

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590171
 研究課題名（和文） 肝初期発生における肝芽細胞分化および肝芽組織形成過程の分子機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the early liver morphogenesis during the embryonic period.
 研究代表者
 仲谷 和記（NAKATANI KAZUKI）
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：60295699

研究成果の概要（和文）：肝臓の発生過程における肝芽細胞分化と肝芽組織形成の分子機構の一端を明らかにする目的で、ラット胚胎および胎児の肝組織を免疫組織化学法と微細形態学の方法で解析した。前腸内胚葉上皮から分化した肝芽細胞は、接着結合構成蛋白 N カドヘリンを発現するようになり、この発現は胚胎・胎児期を通じて持続していた。また、肝芽組織を構成するために横中隔に遊走中の肝芽細胞同士は、接着結合を保持していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To reveal the process of hepatoblast differentiation and hepatoblastic tissue construction, I analyzed the embryonic and fetal liver using immunohistochemical and ultrastructural methods. Hepatoblasts become to be expressed N-cadherin, a molecule in adherence junction, when they are differentiated from endodermal epithelia of foregut. And N-cadherin is detected in hepatoblasts and fetal hepatocytes throughout embryonic and fetal period. I also revealed that hepatoblasts keep adherence junction between them during moving in transverse septum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生・分化・細胞・組織・解剖学・細胞間結合

1. 研究開始当初の背景

肝臓はラット胚では 10.5 日齢頃より発生し始める。肝臓の原基である肝芽は、前腸の腹側内胚葉上皮が肥厚して形成される肝憩室を起源とする。肝芽を構成する実質細胞は肝芽細胞とよばれ、肝細胞と胆管上

皮細胞に共通する前駆細胞であり、心臓と前腸の間にある横中隔に進入して肝芽組織を形成していく。横中隔内に遊走した肝芽細胞はやがて索状に配列するようになり、12.0 日齢頃には造血が始まって臓器として機能するようになる（Zaret, In: the

Liver Biology and Pathobiology (Arias, et al. eds) 4th ed., 2001, 17-25 他)。肝芽細胞が横中隔に侵入する際には E-カドヘリンの発現を減弱させることが報告されている (Sosa-Pineda, et al., Nature Genetics 25(3), 2000, 254-255)。上皮細胞間の接着装置を構成する分子のひとつである E-カドヘリンの発現が減弱することは、細胞間の強固な結合を解除して脱上皮化が起こっていることを示唆する。このような脱上皮化の一形態として、最近、上皮間葉移行現象が注目されている。この現象は種々の発生段階に見られ、成体では創傷治癒過程や異常な線維化、癌の浸潤機構にも深く関与すると考えられている。我々は、平成 15・16・17 年度の科学研究費補助金 (若手研究(B)) による研究 (課題番号 15790110) において N-カドヘリンが横中隔に遊走する肝芽細胞に陽性であることを明らかにした。この分子は発生期の間充細胞に発現が報告されていることより、N-カドヘリン陽性の肝芽細胞は間葉細胞としての形質を合わせ持っている可能性が示唆された。

また、我々は上記の課題番号 15790110 の研究により、肝芽組織中にフィブロネクチンの発現を認め、間葉細胞と一部の肝芽細胞内にも染色が認められることを明らかにした。フィブロネクチンは早くより報告されている主要な細胞外基質のひとつであり、口腔上皮から発生する唾液腺の形成過程に不可欠であることが報告されている (Sakai, et al., Nature 423 (6942): 876-881, 2003)。さらに我々は、フィブロネクチンのリガンドであるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が肝芽細胞と間葉細胞に発現することも明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、肝臓の発生過程における肝芽細胞分化と肝芽組織形成の分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

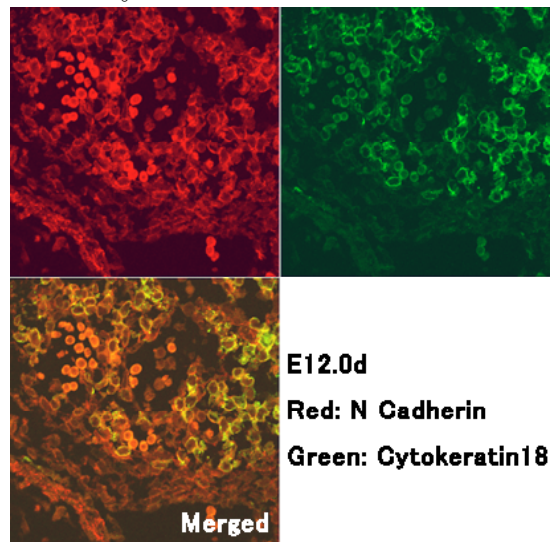
ラット 10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.5、14.5、15.5 日胚および 16.5、18.5、20.5 日齢胎児を用いて、肝芽組織における諸分子の発現を免疫組織化学法により検討した。一部の分子に関しては成体肝でも検討した。肝芽細胞は α フェト蛋白質およびサイトケラチン 18 を用いて同定し、間葉細胞はビメンチンを用いて同定した。

また、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)固定凍結標本やパラフィン包埋標本を用いた pre-embedding 免疫電顕法、whole mount immunohistochemistry (WM-IHC) を応用した pre-embedding 免疫電顕法、LR white 包埋剤を用いた post-embedding 免疫電顕法も検討

した。また、通常のレジン包埋による透過型電顕 (TEM) による観察も行った。

4. 研究成果

まず、課題番号 15790110 の研究により明らかとした、肝初期発生過程における N-カドヘリンの発現を、胚胎・胎児・成体において検討し、胚胎・胎児期を通じて肝芽細胞-胎児肝細胞に N-カドヘリンが発現することを明らかにした。



この段階では、肝細胞に N-カドヘリンが発現することは過去に報告がなかったため、成体における発現も検討した。その結果、ラット肝では E-カドヘリンと N-カドヘリンの両者を発現するが、発現細胞の分布は異なっていることが明らかとなった (E-カドヘリンはグリソソ鞘周辺を中心として Zone I-II にかけての肝細胞に強く発現し、N-カドヘリンは中心静脈周囲の中心とした Zone III-II にかけてに発現していた)。正常成体における発現を検討するのに併行して、線維化肝と再生肝 (70%肝切除術後の残余肝) における発現を検討して論文執筆を準備していたが、他の研究グループより同様の報告がなされた (Doi Y, et al. Hepatol Res 37 (3), 2007, 230-237) ため、残念ながら論文を投稿できなかった。肝初期発生過程においては、上皮細胞が横中隔間充織内を遊走するため、基底膜成分を分解して上皮構造を崩す必要がある。この過程を明らかにする目的で基底膜成分を分解する活性を持った matrix metalloproteinase (MMP) である MMP2、MMP9、MMP14 の発現を 10.5-12.0 日胚 (肝憩室を形成してから横中隔内に肝芽組織を形成するまでの期間) で検討したが、有意な染色は認められなかった。10.5-12.0 日胚において、肝憩室および横中隔を TEM によって観察することにより、横中隔内を遊走中の肝芽細胞間に明らかな接着結合が認められた。この所見は、肝憩室を形

成する肝芽細胞はEカドヘリン発現低下によって接着結合を解消した後に横中隔間充織へ遊走を開始する、という従来からの考え方に反する新しい所見である。

横中隔間充織内に遊走中の肝芽細胞間における細胞接着装置をさらに解析するため、細胞接着装置関連蛋白であるZO-1、オクルーディン、クラウディン(1, 4, 7)、IQGAP1、IQGAP2、デスマブラキン1・2、コネクシン32の発現を検討した。ZO-1・オクルーディン・クラウディンはタイト結合関連蛋白で、TEMにて極一部の肝芽細胞間にタイト結合が観察されたために検討した。IQGAP1・2は接着結合関連蛋白、デスマブラキンはデスマゾーム関連蛋白である。ギャップ結合関連蛋白のコネクシン32に関しては、肝芽組織の形成が進むにつれて発現することが報告されているが、この報告を確認するために染色を行った。抗体や固定法を様々に検討し、免疫組織化学法を行ったが、ZO-1以外の諸分子の有意な染色は確認できなかった。

