

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19368

研究課題名(和文) マウス胎生期肝前駆細胞における成熟メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of mechanisms that induce maturation of murine foetal liver progenitor cells

研究代表者

安齋 和也 (ANZAI, Kazuya)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20724941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎生期肝前駆細胞をゼラチンコート平面培養皿にて7日間培養することで、増殖能を保持した胆管系シストに分化できる胆管前駆細胞が誘導できた。しかし、肝成熟因子であるHGFやOSMの影響によりこの誘導が阻害されることが分かった。またこの胆管前駆細胞はin vivoで7日間成熟して得られる新生児LPCsと同様の胆管系分化能を持つことから、in vitroでのLPCsの成熟がin vivoでの成熟を模倣していることが示唆された。本研究で見出した培養系を用いることで、胆管前駆細胞における成熟過程やシグナル伝達経路の解析を行い、Grhl2を強制発現することで胆管様シスト形成能を向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that cholangiocytic progenitor cells could be induced from foetal LPCs by culturing them on gelatine-coated dishes for 7days. But this induction was significantly suppressed by addition of HGF or OSM, these are maturation factor for hepatic lineage, to the pre-culture conditions. Because these cholangiocytic progenitor cells show similar characteristics to neonatal LPCs, that are matured in vivo for 7 days, in vitro inductions in 2D culture are equivalent to in vivo development. Moreover, our culture system could be useful for analysis of the intrinsic changes of foetal LPCs towards cholangiocytic differentiation. We demonstrated that the overexpression of Grhl2 lead to the improvement of cholangiocytic cyst formation.

研究分野：肝臓

キーワード：胆管前駆細胞 肝前駆細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

末期肝不全・肝細胞癌では肝移植が根治療法となるが、移植ドナーの不足は我が国において大きな問題であり、その代替として肝幹細胞を用いた再生医療への期待は非常に高まっている。とりわけ iPS 細胞、ES 細胞等の多能性幹細胞に由来する *in vitro* 肝組織等が研究されているが、胆管系への分化機序の知見不足から、生体の機能を完全に模倣した人工肝組織は未だ構築されていない。

申請者らは胎生 13 日のマウス胎仔肝臓より純化された CD45-Ter119-Dlk+ の胎生期肝前駆細胞が、そのままでは胆管様のシスト構造の形成能を持たない一方で、同細胞を 7 日間平面培養した後に 3 次元培養を行うことで高増殖性の胆管様シストが形成されることを見出した。このことは、胎生期肝前駆細胞がこの平面培養期間に胆管系への分化能を獲得していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は胎生期肝前駆細胞における肝発生過程の変化のキーファクターを同定することで、肝前駆細胞の胆管分化能獲得の分子メカニズムを明らかにする。それによって、再生医療等に資する胆管構造を保持した肝組織の *in vitro* 構築への重要な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 平面培養前後でのマウス胎生肝前駆細胞の遺伝子発現変化を網羅的に解析することによって、胎生肝前駆細胞の胆管分化能を制御する候補遺伝子を同定する。それらの遺伝子の強制発現による胆管分化度を、薬物ポンプによる低分子の取り込み能などによって評価する。

(2) ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞に上記(1)で同定したキーファクターを強制発現させることで、胆管前駆細胞や機能的な胆管構造を誘導できるか検討する。最終的に胆管系を保持した肝組織の作製を目指す。

なお、本報告では平面培養前の純化直後の肝前駆細胞を primary cells、同細胞を 7 日間の平面培養したものを cultured cells と便宜的に呼称する。

4. 研究成果

本研究ではゼラチンコート平面培養皿での 7 日間の培養を「2D 前培養」、CD45-Ter119-Dlk+ の胎生期肝前駆細胞を「Primary cells」、これを 2D 前培養したものを「Cultured cells」と便宜上呼称する。

