

平成22年6月3日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005 ～2009  
 課題番号：17014016  
 研究課題名（和文）肝細胞のがん化における分化制御の異常

研究課題名（英文）Mechanism of liver development

## 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）：

肝臓を構成する各種細胞の細胞膜抗原に対するモノクローナル抗体を作製して肝臓構成細胞を分画する方法および分離した細胞の培養系を開発した。これにより、胎児の肝芽細胞や成体肝臓の幹・前駆細胞を同定分離してそれらの性状を明らかにした。また、肝類洞壁細胞の分化や肝中皮細胞や門脈域繊維芽細胞による肝臓分化における役割も明らかとなった。さらに、肝細胞分化に関与する転写因子や細胞膜タンパク質の機能解析を行い、肝細胞の分化、とりわけ出生時期における劇的な遺伝子発現変化の分子基盤を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

We prepared a panel of monoclonal antibodies for cell surface proteins on various liver cells, and developed culture systems using isolated cell populations. By applying those tools we characterized fetal liver hepatoblasts and adult liver stem/progenitor cells. We also characterized sinusoidal endothelial cells and stellate cells that constitute sinusoids. Liver mesothelial cells were also isolated and shown to support proliferation of fetal hepatocytes. Transcription factors and cell membrane proteins involved in hepatocyte differentiation were also identified and characterized.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費 | 合計         |
|--------|------------|------|------------|
| 2005年度 | 11,300,000 | 0    | 11,300,000 |
| 2006年度 | 8,400,000  | 0    | 8,400,000  |
| 2007年度 | 8,400,000  | 0    | 8,400,000  |
| 2008年度 | 10,400,000 | 0    | 10,400,000 |
| 2009年度 | 10,400,000 | 0    | 10,400,000 |
| 総計     | 48,900,000 | 0    | 48,900,000 |

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：肝細胞 シグナル伝達 モノクローナル抗体 サイトカイン 癌細胞

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体における代謝の中心臓器であり生命活動の維持に必須の臓器である。成体肝臓はウイルス感染、アルコール、薬物、自己免疫など様々な原因により肝炎を発症し、慢性的な肝炎は線維化・肝硬変を経てしばしば肝がんを発症する。成体肝臓は強い再生能をもつことが古くから知られているが、そのメカニズムは必ずしも明らかではない。部分肝切除からの再生においては、残存する肝細胞の分裂により肝臓の重量は回復する。一方、肝細胞の増殖が抑制された肝障害においては、門脈域にオーバル細胞と呼ばれる未分化細胞が出現し、それが肝再生に寄与すると考えられており、オーバル細胞は成体肝臓の幹細胞と考えられていた。肝臓における幹細胞は肝細胞と胆管上皮細胞への分化能をもった細胞と一般的には考えられていたが、その実態は不明であった。したがって、肝臓がんの発生において肝幹細胞が起源となるのかどうかといった点も不明であった。肝臓は胎児期には造血器官であり、出生時から消化器官としての肝臓に分化成熟するが、この肝臓分化の分子機構に関する研究は少ない。肝臓の研究においては、実質細胞、非実質細胞という表現が未だに用いられていることから明らかであるが、血液・免疫学に比べて細胞の分離同定法が未整備であり、これが肝臓の分子生物学的研究における障害となっていた。

### 2. 研究の目的

肝細胞のがん化の理解には、まず肝細胞の正常な発生・分化の制御機構の理解が必要であ

る。とりわけ、肝臓の元となる幹細胞についてはその存在も含めて不明な点が多い。本研究では、肝臓の発生・分化の分子機構を明らかにして、肝臓がん発生機構の理解に資することを目的とした。具体的には肝臓構成細胞を分離して各細胞の増殖・分化能および細胞間の相互作用を解析する。肝幹細胞の性状を明らかにすることは、肝がんの発症との関連で特に重要である。胎児期の肝芽に存在する肝芽細胞が胎児肝臓の肝幹細胞であると考えられている。一方、成体肝臓において肝細胞の増殖が抑制された状況での肝障害時に門脈域で増殖するオーバル細胞が幹細胞である可能性が指摘されている。そこで、本研究ではマウス胎児肝臓の肝芽細胞および成体肝臓のオーバル細胞の解析を行うとともに、肝臓構成細胞の分化の分子機構を併せて解析した。

### 3. 研究の方法

本研究ではマウスの肝臓を構成する各種の細胞の細胞膜タンパク質の同定とそれらに対するモノクローナル抗体の作製により、肝臓構成細胞を厳密に同定しセルソーターを使って細胞を純化して培養するシステムを整備した。すでに肝臓構成細胞に発現するいくつかの細胞膜タンパク質は同定されており、それらに対する抗体も利用可能になっているが、さらに多くの細胞膜タンパク質を同定してモノクローナル抗体の作製を行い、肝臓構成細胞の同定および分離に利用した。さらに、分離した細胞の培養を確立し、単独あるいは多種の肝臓細胞との共培養系などにより細胞の増殖能および分化能を評価し

