

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 -2008

課題番号：19790472

研究課題名（和文） 肝幹細胞の増殖・分化制御の分子メカニズム

研究課題名（英文） Mechanism regulating proliferation and differentiation of liver stem cells

研究代表者

氏名（アルファベット）紙谷聡英（AKIHIDE KAMIYA）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 30321904

研究成果の概要：

我々は、より効率的なマウス胎仔肝幹細胞の分離を目指したスクリーニングを行い、E13-14 の肝幹・前駆細胞に CD13 や CD133 が強く発現することを見出した。これらの抗原抗体を用いた clone sorting による培養を行なうと、single cell 由来の大型でアルブミン(肝細胞マーカー)・cytokeratin 19 (CK19, 胆管細胞マーカー)両陽性のコロニーが形成できた。つまり、CD13 や CD133 陽性細胞が高い増殖能と二方向の分化能を持つ細胞であることが *in vitro* で示された。また、CD13 陽性細胞を、薬剤および肝切除により肝再生を誘導したマウスに移植することで、生体内で生着・増殖することを示した。

Sall4 は ES 細胞で未分化性維持や分化決定に重要な役割を果たしている転写因子である。Sall4 はマウス肝臓由来 Dlk+CD45-Ter119-分画の hepatoblast に発現し、成体の肝細胞では発現を認めず、肝発生進行に伴い発現は減少した。Hepatoblast に Sall4 を強制発現し肝細胞分化を誘導するオンコスタチン M や細胞外マトリクス存在下で培養したところ、肝細胞分化が抑制された。逆に胆管分化を誘導するコラーゲンゲル包埋培養では、CK19+ の branching 構造の数と大きさが増加した。一方 Sall4 をノックダウンすると branching 構造形成が抑制された。胆管障害マウスへ Sall4 強制発現 hepatoblast を移植すると胆管へ高率に分化することから Sall4 は hepatoblast の肝細胞分化を抑制する一方で胆管細胞分化を促進し、hepatoblast の 2 方向分化決定に重要な役割を担う可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝幹細胞、肝再生、肝臓病学

1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体内最大の臓器であり、血清蛋白質の合成や糖・脂質代謝、アルコール等の解毒といった体内のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている。特に外来薬物の中心的な代謝器官であり、その詳細な解析は新規薬品の開発等にも必要とされる。一方、胎児期の肝臓は、成熟した代謝機能等を保持しないが、強い増殖能力を持つことが知られている。その中心となるのが、Dlk⁺陽性の肝幹・前駆細胞であり Hepatocyte growth factor (HGF), Epidermal growth factor (EGF) 存在下で増殖する。しかし、増殖シグナルの下流で細胞周期等を司るメカニズムは未だ不明な点が多い。また、肝臓は固形臓器としては特徴的な高い再生能力を持ち、全体の70%を失っても残りの肝細胞が1,2回分裂することで、元の大きさ・機能を回復する。つまり、成熟し最終分化した細胞が同時に増殖能力を保持していることが肝細胞の特徴であるが、一旦生体外に移すと試験管内では増殖能力を再現することが難しいのが現状である。

2. 研究の目的

申請者らは、現在までにマウスを用いた胎児肝臓由来の初代培養系を構築し、幼弱肝細胞の分化・成熟を誘導する因子として IL-6 サイトカインファミリーのオンコスタチン M (OSM) や細胞外マトリクスを見出している (Kamiya et al., *EMBO J.* 1999, *Hepatology* 2002, 2004)。また、PXR の発現を、肝機能を司る重要な転写因子である hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) が直接制御していることを明らかとした (Kamiya et al., *Hepatology* 2003)。さらに、当研究室では胎児肝臓を分散し、FACSソーティングを行うことで肝幹細胞画分を同定し、細胞1個1個の増殖をコロニー培養法によって示している。これらの実験結果を進展させ、肝幹細胞を効率的に分離・増殖させた後に肝分化誘導因子を添加することで、大量の成熟肝細胞を効率的に得る系の構築を目指し、まずマウスをモデルとして研究を行う。