(1) 胎生期肝前駆細胞由来シストの特徴の解明

形成されたシストの機能面の評価目的に、ローダミン 123 の排泄能力の検証を行ったところ、cultured cells 由来シストでは管腔内にローダミン 123 が蓄積した。このことはシストに発現する MDR1 が正常に輸送機能を保持していることを示している。また、MDR1 の

阻害薬であるベラパミルを培地に添加すると、ローダミン 123 の輸送は認めなかった。また、同シストに免疫染色を行ったところ、Alb(-)CK19(+)であったのに加え、βカテニンを基底側、aPKC を管腔側にそれぞれ発現する胆管様特徴を持っていた。また同シストは Ki-67 陽性細胞を認め、9 ヶ月以上も継代培養をすることが可能であった。つまり、胎生期 LPCs は *in vitro* において、2D 前培養を経ることで、持続的な増殖力と正常なトランスポーターを発現した胆管系構造を形成する能力を持つ、胆管前駆細胞に変化する事が示された。

(2) シストの遺伝子発現解析

定量 RT-PCR を用いて、形成されたシストの肝細胞系・胆管系の遺伝子発現を解析した。Primary cells と Cultured cells の遺伝子発現をしたところ、Cultured cells では胆管系マーカーである Ck19、Hnf1β、Hnf6 の発現は 2D 前培養で誘導されたが、対照的に肝細胞系マーカーである Alb や Cyp3a11 は発現低下していた。さらに前駆細胞マーカーである Sry (Sex Determining Region Y)-box 9 (Sox9) や Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled Receptor 5 (Lgr5) も発現が抑制されていた (図 1)。

さらに Primary cells と Cultured cells 由来シストの遺伝子発現を比較すると、シストにおいては Alb や Tat、Cyp3a11 などは著明に発現が低下していたが、Ck19、grainyhead like-2 (Grhl2)、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (cftr) などの胆管系マーカーは強く発現が誘導されていた (図 2)。これらの結果は、2D 前培養によって primary cells は胆管系細胞に分化する能力を獲得し、細胞外マトリックスを用いた 3D ゲル培養によって胆管系側面が誘導されるとともに肝細胞様特徴が抑制されることが分かった。

図 1

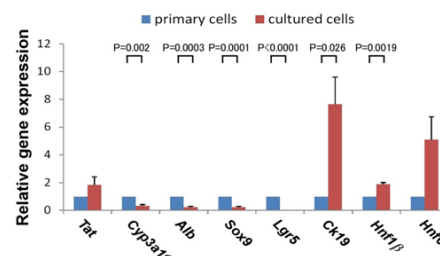
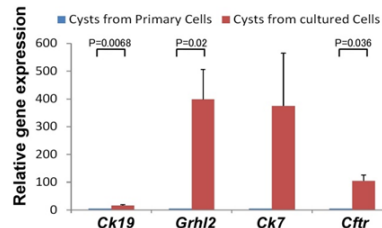