た。

#### 4. 研究成果

##### 胎児肝臓の幹細胞

我々は肝臓構成細胞の分離に利用可能な分化マーカーの探索を行い、すでに未分化肝細胞マーカーとして Dlk を同定していた。本研究では、Eepithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) が初期の肝原基に発現しており、胎生 10 日のマウス肝芽では EpCAM+Dlk++細胞が主要な増殖性細胞であり、EpCAM-Dlk+細胞を経て肝細胞および胆管上皮細胞へと分化することを示した。

胎生肝臓の中皮細胞が未分化肝細胞の増殖に重要であることを見いだした。シアロムチンである PCLP1 が胎生肝臓の中皮細胞に強く発現しており、発生が進むにつれて減弱し、成体肝臓では消失すること、一方、mesothelin の発現は発生に伴い増大することから、これらの発現を指標に異なる分化段階の中皮細胞を分離することが可能となった。そこで、遺伝子発現解析を行ったところ、胎児期の中皮細胞が肝細胞の増殖因子を多数発現すること、中皮細胞と胎生肝細胞との共培養系で中皮細胞が肝細胞の増殖を促進することを見いだした。すなわち、中皮細胞は単なる臓器の保護膜ではなく、器官形成に積極的に関与することが明らかになった。また、肝発生過程における Hedgehog シグナル系の関与、さらに、肝芽細胞に発現する細胞膜タンパク質 Dlk の機能解析を行い、Dlk に結合する細胞膜タンパク質として cysteine rich FGF receptor (Cfr) を同定した。Cfr は FGF18 と FGF 受容体の結合を正に制御し、Dlk はそれを抑制することを見いだした。

##### 成体肝臓の肝幹細胞

一方、成体肝臓においては、DDC で肝障害を誘導すると門脈域に CK-19+ のオーバル細胞

が出現し、これが成体肝臓における幹細胞とみなされていた。我々は、このオーバル細胞に EpCAM が発現することを示した。DDC でオーバル細胞を誘導して EpCAM 陽性細胞を分離して培養した結果、増殖能と肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を併せもつ幹細胞が存在することが明らかになった。さらに、正常な肝臓の胆管も EpCAM を発現していることから、ここにも幹細胞が存在する可能性を検討した。正常肝臓に少数存在する EpCAM 陽性細胞を 2 段階の sorting により分離して培養すると、やはり幹細胞としての性質を示す細胞が存在することが明らかとなった。さらに、DDC 投与の有無で幹細胞の性質をもつ細胞の頻度を比較検討した結果、DDC 投与によって幹細胞が劇的に増加しないことから、DDC で増殖する大部分の EpCAM 陽性細胞は幹細胞ではなく一過性に増殖する前駆細胞であることが示唆された。この成体肝臓での薬剤による肝幹・前駆細胞の誘導における Wnt シグナル系の関与も明らかにした。

##### 肝細胞の分化

我々は、胎生肝臓から成熟肝臓にわたり発現する膜タンパク質として Tim2, Lutheranなどを多数同定しているが、これらは単なる分化マーカーではなく肝細胞の分化・増殖に機能する可能性もある。そこで、我々がすでに開発している未分化肝細胞の分化誘導系にて、これらの肝細胞分化における機能の解析を行った。その結果、Ig ファミリーの Tim2 と Laminin に結合することが知られている Lutheran が肝細胞分化を、それぞれ負および正に制御していることなどを見いだした。

成体肝臓の様々な代謝機能は出生時前後に獲得されるが、この過程には C/EBP $\alpha$  が必須であり、その欠損マウスは低血糖および高アンモニア血漿にて生後直ぐに死亡する。一方、

C/EBP $\alpha$ の発現は胎児期から成体にわたりほぼ一定であり、肝細胞分化はC/EBP $\alpha$ のみでは説明することはできない。とりわけ糖新生酵素の発現はC/EBP $\alpha$ に依存するのみならず、インスリンの影響を受ける。インスリンの制御を受ける転写因子Foxo1がC/EBP $\alpha$ と協調的に作用して糖新生酵素の発現制御を行うことを見だし、出生前後でのインスリンの変化と糖新生酵素発現誘導を分子レベルで説明することができた。また、アンモニアの除去を行う尿素サイクルのcarbamoylphosphate synthetase (CPS)の発現もC/EBP $\alpha$ の制御を受けるが、この発現をYB-1がC/EBP $\alpha$ 依存的なCPSの発現を制御している機構も明らかにした

#### 類洞の形成

肝臓に特有の血管系である類洞は類洞内皮細胞(HSEC)および星細胞で構成されている。我々は類洞内皮細胞の細胞膜タンパク質としてLyve1およびStab2を同定し、抗体によるHSECの分離を可能とした。HSECは発生過程および病態に伴い細胞膜抗原の発現を変化させることを示した。P75NTRは星細胞に発現するとともに門脈域の線維芽細胞にも発現しており、さらにこの門脈域線維芽細胞はJagged1を発現することから肝芽細胞の胆管上皮細胞への分化を誘導する細胞である可能性が示唆された。また、p75NTR陽性細胞とFlk1+内皮細胞とは胎生10日の肝臓ですでに密接しており、すでにこの時期に類洞形成が始まっていることが示唆された。

