

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790271

研究課題名（和文） 肝再生に関わる未分化前駆細胞（オーバル細胞）制御シグナルネットワークの解明

研究課題名（英文） Investigation of the signal network regulating adult liver progenitor cells (oval cells) involved in liver regeneration

研究代表者

伊藤 暢 (ITOHI TOHRU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50396917

研究成果の概要（和文）： 重篤な障害を受けた肝臓では、未分化性を有する特殊な幹／前駆細胞（オーバル細胞）が出現して、再生過程に寄与すると考えられているが、その詳細は不明であった。マウス肝障害モデルを用いた、細胞間相互作用に注目した種々の解析により、オーバル細胞を支持する新たな細胞種の存在と、この細胞から産生・分泌されてオーバル細胞の出現や増殖・分化の制御に関わるきわめて重要な細胞外シグナル因子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In severely damaged livers where hepatocyte proliferation is impaired, facultative liver stem/progenitor cells (oval cells) proliferate and are assumed to contribute to regeneration. We sought to elucidate the underlying mechanisms by focusing on cell-to-cell interaction that may take place in the course of oval cell activation, and have identified a novel cell population that provides a critical intercellular signaling molecule, thereby supporting and regulating oval cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学、シグナル伝達、肝臓、組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、生体における代謝機能の中心的な役割を担っており、生命活動の維持に必須の重要な臓器である。肝臓はまた、哺乳動物の臓器としては例外的に、きわめて高い再生能力を有することでも知られている。障害を受けた肝臓では、通常は残存する肝細胞が分裂・増殖することで再生して機能を回復させる。一方で、重篤な障害を受けた肝臓では、

未分化性を有する特殊な肝幹／前駆細胞（オーバル細胞）が活性化して再生に寄与すると考えられている。オーバル細胞はまた、肝がん組織周辺部においても、その出現がしばしば観察されることから、肝がんの発生との関連からも注目を集めている。近年、オーバル細胞の性状が解明されつつあるが、その動態を制御する分子機構については未だほとんど明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、マウス肝障害モデルを用いて、成体肝オーバル細胞の発生・増殖・分化を制御するシグナルネットワークの様態と作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスにおいてオーバル細胞が誘導される肝障害モデルとして、肝毒素である3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) の食餌投与を行った。オーバル細胞や、他の各種肝臓構成細胞群の性状・動態を、免疫組織化学染色法/蛍光免疫染色法や、特異的な細胞表面抗原に対する抗体を用いたフローサイトメトリー法等により解析した。また、肝臓全体あるいは特定の細胞群における遺伝子発現パターンについて、定量的PCR法により解析した。

マウス成体肝臓における FGF7 の機能については、*Fgf7* 遺伝子欠損 (ノックアウト) マウス、および、肝臓特異的 FGF7 トランスジェニックマウスを入手・作製し、解析を行った。また、成体肝臓への直接的遺伝子導入・発現系として、Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法を用いた。

4. 研究成果

近年、様々な臓器・組織の幹細胞に対して、それらを支持する細胞 (いわゆる「ニッチ細胞」) が存在し、種々の細胞間シグナルを介してそれらの動態 (増殖、分化、未分化性維持等) の制御に重要な役割を担うことが明らかとなっている。そこで、肝臓のオーバル細胞に対してもそのような支持細胞の存在を仮定し、これを同定することを試みた。その結果、障害肝においてオーバル細胞の周囲には細胞表面マーカーThy1 を発現する細胞 (Thy1 陽性細胞) が集積していることを見出した。そのような Thy1 陽性細胞は血液細胞マーカーCD45 は陰性であり、種々の解析により間葉系細胞としての性質を有することが明らかとなった。

次に、上皮系細胞 (オーバル細胞) と間葉系細胞 (Thy1 陽性細胞) との相互作用という視点から FGF ファミリーを含む種々の細胞間シグナル伝達因子に注目し、遺伝子発現解析等を行った。その結果、Thy1 陽性細胞は FGF ファミリーのリガンドの一つである FGF7 を発現することが明らかとなった。一方で、オーバル細胞は FGF7 に対する特異的な受容体 FGFR2b を発現していた。すなわち、Thy1 陽性細胞が産生・分泌した FGF7 がオーバル細胞に作用する可能性が強く示唆された。

そこで、マウス成体肝臓 (*in vivo*) における FGF7 の機能解析を行った。*Fgf7* 遺伝子欠損マウスでは、肝障害時のオーバル細胞の

誘導が著しく阻害されており、致死率が有意に上昇した。逆に、肝臓特異的 FGF7 トランスジェニックマウスや HTVi 法を用いてマウス成体肝臓に FGF7 を強制発現させたところ、オーバル細胞に類似した細胞が誘導されると共に、肝障害の緩和が認められた。さらに詳細な解析から、実際に肝細胞への分化能を有する肝前駆細胞活性が FGF7 シグナルにより増幅されることが明らかとなった。以上の結果から、Thy1 陽性細胞がオーバル細胞に対するニッチを構成し、FGF7 が機能的ニッチシグナルとしてオーバル細胞の支持・制御に必須の役割を担うことが、初めて明らかとなった。