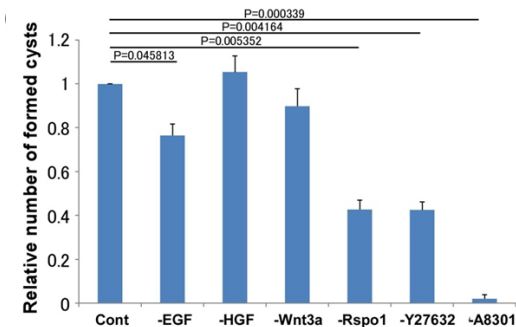
図 2



(3) JNK シグナルと PI3K/Akt シグナルの阻害によりシスト形成は減少する

本研究の培養系では EGF、HGF、Wnt3a、R-spondin 1 の 4 種類の可溶性因子と、ROCK 阻害剤である Y27632 と TGF- β 阻害剤である A-8301 の 2 種類のシグナル伝達阻害剤をシスト形成培地に添加して培養している。それぞれの因子のシスト形成に対する効果を詳細に評価するため、1 リガンドずつ除いた培地を作成し cultured cells の 3D ゲル培養を行った。その結果、A-8301 非添加培地では *in vitro* の 3D ゲル培養において cultured cells は胆管様シストを形成しなかった。加えて、EGF、R-spondin 1、Y27632 を含まない培地では、シストは形成されたが明らかに形成数は減少した (図 3)。そこで、シストにおける EGF と R-spondin 1 のレセプター発現について解析したところ、EGF のレセプターである ErbB レセプターファミリーのうち ErbB1 と ErbB2 が Cultured cells 由来のシストに発現していた。同様に R-spondin 1 のレセプターである Lgr ファミリーの発現も比較的保たれていたことから、これらのサイトカインの刺激がシスト形成に寄与していると考えられる。

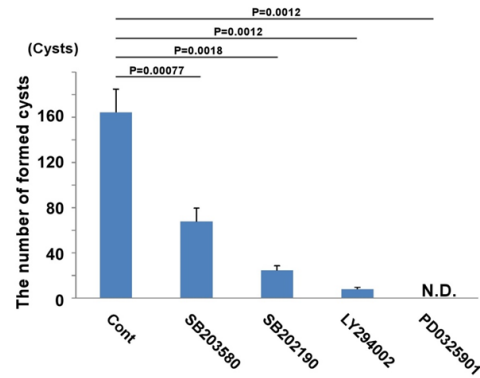
図 3



さらに、シスト形成に関連するシグナル伝達について解析した。Cultured cells を 3D ゲル培養する際に、p38 阻害剤の SB203580 と SB202190、JNK シグナル阻害剤である AS601245 と SP600125、Hedgehog シグナル阻害剤のシクロパミン、PDK1 シグナル阻害剤である PS48、PI3K/Akt シグナル阻害剤である LY293002、Notch シグナル阻害剤である DAPT、MAPK シグナル阻害剤である PD0325901 を加えた。これらのうち P38、PI3K/Akt、MAPK シグナルの阻害は優位にシスト形成を阻害した (図 4)。

以上の結果は、2D 前培養後の LPCs の胆管系への分化は EGF や R-spondin-1 などの成長因子によって誘導される p38、PI3k/Akt、MAPK 経路の活性化が関与することを示している。

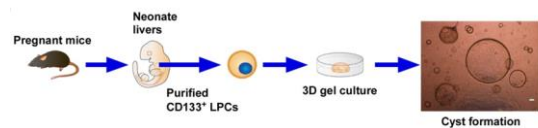
図 4



(4) 胎児期の肝発生における肝芽細胞の特徴の変化

前述のように、我々は *in vitro* において E13 由来の胎生期 LPCs が胆管様シスト形成能を獲得するためには 7 日間の 2D 前培養が必要であることを明らかにした。そこで我々は、*in vivo* においても胆管様形質を獲得するには一定の成熟期間が必要であるのではないかと考え、E13 由来 LPCs が成体で 7 日間成熟した新生児 (胎生 20 日に相当) の LPCs を 3D ゲル培養した。新生児の肝前駆細胞は Dlk1 を発現していないため、特異的マーカーとして CD133 を選択した。CD133+ の新生児肝細胞を磁気ビーズにて純化し、直接 3D ゲル培養を試みたところ、予想した通り CD133+ 新生児 LPCs は 2D 前培養を介さない Primary cell の状態で効率よくシストを形成した (図 5)。また、これらのシストは *in vitro* にて安定した増殖能を持ち、免疫染色では ALB-CK19+ の胆管様性格に加え、基底側の β -CATENIN と管腔側の aPKC の局在発現を示した。さらに、HNF4 α と Ki-67 の発現も認めた。

