重要な役割を担う分子であることが明らかとなった。

遺伝子発現パターンの詳細な検討から、このサイトカイン T は Thy1+細胞において発現することを見出した。すなわち、Thy1+細胞は、FGF7 の産生を介した肝前駆細胞反応誘導と、サイトカイン T の産生を介した肝線維化誘導を、共に制御するハブとなる細胞種であることが示唆された。これにより、肝前駆細胞反応と肝線維化との相互連関の基盤を成すメカニズムの一旦が明らかとなった。

#### 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 6 件)

Cindy Yuet-Yin Kok, Atsushi Miyajima, and Tohru Itoh (2015). Adaptive remodelling of the biliary tree: the essence of liver progenitor cell expansion. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, in press (Epub ahead of print) 査読有 DOI: 10.1002/jhbp.250.

Kota Kaneko, Kenji Kamimoto, Atsushi Miyajima, and Tohru Itoh (2015). Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology*, Vol.61, pp.2056-2066. 査読有 DOI: 10.1002/hep.27685.

Atsushi Miyajima, Minoru Tanaka, and Tohru Itoh (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, Vol.14, pp.561-574. 査読有 DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.010.

Tohru Itoh and Atsushi Miyajima (2014).

Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology*, Vol.59, pp.1617-1626. 査読有 DOI: 10.1002/hep.26753.

Keiko Taguchi, Ikuo Hirano, Tohru Itoh, Minoru Tanaka, Atsushi Miyajima, Akira Suzuki, Hozumi Motohashi, and Masayuki Yamamoto (2014). Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.34, pp.900-913. 査読有 DOI: 10.1128/MCB.01384-13.

Hinako M. Takase, Tohru Itoh, Seitaro Ino, Ting Wang, Takehiko Koji, Shizuo Akira, Yasuhiro Takikawa, and Atsushi Miyajima (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes & Development*, Vol.27, pp.169-181. 査読有 DOI: 10.1101/gad.204776.112.

[学会発表](計 9 件)

伊藤 暢、肝臓の再生の基盤となる胆管上皮組織のリモデリング、第 87 回 日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館(京都市・左京区)

Tohru Itoh、Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration、FASEB Summer Research Conferences / Liver Biology: Fundamental Mechanisms and Translational Applications、2014 年 7 月 8 日、Keystone (U.S.A.)

伊藤 暢、胆管系の構造と機能の可視化、第 21 回 肝細胞研究会、2014 年 6 月 28 日、東京医科歯科大学 M&D タワー 2 階 鈴木章夫記念講堂(東京都・文京区)

伊藤 暢、肝前駆細胞反応を制御するメカニズム、第 19 回 日本肝臓医生物学研究会(プロメテウスの会) 2013 年 11 月 30 日、北海道大学医学部 臨床講義棟第 3 講堂(札幌市・北区)

Tohru Itoh、Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration、The 20th Annual Meeting

of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells (第20回肝細胞研究会)、2013年9月26日、大阪国際会議場(大阪市・北区)

伊藤 暢、FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease" (B7)、2013年2月28日、Banff (Canada)

伊藤 暢、Critical role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell response and regeneration in diseased mouse livers、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場・マリノメッセ福岡(福岡市・博多区)

伊藤 暢、Notchシグナルによる成体肝前駆細胞反応の制御、第19回肝細胞研究会、2012年6月29日、札幌医科大学臨床教育研究棟講堂(北海道・札幌市)

伊藤 暢、Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers、International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting、2012年6月14日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

#### [図書](計2件)

Tohru Itoh, Hinako Takase, Minoru Tanaka, and Atsushi Miyajima (2013). Chapter 13, Liver stem cells, pp. 337-363. In Steinhoff, G. (ed.), *Regenerative Medicine: From Protocol to Patient, 2nd edition*. Springer. ISBN 978-94-007-5689-2.

高瀬 比菜子、伊藤 暢、宮島 篤(2012). 「4.1 肝臓の発生・分化制御機構」日本再生医療学会監修/後藤満一・大橋一夫編、*代謝系臓器(再生医療叢書5)* 2012年10月15日 ISBN 978-4-254-36075-2.

#### [その他]

伊藤 暢、宮島 篤(2013). 「肝臓の再生を担う肝前駆細胞とその制御機構(Regulatory mechanisms for adult liver progenitor cells that support liver regeneration)」*領域融合レビュー*, 2: e007.

査読有

DOI: 10.7875/leading.author.2.e007

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/cytokine/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 暢 (ITOH, Tohru)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師  
研究者番号: 50396917