また、本研究課題では、正常肝および障害肝を用いたマイクロアレイ解析を実施した。その結果、オーバル細胞とニッチ構成細胞との相互作用を担う可能性のある FGF7 以外の種々の候補分子を同定した。これらの候補分子について、特にオーバル細胞側より産生されてニッチ側の制御に関わると想定される分子に重点を置きながら、*in vivo* の系を中心とした機能的な解析を進めている。

今後は、それらの新規分子と FGF7 シグナルとの関連・相互作用等に注目してさらなる解析を展開することで、オーバル細胞の制御に関わる細胞間シグナルネットワークの全容解明を目指したい。これを通じて、肝臓を含めた組織・臓器の再生の普遍的なメカニズムの理解や、また、肝がん等の肝疾患の克服にも貢献できると考えている。

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2件)

- ① Minoru Tanaka, Tohru Itoh, Naoki Tanimizu, and Atsushi Miyajima. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. The Journal of Biochemistry, 査読有, Vol.149, 2011, pp.231-239.
DOI: 10.1093/jb/mvr001
- ② 伊藤 暢, 田中 稔. 細胞間相互作用による肝幹細胞の発生・分化の制御機構. 実験医学, 査読無, Vol. 29, No. 13, 2011, pp. 2078-2083.

[学会発表] (計14件)

- ① Tohru Itoh, Conserved role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell

- response in diseased mouse livers、第34回 日本分子生物学会年会、平成23年12月13日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ② Tohru Itoh、Critical role of FGF7 in regulating stem/progenitor cell response and regeneration in damaged livers、Liver Down Under 2011: Liver Development, Disease & Regeneration、平成23年12月2日、The University Club, University of Western Australia (Perth, Australia)
- ③ 伊藤 暢、FGF シグナルによる成体肝幹／前駆細胞と肝再生の制御、第16回 分生研シンポジウム、平成23年10月12日、東京大学 弥生講堂（東京都文京区）
- ④ 伊藤 暢、マウス肝障害モデルにおいて前駆細胞反応を支持する FGF7 シグナルの普遍性の検証、第18回 肝細胞研究会、平成23年6月24日、東京ガーデンパレス（東京都文京区）
- ⑤ Tohru Itoh、FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration、The 9th Stem Cell Research Symposium、平成23年5月13日、Izumi Garden Gallery（東京都港区）
- ⑥ 伊藤 暢、マウス肝障害モデルにおける肝幹／前駆細胞反応の FGF シグナルによる制御、第10回 日本再生医療学会総会、平成23年3月2日、京王プラザホテル（東京都新宿区）
- ⑦ Tohru Itoh、FGF7 is critical for progenitor cell-mediated regeneration in the adult mouse liver、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease"、平成23年1月31日、Eldorado Hotel & Spa (Santa Fe, New Mexico, USA)
- ⑧ Tohru Itoh、Searching for signaling molecules regulating adult liver stem/progenitor cell response using the hydrodynamic tail vein injection-mediated in vivo gene transfer technique、BMB2010 (第33回 日本分子生物学会年会・第83回 日本生化学会大会 合同大会)、平成22年12月9日(ポスター)／平成22年12月10日(口演)、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
- ⑨ 伊藤 暢、肝障害時に誘導される幹／前駆細胞反応および再生の FGF シグナルによる制御、第31回 幹細胞治療研究フォーラム、平成22年11月18日、東京大学医科学研究所（東京都港区）
- ⑩ 伊藤 暢、マウス成体肝臓における幹／前駆細胞反応制御シグナルの解析、IN Cell User's Day 2010、平成22年8月27日、GEヘルスケア・ジャパン ライフサイエンス新宿本部（東京都新宿区）
- ⑪ Tohru Itoh、Searching for signaling molecules regulating adult liver progenitor cell response using the hydrodynamic tail vein injection-mediated in vivo gene transfer technique、FASEB Summer Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology"、平成22年8月18日、Snowmass Village (Colorado, USA)
- ⑫ 伊藤 暢、マウス肝組織切片を用いたイメージング解析：成体肝臓における幹／前駆細胞反応の制御メカニズム、第20回日本サイトメトリー学会学術集会、平成22年6月26日、東京慈恵医科大学（東京都港区）
- ⑬ 伊藤 暢、成体肝幹／前駆細胞反応を制御する細胞間シグナルネットワーク、第17回 肝細胞研究会、平成22年6月19日、秋田アトリオン（秋田県秋田市）
- ⑭ 伊藤 暢、マウス成体肝前駆細胞反応に関与するシグナル分子の探索、第12回プロメテウスの会（日本肝臓医生物学研究会；LBSG-J）、平成22年4月17日、静岡市産学交流センター・中小企業支援センター（静岡県静岡市）。
- [図書] (計1件)
- ① Tohru Itoh, Minoru Tanaka, and Atsushi Miyajima. Springer、Regenerative Medicine : From Protocol to Patient (Chapter 14. Liver Stem Cells)、2011、pp. 327-349.
- [その他]
ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/cytokine/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 暢 (ITO TOHRU)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：50396917

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：