

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790650
 研究課題名（和文） 肝発生初期における肝幹細胞の増殖・分化を制御する細胞間相互作用の解析
 研究課題名（英文） Analyses of cell-cell interaction regulating proliferation and differentiation of hepatic stem cells during early-liver development
 研究代表者 紙谷聡英 （ AKIHIDE KAMIYA ）
 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（和文）：

大量に得ることが困難な組織幹細胞を *in vitro* で培養・増殖し、再生医療へと応用することを目的として、胎生期の肝臓における幹細胞の増殖・分化誘導機構の解明を行った。我々は既に肝発生初期（マウス E9.5, E10.5）の肝臓に Dlk、CD13 両陽性の細胞が存在することを見いだしている。そこで、E9.5 及び E10.5 マウス肝臓から Dlk・CD13 両陽性の細胞を純化し、コロニー形成能やマーカータンパク質の発現を解析した。その結果、肝発生初期の Dlk・CD13 共陽性細胞はより内胚葉系前駆細胞に近い性質も保持しており、その後肝幹・前駆細胞としての形質を獲得していくことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Hepatic stem/progenitor cells (HSPCs) in the liver bud are postulated to migrate into septum transversum mesenchyme at around embryonic day (E) 9 in mice. Mid-fetal livers (E11.5-E14.5) support proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells derived from the aorta-gonad-mesonephros region. We established a new co-culture system, using mouse embryonic fibroblast cells, to permit analysis of the phenotypes of early-fetal HSPC candidates. In this co-culture system, CD13⁺Dlk⁺ cells purified from mouse early-fetal livers (E9.5 and E10.5) formed colonies composed of both albumin-positive hepatocytic cells and cytokeratin (CK) 19-positive cholangiocytic cells, indicating that early-fetal CD13⁺Dlk⁺ cells have properties of bi-potent progenitor cells. These first prospective studies of early-fetal HSPC candidates demonstrate that bi-potent stem/progenitor cells exist before E11.5.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

マウス胎生 11-14 日 (E11-14) の肝幹・前駆細胞のマーカーとして Dlk や E-cadherin, Liv2 などが現在までに報告されている。我々は表面抗原抗体の網羅的スクリーニングを用いて、CD13, CD133 等が胎生期・成体肝臓を通じて肝幹・前駆細胞に発現することを見出だした (Kamiya et al. Gastroenterology, 2009)。

一方、肝発生初期 (E9-10) で横中隔細胞特異的に発現する Hlx1 遺伝子が欠損したマウスでは、肝臓の原基は形成されるものの、その後の増殖に異常が見られることが報告されている (Hentsch et al. Gene Dev., 1996)。Hlx1 は肝臓原基の肝幹細胞には発現しないことから、横中隔組織から分泌されるパラクライン的な因子が、内胚葉の肝幹細胞への分化系列決定や増殖等、肝臓の正常な発生に深く関与していると推測される。しかし、肝幹細胞及び横中隔間の相互作用の分子メカニズムは、Bone morphogenetic protein などの関与が報告されているが、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

肝発生初期の肝芽から、CD13, Dlk 両陽性細胞を純化した。リアルタイム PCR 等を用いて、肝発生中期の CD13, Dlk 両陽性細胞との比較を行なった。E9 の CD13⁺Dlk⁺細胞と CD13⁻または Dlk⁻の細胞との発現を比較すると、幼弱肝細胞・肝前駆細胞のマーカーとして知られる α -fetoprotein (AFP) は、CD13⁺Dlk⁺細胞でのみ発現していた。つまり、肝発生初期においても、CD13 や Dlk が肝幹・前駆細胞のマーカーと考えられる。そこで、発生段階における CD13⁺Dlk⁺細胞の遺伝子発現変化を解析したところ、AFP, アルブミンの発現が発生が進むにつれて著しく増加するのに対して、CK19 は、E9 でのみ強く発現していた。つまり、E9 前後と E13 前後の肝幹・前駆細胞は、その性質が大きく異なることが示唆された。FACS を用いた分離・培養を行なうと、E9, 10 の細胞は E13 前後の細胞と比較して、より未分化な幹細胞と考えられるにも関わらず、その増殖能

やコロニー形成能は低下していた。我々が現在使用している培養系は、HGF, EGF および E14 のマウス肝臓細胞の培養上清を添加したものである。つまり、E9 前後の細胞の増殖には、これら液性因子とは別のファクターが必要とされる可能性がある。レトロ・レンチウイルスによる遺伝子導入や中和抗体の添加等によって、この時期の肝臓原基の増殖・分化を制御する細胞間相互作用の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

研究目的として、肝臓原基における幹細胞の機能維持のための細胞間相互作用を解明し、肝幹細胞の効率的な増殖法の確立等に必要な知見を得ることを目指す。そのため本研究では、(1) 抗体による網羅的スクリーニングで得られた表面抗原マーカー等を用いて、マウス胎生 9, 10 日目の肝臓からの初期肝幹・前駆細胞の純化法を確立する。(2) 純化した肝幹・前駆細胞および横中隔細胞の共培養系を構築し、横中隔細胞から肝幹・前駆細胞に影響を与えるパラクラインファクターの同定を行なう。以上の方法を用いて、肝幹細胞の増殖・分化に必要な細胞間相互作用機構を解析する。

4. 研究成果

E9.5 及び E10.5 マウス肝臓から Dlk・CD13 両陽性の細胞を純化し、コロニー形成能やマーカータンパク質の発現を解析した。コロニーアッセイを行った結果、コラーゲン上の単層培養系では肝発生初期由来の Dlk・CD13 共陽性細胞は肝発生中期由来の細胞と比較してコロニー形成能が著しく低い傾向が認められた。そこで feeder 細胞を用いた共培養を行った結果、肝発生初期の Dlk・CD13 共陽性細胞からも Albumin 及び Cytokeratin19 (CK19) 両陽性であるコロニーが得られた。E9.5 の Dlk・CD13 共陽性細胞の培養には Rho Kinase 阻害剤の添加が必要であるのに対し、それ以降の Dlk・CD13 共陽性細胞では Rho Kinase 阻害剤の効果は見られなかった。各発生段階の Dlk・CD13 共陽性細胞での遺伝子発現を解析したところ、発生が進むにつれて肝細胞特異的遺伝

子の発現が上昇していた。一方、内胚葉系細胞のマーカーである Sox17 の発現は、E9.5 で最も強くその後減少する。以上より、肝発生初期の Dlk・CD13 共陽性細胞はより内胚葉系前駆細胞に近い性質も保持しており、その後肝幹・前駆細胞としての形質を獲得していくことが示唆された。

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 Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and independent manners. *Hepatology*, 52, 1111-1123, 2010
- ② Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology*, 137, 1114-1126, 2009
- ③ Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Letter*, 286, 145-153, 2009

[学会発表] (計 3 件)

- ①紙谷聡英、中内啓光「肝発生初期および中期由来の肝幹/前駆細胞の in vitro 増幅系の構築」第 14 回日本肝臓学会大会 平成 22 年 10 月 14 日 (横浜)
- ②紙谷聡英、岡田健、伊藤慶一、中内啓光「In vitro 増幅系を用いた発生期における肝幹/前駆細胞の機能解析」第 17 回肝細胞研究会 平成 22 年 6 月 18 日 (秋田)
- ③紙谷聡英、岡田健、伊藤慶一、伊東秀典、中内啓光「胎仔肝幹・前駆細胞の新規培養系の構築」第 9 回日本再生医療学会総会 平成 22 年 3 月 18 日 (広島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：多能性幹細胞からの分化誘導された細胞の生産方法

発明者：中内啓光、紙谷聡英、鈴木奈穂、伊藤慶一、山崎聡

権利者：国立大学法人 東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/072044

出願年月日：2010/12/08

国内外の別：外国

○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

肝細胞研究会 Web ページ (研究交流)
(<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu13.html>)

総説タイトル：発生期および成体における肝幹・前駆細胞の増殖・分化誘導機構
著者：紙谷聡英

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

研究者番号：30321904

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

