

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570203
 研究課題名（和文）肝臓変異マウスを用いた門脈を起点とする胆管細胞分化の決定と形態形成機構の解明
 研究課題名（英文）ABNORMAL BILE DUCT MORPHOGENESIS IN MICE HAVING DEFICIENT HEPATIC DEVELOPMENT AND ITS MOLECULAR MECHANISM
 研究代表者
 塩尻 信義 (SHIOJIRI NOBUYOSHI)
 静岡大学・理学部・教授
 研究者番号：70162568

研究成果の概要：本研究では、胆管の形態形成機構を明らかにするため、変異マウス肝臓における組織構築異常の解析およびキメラ解析から、肝細胞の成熟化と胆管形態形成がカップルすること、特に細胞接着分子（E-cadherin、EpCAM 分子など）がこのカップリングに関わる可能性を示した。また、胆管形態形成に他器官からの因子（ホルモン）も直接関わりうる。肝芽細胞集団の細胞分化では Jag1-Notch 系が重要な働きをする。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：(分科) 生物科学 (細目) 発生生物学

キーワード：胆管、肝臓、形態形成、門脈トライアッド、ホルモン、内臓逆位、キメラ

1. 研究開始当初の背景

肝臓内の内胚葉性上皮は成熟肝細胞と胆管上皮細胞である。両者は発生過程で、発生期肝幹細胞である肝芽細胞から分化する。特に胆管上皮細胞の分化に関しては、門脈域からの Jagged1-Notch2 シグナル、TGFb/activin シグナルが重要とされてきたが、必ずしもよくわかっていない。肝細胞の成熟化が極度に抑制される、肝特異的転写因子 C/EBP α の遺伝子欠失マウスで肝臓発生を解析したとこ

ろ、肝全体に偽腺管構造が発達し、正常な胆管形成はおこらなかった。ヌル型では、門脈域に胆管上皮細胞は分化するものの、成熟化が抑えられた肝細胞様の細胞との接着が切れず、胆管上皮細胞と肝細胞様細胞が互いに接着し、管腔を構成する“biliary space”を形成し、正常な胆管形態形成はおこらない。この結果より、肝細胞の成熟化と胆管形態形成がカップルしている可能性が高いと考えられた。また、内臓逆位マウスである *inv* マウスでは、胆管形態形成が

ductal plate 状態にとどまり、黄疸症状を新生児期に示す。*inv* マウスは多嚢胞性腎を発症し、生後1週間以内に死亡するので、さらに生き続けた場合組織構築が進み、胆管上皮細胞が ductal plate 状態にとどまるかどうかは不明である。言い換えれば、肝臓での異常が *inv* 遺伝子欠損による autonomous なものかどうかはわからない。そこで、*inv* マウス胎児肝臓片を野生型個体精巣（成体）に移植したところ、ductal plate 状態はレスキューされたので、胆管形態形成に他器官からホルモンなどの液性因子が関わる可能性が強く示唆された。*inv* マウスにおける内分泌器官における異常もこれまでよく調べられてはいない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝臓変異マウス（肝特異的転写因子 *C/EBP α* 遺伝子欠失マウスと内臓逆位 *inv* マウス）を用いて、それぞれの胆管構築の異常を解析することで、胆管の形態形成機構を明らかにすることである。そのため、

- (1) *C/EBP α* 遺伝子座について野生型-ヌル型細胞からなるキメラマウスを集合法により作出し、その肝臓におけるキメリズム解析から、肝細胞の成熟化と胆管形態形成がカップルしているかどうか、検証を試みた。同時に、ヌル型胎児の肝臓構築を詳細に解析、かつ肝臓の組織構築に重要である細胞接着因子や細胞外マトリックスなどの発現に関して、野生型とヌル型胎児肝臓で、アレイ解析により比較を行った。
- (2) 胆管形態形成に他器官からの液性因子（ホルモン）が直接関わるか、*inv* マウスにおける内分泌器官の異常、組織構築とホルモン産生を解析した。
- (3) 肝芽細胞集団の細胞分化に関わるとされる Notch シグナル系の意義を調べた。