3. 研究の方法

当研究室は、造血幹細胞の分画・抽出にお

いて長期間研究を続けており、FACSソーターを用いた分画によって、

CD34^{kit}Scal⁺Lingage⁻画分の約30% (3個に1個の割合) が長期骨髄再建能を持つことを以前より報告している。さらに、現在市販されている表面抗原抗体も多種多様のものを保持、使用している。そこで今まで造血幹細胞研究で蓄積された情報をもとに、より効率的な肝幹細胞の分画・濃縮を可能と考えている。また、本研究では免疫不全マウスに肝細胞を移植するキメラマウス作成系の構築を目指している。従来、このような場合には、免疫不全マウスと遺伝的に肝障害を誘導したマウスを掛け合わせた特殊なマウスを使用している。しかし、肝障害を常に生じているためにマウスの成育等に問題があり取り扱いが難しいことや、使用できる免疫不全マウスに制限がある(掛け合わせ等に長時間必要である、二つの変異を併せ持つことでマウスが死亡してしまうケースが存在する)。マウスを外科的に処置した上で放射線照射することで、遺伝的背景に頼ることなく自由に移植できる系の構築を本研究では目指す。

4. 研究成果

E13-14の肝幹・前駆細胞に CD13 や CD133 が強く発現することを見出した。これらの抗原抗体を用いた clone sorting による培養を行なうと、single cell 由来の大型でアルブミン (肝細胞マーカー)・cytokeratin 19 (CK19, 胆管細胞マーカー) 両陽性のコロニーが形成できた。つまり、CD13 や CD133 陽性細胞が高い増殖能と二方向の分化能を持つ細胞であることが *in vitro* で示された。また、CD13 陽性細胞を、薬剤および肝切除により肝再生を誘導したマウスに移植することで、生体内で生着・増殖することを示した。

Sall4 はマウス肝臓由来 Dlk⁺CD45⁻Ter119⁻ hepatoblast に発現する一方、肝発生進行に伴って減少し、成体肝細胞では発現が見られなかった。Hepatoblast に Sall4 を強制発現すると、オンコスタチン M や細胞外マトリクス誘導性の肝細胞成熟が抑制された。また、胆管分化を誘導するコラーゲンゲル包埋培養では、Sall4 の強制発現で CK19 陽性の branching 構造の数と大きさが増加し

た。RNAi による Sall4 の抑制では branching 構造形成が減少した。さらに、胆管障害マウスへ Sall4 強制発現 hepatoblast を移植すると胆管へ高率に分化することから、Sall4 は肝細胞分化を抑制する一方で、胆管細胞分化を促進し、hepatoblast の 2 方向分化決定に重要な役割を担うことが示唆された。

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 3 件)

1. Kamiya A, Kakinuma S, Onodera M, Miyajima A, and Nakauchi H, Prospero-Related Homeobox 1 and Liver Receptor Homolog 1 Coordinately Regulate Long-Term Proliferation of Murine Fetal Hepatoblasts. **Hepatology**, 48, 252-264, 2008

2. Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S, Zeniya M, Nishinakamura R, Tajiri H, Nakauchi H, Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells. **Gastroenterology**, 136, 1000-1011, 2009.

3. Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A, Yamazaki Y, Oikawa T, Okada K, Nakauchi H, Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. **J. Hepatol.**, in press, 2009

[学会発表](計 2 件)

1. 紙谷聡英
マウス正常成体肝臓からの肝幹・前駆細胞の分離と増殖・分化誘導機構
第 43 回日本肝臓学会総会
(平成 19 年 5 月 31 日、東京)

2. Akihide Kamiya, Sei Kakinuma, Hiromitsu Nakauchi

Prospective and clonal analyses of hepatic stem/progenitor cells during liver development
FASEB summer research conference Liver Growth, Development and Disease
(August 3-8, 2008, Colorado, USA)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷聡英 (AKIHIDE KAMIYA)
東京大学・医科学研究所・助教
30321904

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし