

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390034

研究課題名(和文)肝組織発生に必要な胚性肝中皮細胞由来の血管発生制御因子群の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of hepatic mesothelium-derived angiogenic factors in embryonic hepatic histogenesis

研究代表者

横内 裕二 (YOKOUCHI, Yuji)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60252227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：胚性肝の組織は肝芽細胞と間充織細胞群との相互作用によって自律的に形成されるがその理解は再生医学に利用するには不十分である。マウス胚肝臓ではTGF-betaが肝芽細胞と肝中皮層で発現するが各々の細胞系譜における役割は未だ解析されていない。今回、我々はヒトALK5のドミナントネガティブ型(dnALK5)を各々の細胞系譜で条件的に発現させTGF-beta経路の機能解析を行った。

dnALK5の肝芽細胞における強制発現は肝上皮の形成不全を誘起した。肝中皮細胞系譜では、肝中皮層とその派生細胞群の形成不全を誘起した。本結果はTGF-beta経路が肝芽細胞索と肝中皮細胞系譜の発生に関与することを示す。

研究成果の概要(英文)：The embryonic liver tissue is autonomously formed by the intracellular interactions among hepatoblasts and other mesenchymal cells. However, the understanding is not sufficient for application in regenerative medicine. In the embryonic mouse liver, TGF-betas are expressed in hepatoblasts and in hepatic mesothelial layer. But, the roles in each cell-lineage have not been analyzed yet. Here, to perform the functional analysis of TGF-beta signaling pathway in hepatoblasts and hepatic mesothelial cell-lineage during the hepatic histogenesis, we conditionally expressed the dominant negative form of human ALK5 in each cell-lineage. In hepatoblasts, forced expression of dnALK5 caused dysgenesis of hepatic epithelia. In hepatic mesothelial cell-lineage, the forced expression caused dysgenesis of hepatic mesothelium and derivatives. These data indicate that the TGF-beta pathway is involved in branching of hepatoblast cords and maintenance and differentiation of hepatic mesothelial cell-lineage.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞組織 発生分化 肝臓 再生医学 TGF-beta WT1 Tek FoxA2

1. 研究開始当初の背景

(1) HCV/HBV キャリアが 200 万人を超える日本人の肝硬変/肝細胞ガンの発生率は今後急上昇することは確実である。従って、肝臓の再生医療の基盤となる肝臓の組織発生過程を理解することは、科学的社会的に重要である。しかしこの肝組織発生に必須である肝血管の「血管由来因子」とその「発生機構」の研究はこれまで行われていなかった。

(2) 我々は、前者が Neurturin と Wnt9a であることを世界に先駆けて明らかにしている。

(3) 残された重要課題である「肝血管の発生機構」に関して、その制御因子の候補(FGF18, TGF-beta2,3)が胚性肝中皮で発現していることを我々は既に見いだしている。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究計画では、これらの候補遺伝子群のシグナル伝達を細胞系譜特異的に阻害、異所的強制発現させることで、肝血管を構成する細胞群におけるシグナルの作用点を明らかにする。具体的には、細胞系譜特異的に TGF-beta シグナリング経路のシグナル量を増減させた際の表現型を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞系譜特異的 Cre ドライバーマウスの確保

肝組織発生における TGF-beta signaling 経路の機能を明らかにするために、これまでに Cre-driver mouse として、WT1-EGFPCre (胚性中皮特異的ドライバー)、WT1-CreERT2(前項の誘導型)、Tek-Cre (血管内皮細胞特異的ドライバー)の購入と繁殖、さらに FoxA2-nEGFP-CreER (内胚葉特異的誘導型 Cre ドライバー)の繁殖を行った。

(2) Cre 依存的バイシストロニックレポーター/エフェクターマウスの樹立 (図1)

TGF-beta シグナリング経路の阻害とその細胞追跡を同時に行うために、Ai-hALK5-DN-AT2 (略称 DNAT2)を樹立した。具体的には マウス ES 細胞を用いた相同組換え法により ROSA26 遺伝子座への bicistronic expression cassette (CAGpromoter-loxP-STOPx3-loxP-dnALK5-2A-tdTomato. dnALK5: dominant negative form of human ALK5)のノックインマウスを作製した。

TGF-beta シグナリング経路の異所的活性化とその細胞追跡を同時に行うために Ai-hALK5-CA-AT2 (略称 CAAT2)を樹立した。具体的には マウス ES 細胞を用いた相同組換え法により ROSA26 遺伝子座への bicistronic expression cassette (CAGpromoter-loxP-STOPx3-loxP-caALK5-2A-tdTomato. caALK5: constitutively

active form of human ALK5)のノックインマウスを作製した。

さらにコントロールとして細胞追跡のみを行うために Cre 依存的に tandem Tomato のみを発現するように設計した reporter mouse として、Ai-3tTom (略称 3tTom)を作成した。

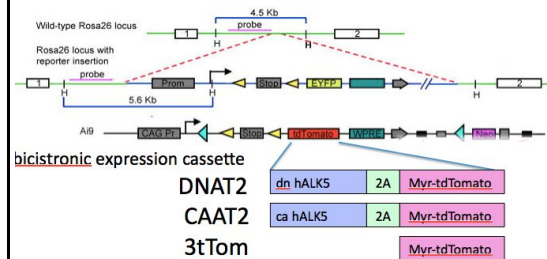


図1 Ai-DNAT2, Ai-CAAT2, Ai-3tTomのマップ

4. 研究成果

(1) 肝中皮細胞系譜における TGF-beta シグナリング経路の機能解析

TGF-beta シグナリング経路を胚性中皮細胞特異的に阻害するために、WT1-CreERT2(+/-); DNAT2(+/-) 胚と WT1-CreERT2(+/-); 3tTom(+/-)胚(コントロール)を交配により作成し、E10.5 にてタモキシフェン投与により CreERT2 を活性化させ dnALK5 を胚性中皮細胞特異的に発現させた。

E12.5 において肝臓における胚性中皮細胞系譜の分布をコントロール胚 (WT1-CreERT2(+/-); 3tTom(+/-))と比較・解析したところ、肝中皮の薄層化と肝組織内に分布するはずの細胞集団の低形成が観察された(図2)。このことは肝中皮細胞系譜の維持と分化に TGF-beta シグナリング経路が関与していることを示している。

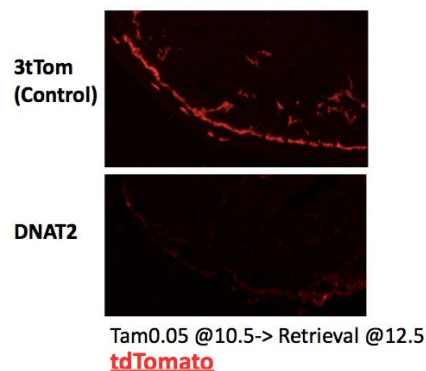


図2 肝中皮におけるTGF-beta シグナリング経路の抑制

(2) 肝芽細胞系譜における TGF-beta シグナリング経路の機能解析

TGF-beta シグナリング経路を肝芽細胞特異的に阻害するために、FoxA2-EGFP-CreER(+/-); DNAT2(+/-) 胚を交配により作成し、E8.5 にてタモキシ

エン投与により CreERT2 を活性化させ dnALK5 を肝芽細胞特異的に発現させた。

E11.5-13.5 肝臓における肝芽細胞の分布をコントロール胚 (FoxA2-nEGFP-CreER(+/-); 3tTom(+/-)) と比較・解析したところ、肝芽細胞の分枝の低形成が観察された。

また低濃度タモキシフェンの投与により CreERT2 をパッチ状に活性化させ、dnALK5 強制発現細胞のクローン解析を行ったところ、dnALK5 の強制発現により E11.5 以降における肝芽細胞クローンの拡大が明らかに抑制された (図 3)。このことは肝芽細胞から構成された肝芽細胞索の形態形成に TGF-beta シグナリング経路が関与していることを示している。

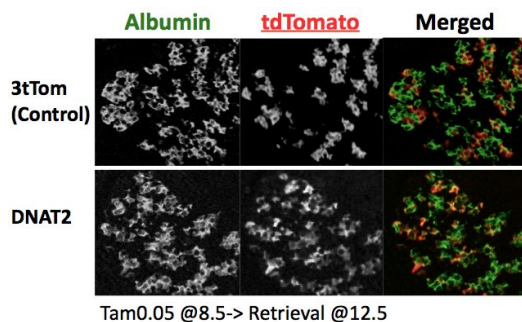


図3 肝芽細胞におけるTGF-beta シグナリング経路の抑制

(3) 内皮細胞系譜における TGF-beta シグナリング経路の機能解析

TGF-beta シグナリング経路を内皮細胞特異的に阻害するために、Tek-Cre(+/-); DNAT2(+/-) 胚を交配により作成し、dnALK5 を内皮細胞特異的に発現させた。

E11.5-13.5 肝臓における内皮細胞の分布をコントロール胚 (Tek-Cre(+/-); 3tTom(+/-)) と比較・解析したが、dnALK5 による効果はいまのところ認められない。定量的解析が必要である。

(4) 国内外における位置づけとインパクト

これまでに、肝臓組織発生における TGF-beta シグナリングの機能解析は行われていたが、細胞系譜特異的にシグナリング阻害を行って解析した報告はない。肝臓組織発生における TGF-beta シグナリング経路の細胞系譜毎における機能解析は本研究が初めてであり、発生生物学における基礎知識として重要である。

本研究は iPS 細胞から人工的に肝細胞を誘導しさらに 3 次元組織を人工的に構築させる際の基盤知識となることから 再生医学分野において重要な知見である。

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 4件)

Chi L, Saarela U, Railo A, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Skovorodkin, I., Anthony, S., Katsu, K., Liu, Y., Shan, J., Salgueiro, A.M., Belo, J.A., Davies, J., Yokouchi, Y., Vainio, S.J. A secreted BMP antagonist, Cer1, fine tunes the spatial organization of the ureteric bud tree during mouse kidney development, *PLoS One*, 査読有, 6(11), 2011, e27676, doi: 10.1371/journal.pone.0027676.

Katsu, K., Tokumori, D., Tatsumi, N., Suzuki, A. and Yokouchi, Y. BMP inhibition by DAN in Hensen's node is a critical step for the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo, *Developmental Biology*, 査読有, 363(1), 2012, 15-26, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.015

Katsu, K., Tatsumi, N., Niki, D., Yamamura, K. and Yokouchi, Y. Multi-modal effects of BMP signaling on Nodal expression in the lateral plate mesoderm during left-right axis formation in the chick embryo, *Developmental Biology*, 査読有, 374(1), 2013, 71-84, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.027

✉ Hiroko Suda, Daiki Yoshii, Kenichi Yamamura, Yuji Yokouchi, Yukihiko Inomata, New insight into reactive ductular cells of biliary atresia provided by pathological assessment of SOX9, *Pediatric Surgery International*, 査読有, 30, 2014, 481-492, doi:10.1007/s00383-014-3497-7

[学会発表](計 4件)

吉井大貴、横内裕二、須田博子、猪股裕紀洋、胆道閉鎖症における肝細胞の胆管細胞化生、肝線維化に対するsox9遺伝子の関与についての検討、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月4日 国立京都国際会館(京都市)

横内裕二、吉井大貴、竹田直樹、須田博子、猪股裕紀洋、山村研一、Functional analysis of the TGF-β pathway in hepatoblasts during mouse hepatic histogenesis. 第47回日本発生生物学会大会、2014年5月29日 WINC AICHI (名古屋市)

横内裕二、竹田直樹、佐々木洋、山村研一、Functional Analysis of TGF-beta signaling pathway in hepatoblasts during mouse hepatic histogenesis、熊本医学・生物科学国

際シンポジウム、2014年9月4日、熊本市医師
会館（熊本市）

吉井大貴、横内裕二、須田博子、猪股裕紀
洋、Significance of SOX9 gene for
trans-differentiation of
hepatocyte in liver、熊本医学・生物科
学国際シンポジウム、2014年9月4日、熊本市
医師会館（熊本市）

〔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〕

ホームページ等

[http://www.fmu.ac.jp/univ/sangaku/kifu_
koza_list.html#kansaibo](http://www.fmu.ac.jp/univ/sangaku/kifu_koza_list.html#kansaibo)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横内 裕二 (YOKOUCHI, Yuji)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：6 0 2 5 2 2 2 7

(2)研究分担者

山村 研一 (YAMAMURA, Ken-ichi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・シニ
ア教授

研究者番号：9 0 1 1 5 1 9 7

(3)連携研究者

山村 研一 (YAMAMURA, Ken-ichi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・シニ
ア教授

研究者番号：9 0 1 1 5 1 9 7