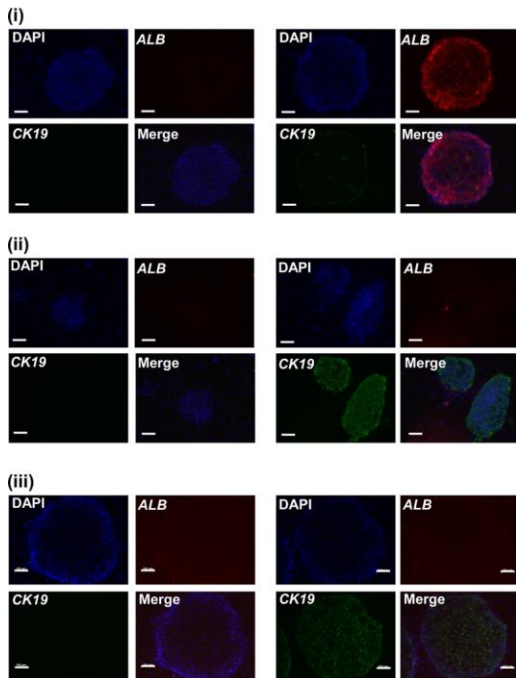
図 5



次に、CD133+ 新生児 LPCs の特徴を明らかにするため、二方向性分化能検証のためのコロニーアッセイを行った。E13 肝臓由来の CD133+ primary cells、CD133+ cultured cells、および CD133+ 新生児 LPCs をフローサイトメーターにて選別し、フィーダーである MEF 細胞上に播種した。それぞれにおいて 1 個の LPCs に由来するコロニーが形成されたことから、これらの細胞は高い増殖能を保持していた (図 6)。それぞれのコロニーを ALB と CK19 にて免疫染色を施行したところ、E13 肝臓由来の CD133+ primary cells 由来コロニーは ALB+CK19- を呈したのに対し (図 6(i))、E13 肝臓由来の CD133+ cultured cells と CD133+ 新生児 LPCs 由来のコロニーは主に ALB-CK19+ と胆管用性格を示した (図

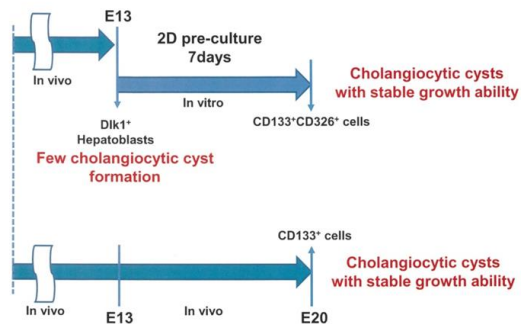
6(ii), (iii))。

図 6



これらのことは、E13 肝臓由来の CD133+ cultured cells と CD133+新生児 LPCs は共通の胆管前駆細胞としての性格を持つことを示唆している (図 7)。

図 7

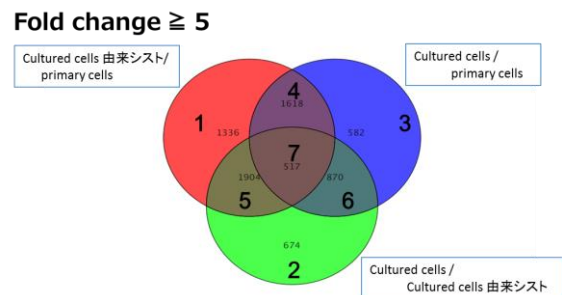


(5) マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現の解析

上記のように胎生期 LPCs を 2D 前培養することで、胆管前駆細胞に誘導することが可能であった。我々の研究の今後の課題として、2D 前培養、3D ゲル培養においてどのような遺伝子が up-regulate または down-regulate されることが胆管前駆細胞への分化に必須のキーファクターであるかを解明することである。このキーファクター同定の足掛かりとして、我々は Primary cells、Cultured cells、Cultured cells 由来シスト、成体肝 CD133+細胞から RNA を回収し、これら細胞群

における網羅的遺伝子発現解析を施行した。各々の時期における遺伝子発現を比較し、5 倍以上の変化を認める遺伝子を抽出しベン図を作成した (図 8)。特に、胆管前駆細胞の誘導に必要なキーファクターは、Primary cells と Cultured cells の間で変化がある遺伝子のうち、Cultured cells からシストまでの間に変化していない遺伝子群が我々の考えるキーファクターである可能性が高い (図 8 のうち area 3 と area 4) ことから、これらの遺伝子に注目し heatmap を作成し、候補遺伝子を選別している。