次いで、NカドヘリンとZO-1の細胞内局在を明らかにするため、免疫電顕法を試みた。pre-embedding法として通常良く用いられる、4%PFA固定凍結標本よりの免疫電顕では、組織破壊が著しく微細形態の観察に堪えなかった。パラフィン包埋標本を用いたものも同様であった。マイクロスライサーによる無包埋薄切標本は胚胎の組織が脆弱であるため行うことが出来ず、また、LR white包埋剤を用いたpost-embedding法でも胚胎組織の脆弱性のため、超薄切標本の作製が困難であった。そこで、WM-IHC法を応用してpre-embedding免疫電顕法を試みたが、光学顕微鏡観察で染色が確認されるものの、TEMによる観察では有意な染色が認められなかった。これは、DAB-過酸化水素-ペルオキシダーゼ法によって形成される沈殿物の局所における沈殿量が少ないためであると考えられた。以上の結果より、Nカドヘリン・ZO-1の細胞内局在を明らかとすることを断念し、現在、投稿に向けて準備中である。

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8件)

- ① Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N. Attenuation of Acute and Chronic Liver Injury in Rats by Iron-deficient Diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294 (2), 2008, R311-20 (査読あり)
- ② Otogawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Ikura Y, Ueda M, Arakawa T, Hato F,

Kawada N. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *J Am Pathol* 170 (3), 2007, 967-980 (査読あり)

③ Sakata H, Sakabe M, Matsui H, Kawada N, Nakatani K, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Rho kinase inhibitor Y27632 affects initial heart myofibrillogenesis in cultured chick blastoderm. *Dev Dynam* 236 (2), 2007, 461-472 (査読あり)

④ Nakatani K, Tanaka H, Ikeda K, Sakabe M, Kadoya H, Seki S, Kaneda K, Nakajima Y. Expression of NCAM in the activated portal fibroblasts during regeneration of the rat liver after partial hepatectomy. *Arch Histol Cytol* 69 (1), 2006, 61-72 (査読あり)

⑤ Matsui H, Sakabe M, Sakata H, Nakatani K, Ikeda K, Fukui M, Ando K, Yamagishi T, Nakajima Y. Heart Heart myofibrillogenesis occurs in isolated chick posterior blastoderm: a culture model. *Acta Histochemica et Cytochemica* 39 (5), 2006, 139-144 (査読あり)

⑥ Sakabe M, Ikeda K, Nakatani K, Kawada N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Yamagishi T, Nakajima Y. Rho kinases regulate endothelial invasion and migration during valvuloseptal endothelial cushion tissue formation. *Dev Dynam* 235 (1): 94-104, 2006 (査読あり)

⑦ 仲谷和記、金田研司、中島裕司、肝のNK細胞の特徴と役割、*Surgery Frontier* 13 (2)、2006、23-29 (査読なし)

⑧ 坂部正英、安部みき子、仲谷和記、池田一雄、葭山稔、中島裕司、心臓のマクロ解剖実習：切開法と分離法を同時に行う試み、*解剖学雑誌* 81 (4)、2006、117-124 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

- ① 仲谷和記、肝線維芽細胞系研究の概説：組織化学的解析を中心に、第114回日本解剖学会総会・学術集会、2009年3月30日、岡山
- ② 仲谷和記、他、肝線維化機構の分子形態学的解析：組織化学的検討を中心に、第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2008年10月5日、長崎
- ③ Nakatani K, et al. Dynamic changes of expression of molecules related to the epithelial-mesenchymal transition in the early phase of liver development. 7th Joint Meeting of the Japanese Society of

Histochemistry and Cytochemistry and the
Histochemical Society. August 24-26, 2006,
Waikoloa, HI, USA

[図書] (計3件)

① 仲谷和記、肝臓と胆嚢の構造と機能、金
芳堂、人体の解剖生理学、2010、262-264

② Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Seki
S. Expression of molecules with a
potential for modulating interaction with
extracellular matrices on hepatic
stellate cells: neural cell adhesion
molecules and osteonectin. In: Nova
Science Publishers Inc (NY), Trends in
Liver Cirrhosis Research, 2007, pp 89-127

③ Ishizaka S, Ouji Y, Yoshikawa M,
Nakatani K. Derivation and character-
ization of hepatocytes from embryonic stem
cells in vitro. In: Human Press Inc. (NJ),
Methods in Molecular Biology, vol. 330:
Embryonic Stem Cell Protocols, second
edition, volume 2, 2006, pp 387-399

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/organic/nakatani1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲谷 和記 (NAKATANI KAZUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60295699