#### まとめ

以上、我々の開発した細胞膜タンパク質の発現を元にした肝臓細胞の分画と分離した細胞の培養系は、肝臓の分化機構の解明に極めて有効であり、正常な発生過程の解析のみならず、

病態における細胞の変化をも解析することが可能である。肝臓の分化制御の異常とがん化との関連、例えば成体肝臓の幹細胞やオーバル細胞が肝臓がんの前駆細胞となる可能性の検証等への応用が期待される。また、Dlkのような肝幹細胞抗原ががん治療の標的分子となる可能性もあり、肝臓がんの診断や治療への応用も期待される。

#### 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29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. 査読有
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. 査読有
3. Chen Y-R., Sekine Ke., Nakamura, K., Yanai, H. Tanaka M., and Miyajima A. YB-1 downregulates expression of carbamoyl phosphate synthetase 1 by suppressing C/EBP $\alpha$  function, leading to hyperammonemia. *Gastroenterology* 137, 330-340, 2009. 査読有
4. Okabe M., Tsukahara Y., Tanaka M., Suzuki K., Saito S., Kamiya Y., Tsujimura T., Nakamura K., and Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers. *Development* 136, 1951-1960, 2009. 査読有
5. Itoh T., Kamiya Y., Okabe M., Tanaka M., and Miyajima A. Inducible expression of Wnt genes

- during adult hepatic stem/progenitor cell response. *FEBS Letters* 583, 777-781, 2009. 査読有
6. Tanimizu N., Miyajima A., and Mostov K. Liver progenitor cells fold up a cell monolayer into a double-layered Structure during tubular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 20, 2486-2494, 2009. 査読有
7. Tanaka M., Okabe M., Suzuki K., Kamiya Y., Tsukahara Y., Saito S., and Miyajima A. Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech. Dev.* 126, 665-676, 2009. 査読有
8. Hirose Y., Itoh T., and Miyajima A. Hedgehog signal activation coordinates proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 315, 2648-2657, 2009 査読有.
9. Yamamoto Y., Kosaka N., Tanaka M., Koizumi F., Kanai Y., Mizutani T., Murakami Y., Kuroda M., Miyajima A., Kato T. and Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers* 14 (7):529-538, 2009. 査読有
10. Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A., Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M. and Miyajima A. Junctional adhesion molecule-1, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 111, 1167-1172, 2008. 査読有
11. Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H. and Miyajima A. Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation. *Hepatology* 45, 1240-1249, 2007. 査読有
12. Tanimizu N., Miyajima A., and Mostov K.E. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Mol Biol Cell.* 18:1472-1479, 2007. 査読有
13. Tanimizu N. and Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. *International Review of Cytology* 259, 1-48, 2007 査読有.
14. Nonaka H., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev. Dyn.* 236, 2258-2267, 2007 査読有
15. Sekine K., Kojima N., Chen Y-R., Fukamizu A., and Miyajima A. Foxo1 links insulin signaling to C/EBP $\alpha$  and regulates gluconeogenesis during liver development. *EMBO J.* 26, 3607-3615, 2007 査読有
16. Naiki T., Saijou E., Sekine K. and Miyajima A. TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting Akt and C/EBP $\beta$  *J. Biol. Chem.* 282, 24075-24082, 2007. 査読有
17. Miyaoka Y., Tanaka M., Naiki T. and Miyajima A. Oncostatin M Inhibits adipogenesis through Ras/ERK and STAT5 signaling pathways. *J. Bio. Chem.* 281, 37913-37920, 2006. 査読有
18. Ito H., Esashi E., Akiyama T., Inoue J., and Miyajima A. IL-18 produced by thymic epithelial cells induces a novel subset of dendritic cells in the fetal thymus. *Int. Immunol.* 18, 1253-1263, 2006. 査読有
19. Minehata K., Takeuchi M., Hirabayashi Y., Inoue T., Donovan P.J., Tanaka M., and Miyajima

A. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow by regulating the G-CSF level. *Int. J. Hematol.*84, 319-327, 2006. 査読有

2 0 . Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K., Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A., and Tsujimura T. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am. J. Pathology* 166, 709-719, 2005. 査読有

2 1 . Bando T., Sekine K., Kobayashi S., Watanabe A., Rump A., Tanaka M., Suda Y., Kato S., Manabe T., and Miyajima A. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 is required for hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol. Cell Biol.* 25, 4166-4175, 2005 査読有.

[学会発表] (計 16 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1 . 名称 : 新規癌転移抑制剤の探索法

発明者 : 宮島篤、西條栄子、菅野安善

権利者 : 東京大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2009-130064

出願年月日 : 平成 2 1 年 5 月 2 9 日

国内外の別 : 国内

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

田中 稔 (TANAKA MINORU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

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・助教  
研究者番号 : 50396917

谷水 直樹 (TANIMIZU NAOKI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号 : 00333386

関根 圭輔 (SEKINE KEISUKE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助手

研究者番号 : 00323569

(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・助教

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・助教

研究者番号 : 50396917

谷水 直樹 (TANIMIZU NAOKI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号 : 00333386

西條 栄子 (SAIJO 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