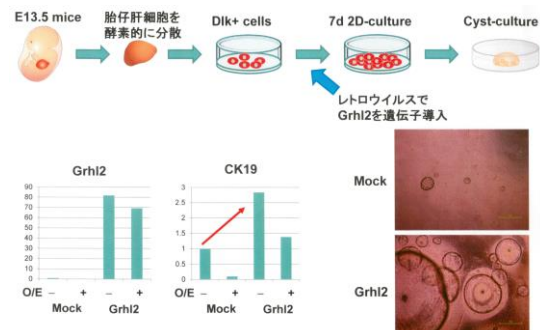
図 8



(6) Grh12 の強制発現は胆管様シストの形成能を上昇させる

次に胆管様 Cyst 構造への分化を誘導できる分子メカニズムの解析を行った。マウス肝前駆細胞の胆管分化に関わる転写調節因子として grainyhead like transcription factor 2 (Grh12) が報告されている。そこで、マウス肝前駆細胞にレトロウイルスを持ちて Grh12 を強制発現させた上で、マトリクス包埋培養によって Cyst 構造への分化を行った。その結果、Grh12 の発現によって、胆管様構造への分化が強く誘導されることを明らかにした (図 9)。

図 9



(7) 結語

胎生 13 日胎生期 LPCs は 7 日間の 2D 前培養を経ることで CD133+新生児 LPCs と同様の胆管様シストを形成することを見出した。つまり、今回我々の確立した *in vitro* にお

る培養系は、生体内での LPCs 成熟過程を模倣したものと思われ、胎生期 LPCs が胆管系前駆細胞へ分化する過程での内因性変化の解析に非常に有用と考えられる。この変化を詳細に解析することで、胆管前駆細胞における成熟過程やシグナル伝達経路の解析に加え、胆管由来の疾患モデルの構築への寄与が期待される。実際今回の研究期間において、LPCs の成熟・分化のキープクターとなる 2 つの遺伝子を見出した。今後はさらに研究をすすめることで、新たな知見を得ることができると考えている。

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 1 件)

1. Foetal hepatic progenitor cells assume a cholangiocytic cell phenotype during two-dimensional pre-culture
Kazuya Anzai, Hiromi Chikada, Kota Tsuruya, Kinuyo Ida, Tatehiro Kagawa, Yutaka Inagaki, Tetsuya Mine & Akihide Kamiya

Scientific Reports volume 6, Article number: 28283 (2016)
doi:10.1038/srep28283

[学会発表] (計 4 件)

1. 紙谷聡英、安齋和也、鶴谷康太、近田裕美 「肝前駆細胞の成熟化を誘導する転写調節機構」第 17 回 日本再生医療学会 (平成 30 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

2. Kazuya Anzai, Kota Tsuruya, Kinuyo Ida, Hiromi Chikada, Tatehiro Kagawa, Akihide Kamiya, Tetsuya Mine. Identification of mechanism regulating characters of stem/progenitor cells during liver development. APASL 2016, 25th Conference of Asia Pacific Association for the Study of the Liver. (平成 28 年 2 月 22 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都港区)

3. 安齋和也、鶴谷康太、紙谷聡英、荒瀬吉孝、広瀬俊治、加川建弘、白石光一、峯徹哉 「マウス胎児由来肝前駆細胞の成体型肝前駆細胞への形質変化」第 19 回日本肝臓学会大会 (平成 27 年 10 月 9 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都港区)

4. Kazuya Anzai, Kota Tsuruya, Kinuyo Ida, Hiromi Chikada, Tatehiro Kagawa, Tetsuya Mine, Akihide Kamiya. Identification of

mechanism regulating characteristics of stem/progenitor cells during liver development.

The Liver Meeting 2015- AASLD (14 November, 2015. San Francisco, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
安齋 和也 (ANZAI, Kazuya)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：20724941

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()