3. 研究の方法

(1) *C/EBP α* 遺伝子欠失マウスと *DsRed* トランスジェニックマウス（*C/EBP α* 遺伝子座は野生型）由来の細胞からなるキメラ個体を作成し、肝臓におけるキメリズムと組織構築異常をあわせて組織学的に解析した。また、ヌル型胎児（E17.5）肝臓の組織構築異常を免疫組織化学法と RT-PCR 法により解析を行った。組織構築に関わる細胞接着因子や細胞外マトリックスなどの発現に関して、野生型と

ヌル型胎児肝臓（E17.5）から mRNA を調製し、発現遺伝子についてアレイ解析を行い、比較した。

(2) 野生型マウス成体の各内分泌器官から mRNA を調製し、RT-PCR 法により *inversin* mRNA の発現を確認した。次に、*inv* マウスホモ型と野生型新生児の各内分泌器官（脳下垂体、甲状腺、副腎、膵臓など）を取り出し、組織学的に異常を検索するとともに、免疫組織化学的にホルモン産生を野生型と比較した。

(3) *C/EBP α* 遺伝子欠失マウス E17.5 肝臓における Notch シグナル系遺伝子（*Jagged1*, *2*, *Notch1-4*, *Hes1* mRNA など）の発現を RT-PCR 法により調べ、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) *C/EBP α* の遺伝子欠失マウス肝臓では、肝細胞の成熟化がおこらないが、同時に胆管形態形成も異常であるため、肝細胞の成熟化と胆管形態形成がカップルしている可能性がある。これを証明するため、*C/EBP α* 遺伝子座について野生型-ヌル型マウス間でキメラマウスを作成し、その肝臓構築を解析した。肝細胞の成熟化と胆管形態形成がカップルしていれば、野生型肝細胞とヌル型胆管上皮細胞の組み合わせでは胆管は管として肝実質部から分離するが、ヌル型肝細胞様細胞と野生型胆管上皮細胞からなる部分では、胆管分離はおこらないと考えられる。例数は少ないがキメラマウスの作成に成功し、肝細胞の成熟化と胆管形態形成がカップルすることを示唆する結果を得た。

また、野生型およびヌル型胎児肝臓の組織構築を免疫組織化学法ならびに RT-PCR 法によりさらに詳細に解析したところ、ヌル型では胆管形態形成異常に加え、野生型肝臓と比較し、E-cadherin や EpCAM などが強く発現上昇しており、正常な胆管形態形成には、これらの接着分子の発現変化が大きく関わっている可能性が高い。さらにヌル型では、門脈結合組織の著しい肥厚が観察され、同時に細胞外マトリックスの沈着も非常に多いことを明らかにした。門脈結合組織の異常が胆管形態形成異常につながる可能性もある。

野生型およびヌル型胎児肝臓における発現遺伝子のアレイ解析では、ヌル型では、E-cadherin、Cadherin16、desmocollin2、desmoglein2、EpCAM、SgIGSF などの接着分子、collagen type I、collagen type III などの

細胞外マトリックスが発現上昇していた。これらの遺伝子の発現上昇が異常な胆管形態形成につながる可能性が高い。野生型では CEACAM、olfactomedin4 などがヌル型に比べて、発現が上がっていた。これは正常の肝臓構築（肝小葉形成）に關与する可能性が高い。

(2) *inv* マウスホモ型肝臓における胆管形態形成に他器官からの液性因子（ホルモンなど）が直接関わるか調べるために、野生型成体各内分泌器官で *inversin* mRNA が転写されているか、RT-PCR 法を用いて調べた。脳下垂体、甲状腺、副腎、膵臓等で *inversin* mRNA の発現が認められた。次に、野生型およびホモ型新生児における各内分泌器官の発生状況を組織学的に検索した。脳下垂体、甲状腺、副腎は、ホモ型で多少の発生遅延はあるものの、組織学的には正常であった。またホルモン産生を免疫組織化学的に調べたところ、各内分泌器官は正常に、本来産生するホルモンを産生していた。しかし、膵臓についてはその外分泌部が組織学的に異常となり、嚢胞を形成していた。内分泌部は正常であった。ホルモン（インシュリン、グルカゴン）産生は正常であった。しかし、今後、野生型およびホモ型個体でホルモンの血中濃度を正確に測定する必要がある。現時点ではまだはっきりしないが、胆管形態形成にホルモン等液性因子が関わる可能性は十分ありうる。

他方、肝臓での *inversin* 発現欠損が直接胆管形成異常につながる可能性を調べるため、*inversin* mRNA とタンパク質の発現を肝臓の発生過程で検討した。*inversin* mRNA の発現は、肝臓では、門脈と肝動脈内皮で強く、肝細胞と胆管上皮細胞で弱く発現が観察された。抗体染色では、肝臓では実質部に顆粒状のシグナルを認めた。これは一次繊毛の基部付近に発現するという報告と一致している。しかし現在までのところ、mRNA 染色と抗体染色の結果が必ずしも一致していないので、さらに解析を進める必要がある。

またホモ型新生児肝臓の組織構築をさらに解析したところ、異常は胆管だけにとどまらず、肝動脈肥大や門脈結合組織不全が観察され、*inv* ホモ型マウス肝臓では、門脈、肝動脈、門脈からなる“門脈トライアッド”の異常がおこっていることを見出した。

(3) *C/EBP α* 遺伝子欠失マウスおよび野生型マウスで、Notch シグナル系の遺伝子発現

を RT-PCR 法により解析したところ、ヌル型胎児肝臓で、*Jagged1*、*Notch2* に加え、*Notch1*、*3*、および *Hes1* 遺伝子の発現上昇が認められた。この結果は、*C/EBP α* のシグナル系の下流に、Notch シグナル系が位置することを示唆している。しかも従来指摘されてきた *Notch2* だけでなく、*Notch1*、*3* にも注目する必要がある。また、肝芽細胞の培養系におけるこれらの遺伝子の働きを調べるために、温度感応性ゲル（メビオール）を用いた肝芽細胞の単独培養系を確立した。E12.5 胎児肝臓を細胞分散し、メビオール中で 1-5 日間懸濁培養したところ、間葉系の細胞は死滅し、肝芽細胞・肝細胞のみ生存した。5 日間培養を行うと、肝芽細胞は成熟肝細胞となった。他方、メビオールにマトリゲル（基底膜成分ゲル）を混合したゲル内で培養すると、胆管上皮細胞が分化した。この結果は、基底膜成分が肝芽細胞からの胆管上皮細胞の分化に重要なことを示している。

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 4 件）

- ① 塩尻信義 (2008) 胆道系の発生と Notch pathway. *小児外科*, 40(1), 17-23. 査読無
- ② Sugiyama, Y., Koike, T. and Shiojiri, N. (2007) Immunohistochemical analyses of cell-cell interactions during hepatic organoid formation from fetal mouse liver cells cultured in vitro. *Histochem. Cell Biol.*, 128, 521-531. 査読有
- ③ Shiojiri, N. (2007) Cell lineages in hepatic development and molecular mechanisms of cell-cell interactions underlying hepatoblast differentiation into mature hepatocytes and biliary epithelial cells. *Func. Dev. Embryol.*, 1, 91-98. 査読有
- ④ 塩尻信義 (2007) ES 細胞から胆管上皮細胞の分化. *肝胆膵*, 55(3), 373-380. 査読無

〔学会発表〕（計 14 件）

- ① 吉村崇・並河鷹夫・齋藤昇・島田清司・水谷誠・木下圭司・森誠・塩尻信義・桑名貴 (2008) ニワトリ、ニホンウズラ：鳥類を代表するバイオリソース 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会（神戸）

- NBRP 展示への参加 2008年12月9-12日
- ② 塩尻信義 (2008) 胆道閉鎖症モデルマウスにおける胆管形成異常と胆管形成機序 第35回日本胆道閉鎖症研究会(東京) 2008年12月6日
- ③ Shiojiri, N. (2008) Purification of hepatoblasts from fetal mouse livers by using a temperature-reversible gelation polymer and their application in regenerative medicine. Symposium on Innovation for Tissue Engineering of Metabolic Organs, The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2008), November 24-27, Fukuoka, Japan.
- ④ 滑川貴子・西村なおこ・小池亨・塩尻信義 (2008) *inv* マウス肝臓における門脈トライアド異常 日本動物学会第79回大会(福岡) 2008年9月5日
- ⑤ 頼紘一郎・小池亨・塩尻信義 (2008) 温度感応性ゲルを用いたマウス胎児肝芽細胞の新規精製技術の確立と、その分化特性に関する研究 第15回肝細胞研究会(静岡) 2008年6月28日
- ⑥ 杉山良典・小池亨・塩尻信義 (2008) マウス肝発生における血管内皮細胞での Flk-1 の活性化と血管内皮細胞と肝芽細胞の相互作用 第15回肝細胞研究会(静岡) 2008年6月28日
- ⑦ 迫立健・小池亨・塩尻信義 (2008) 肝細胞の成熟化は非実質細胞の組織形成と遺伝子発現、門脈トライアドの発生に影響する 第15回肝細胞研究会(静岡) 2008年6月28日
- ⑧ 頼紘一郎・小池亨・塩尻信義 (2008) 温度感応性ゲルを用いたマウス胎児肝幹細胞(肝芽細胞)の新規精製技術の確立 第7回日本再生医療学会総会(名古屋) 2008年3月13-14日
- ⑨ 塩尻信義 (2008) 肝臓発生学とその医学への応用 第12回群馬リバーコンファレンス(前橋) 特別講演 2008年2月28日
- ⑩ 森誠・塩尻信義・桑名貴 (2007) ニホンウズラの系統保存戦略-日本人が家畜化した動物- 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同年会(横浜) 特別企画ナシ

- ョナルバイオリソースプロジェクト(NBRP) 実物つきパネル展示 2007年12月11-15日
- ⑪ 西村なおこ・田垣輝臣・滑川貴子・小池亨・塩尻信義 (2007) *inv* マウスを用いた胆管形態形成機構に関する発生生物学的解析 第14回肝細胞研究会(鹿児島) 2007年6月22日
- ⑫ 杉山良典・小池亨・塩尻信義 (2007) マウス胎児期肝臓における血管発生と VEGF 受容体 Flk-1 の発現分布 第14回肝細胞研究会(鹿児島) 2007年6月22日
- ⑬ 塩尻信義 (2007) 肝臓は発生・分化における組織間ならびに細胞間相互作用ネットワーク 第6回日本再生医療学会(横浜) シンポジウム『肝臓発生学からみたES細胞と体性幹細胞による肝臓構築』2007年3月14日
- ⑭ 塩尻信義・杉山良典・小池亨 (2007) インビトロにおけるマウス胎生期肝臓細胞による organoid 形成 第6回日本再生医療学会総会(横浜) 2007年3月13日

[図書] (計 2 件)

- ① Yori, K., Koike, T. and Shiojiri, N. (2009) Purification of hepatoblasts from fetal mouse livers by using a temperature-reversible gelation polymer and their application in regenerative medicine. In: Proceeding of the 21st International Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2008), ppxxx-xxx.
- ② Oitate, T., Nishimura, N., Tagaki, T., Tada, A., Namekawa, T., Koike, T. and Shiojiri, N. (2009) Abnormal bile duct development in model mice for the biliary atresia and molecular mechanisms of bile duct morphogenesis. In: Biliary Atresia (Eds. A. Matsui, M. Nio, Y. Hayashi, R. Ohi), ppxx-xx, Tokyo, Kodansha Shuppan Service Center.

[その他]

- ① 塩尻信義 (2008) 肝臓の発生・分化・組織構築過程における細胞間ならびに組織間相互作用 **肝細胞研究会ホームページ「研究交流」** (<http://hepato.umin.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩尻 信義 (SHIOJIRI NOBUYOSHI)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：70162568

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし