

## 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5月23日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010~2011

課題番号：22790386

研究課題名（和文） 肝臓の胆管をモデルとした上皮組織構造の形成メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms regulating epithelial morphogenesis during the development of bile ducts

研究代表者

谷水 直樹 (Naoki Tanimizu)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00333386

研究成果の概要（和文）：

本研究では、①胆管構造形成におけるLamininの機能解析、および②分化した上皮細胞特異的な遺伝子を同定し、肝前駆細胞株HPPLがCystを形成する3次元培養系を用いたそれらの分子の機能解析を行うことで、上皮細胞が分化・成熟して組織構造を形成する過程を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

胆管の発生過程において、Laminin  $\alpha 1$ を含むisoformは胆管上皮細胞の運命決定および構造形成の初期に、Laminin  $\alpha 5$ を含むisoformは胆管構造の成熟化に寄与していることが明らかになった。

肝前駆細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現を比較し、上皮細胞特異的な遺伝子を同定した。次に、同定した遺伝子をHPPLに導入し、Cyst構造への影響を検討した。解析を行った分子の中で、転写因子Grhl2が上皮バリア機能を亢進して、Cyst管腔の発達を促進することがわかった。Grhl2は、Claudin3と4およびRab25の発現を制御することで、機能的なタイト結合の形成を制御して、管腔構造形成を促進していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that  $\alpha 1$ -containing laminin regulated the lineage determination of cholangiocytes and the initial stage of bile duct morphogenesis, whereas  $\alpha 5$ -containing laminin contributes to the formation of mature duct structures. We also searched genes upregulated in mature cholangiocytes and identified a transcription factor grainyhead like 2 (Grhl2). We introduced Grhl2 into HPPL, a liver progenitor cell line, and found that Grhl2 enlarged the central lumen of cysts. We further found that Grhl2 enhanced barrier function of the monolayer of HPPL and upregulated expression of Claudin3, Claudin4, and Rab25. Thus, we conclude that Grhl2 promotes the maturation of epithelial lumen by governing the molecular network among Claudin3, Claudin4, and Rab25.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・ 実験病理学

キーワード：細胞、胆管上皮細胞、組織形成、幹細胞、3次元培養、上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

上皮系臓器が機能を発揮するためには、細胞極性を獲得した上皮細胞がさらに立体的な組織構造を形成することが必要である。上皮細胞極性の形成過程の分子メカニズムが詳細に検討されている一方で、上皮細胞の成熟や組織構造形成を制御する分子メカニズムについては不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、肝臓の胆管を上皮細胞が形成する組織構造のモデルとして用い、胆管上皮細胞特異的に発現している既知の分子あるいは新たな遺伝子を同定しその機能を解析することで、**組織形成を制御するメカニズム**について分子レベルで明らかにすることを目的として行った。

## 3. 研究の方法

(1) 胆管構造成熟の過程で、基底膜の成分 laminin の isoform の発現がどのように変化するか、またどのような機能を持つのかを明らかにするために、生体内での laminin  $\alpha$  鎖の発現を調べたり、3次元培養を用いて、上皮細胞と laminin の相互作用を阻害するなどして検討する。

(2) 肝芽細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現を Microarray によって比較したデータをもとに、胆管上皮細胞特異的な転写因子を同定する。

(3) HPPL の3次元培養系を用いて、同定した遺伝子の機能解析を行う。

(4) 形態形成に影響を与える転写因子のターゲットを同定し、管腔形成を制御する分子間ネットワークを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 胆管の構造形成における laminin $\alpha 1$ と $\alpha 5$ の機能解析

#### 発現パターンの解析

胎仔期、新生仔期、成体の肝臓を、laminin  $\alpha 1$  および  $\alpha 5$  に対する抗体を用いて免疫染色を行い、基底膜を構成する laminin の発現を検討した。その結果、胎仔期の胆管を裏打ちする基底膜では  $\alpha 1$  と  $\alpha 5$  が発現しているが、管腔構造が完成する生後 10 日以降は、 $\alpha 1$  の発現が消失し、 $\alpha 5$  のみが発現していた。細胞を分取して laminin  $\alpha 1$  および  $\alpha 5$  を発現

している細胞の同定を行ったところ、線維芽細胞が laminin  $\alpha 1$ 、胆管上皮細胞が laminin  $\alpha 5$  を発現していることがわかった。したがって、胆管発生の初期には線維芽細胞から laminin が供給されるが、発生が進行すると胆管上皮細胞自らが laminin を発現・供給していると考えられた。

#### Cyst 形成過程での laminin の機能解析

HPPL の3次元培養では、Laminin  $\alpha 1$  を含む laminin 依存的に Cyst 形成が進むが、完成した Cyst の周囲には laminin  $\alpha 5$  が存在した。したがって、肝前駆細胞は、胆管構造形成の過程で、 $\alpha 1$  との相互作用から  $\alpha 5$  との相互作用に移行し、 $\alpha 5$  鎖に依存して管腔構造の形成・維持を行っているのではないかと考えた。そこで、laminin のレセプターである  $\beta 1$ -integrin の中和抗体を①培養開始直後から加えて laminin  $\alpha 1$  との相互作用を阻害、②Cyst 形成の後に加えて laminin  $\alpha 5$  との相互作用を阻害した。その結果、laminin  $\alpha 1$  は Cyst 形成に必要で、その後の Cyst の構造成熟や維持には laminin  $\alpha 5$  が重要である可能性が明らかになった。

#### Laminin $\alpha 5$ の in vivo での機能解析

Laminin  $\alpha 5$  の機能を解析するために、laminin  $\alpha 5$  のノックアウトマウスの肝臓を入手し、胆管の構造を解析した。胎生 17 日のノックアウトマウスの肝臓では、野生型と同様、門脈の周囲に胆管上皮細胞が認められた。しかしながら、ノックアウトマウスの胆管は、未熟な構造の状態にとどまっているものが多かった。以上の結果から、肝芽細胞から胆管上皮細胞が分化する段階と胆管構造形成の開始時点では、laminin  $\alpha 1$  を含む laminin と上皮細胞の相互作用が重要であるが、その後、構造形成が進行して成熟した胆管構造が完成するためには、laminin  $\alpha 5$  を含む laminin が重要な機能を果たしていると考えられた（以上の成果は、論文投稿中）。

### (2) 胆管特異的な転写因子の同定

肝芽細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現を比較したデータをもとに、胆管上皮細胞特異的な転写因子の同定を試みた。Microarray のデータを定量 PCR を用いて検証し、Ankrd1, Ehf, Grhl2, Hey1, Scx, Sox9 などの発現が胆管上皮細胞で高いことが明らかになった。Grhl2 と Sox9 については、市販の抗体を用いて、胆管上皮細胞で発現していることを確認した。

### (3) 胆管特異的な遺伝子の機能解析

上に示した 5 種類の転写因子を、それぞれレ

トロウイルスベクターを用いて HPPL に導入し、3 次元培養を行った。形成されたシストの大きさを比較したところ、Grhl2 を導入した場合に、Cyst の管腔が大きく発達した (図 1)。

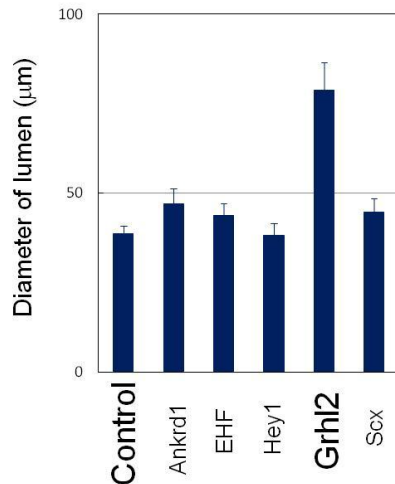


図 1. 転写因子発現による管腔径の変化

#### (4) Grhl2 による管腔形成拡張のメカニズム

管腔形成能は、上皮細胞としての性質を反映していると考えられる。ところで、前駆細胞である HPPL と成体肝から分離した成熟胆管上皮細胞が形成する Cyst を比較すると、成熟胆管上皮細胞の方が大きく発達した管腔を持つ Cyst を形成した。このことから、Grhl2 の導入によって、HPPL の上皮細胞としての分化度が上がったのではないかと考えた。そこで、上皮細胞の重要な機能である上皮バリア機能の変化を検討した。HPPL monolayer における Dextran の透過性を調べたところ、その透過性が大きく低下している、すなわちバリア機能が亢進していることが明らかになった (図 2)。

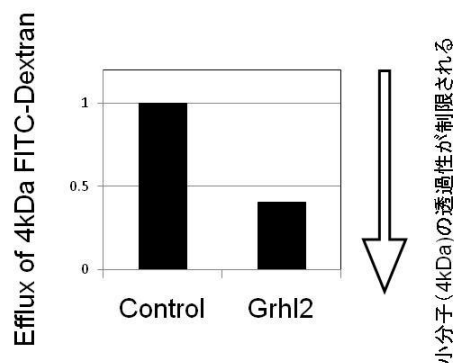


図 2. FITC-Dextran の透過性の変化

バリア機能を担う Claudin(Cldn)ファミリー

一の発現を解析したところ、Grhl2 は Cldn3 と Cldn4 の発現を上昇させていた。Cldn3 は単独で、バリア機能を亢進し、Cyst 管腔を拡張させる作用があることが明らかになった。一方、Cldn4 は、別のターゲットである Rab25 の機能の助けを得て、Tight Junction に局在する可能性を示唆するデータも得られた。

以上の結果から、Grhl2 は図 3 のような分子間ネットワークを形成することで、上皮細胞の分化・成熟と形態形成を制御していると考えられた (論文投稿中)。

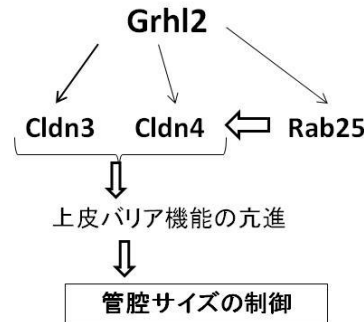


図 3. Grhl2 による管腔サイズの制御

#### 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) Norihisa Ichinohe, Junko Kon, Kazunori Sasaki, Yukio Nakamura, Hidekazu Ooe, Naoki Tanimizu, and Toshihiro Mitaka: Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem cells, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant.* 21, 11-22. 2012. 査読有

DOI: 10.3727/096368911X580626

(2) Hidekazu Ooe, Qijie Chen, Junko Kon, Kazunori Sasaki, Hiroyuki Miyoshi, Norihisa Ichinohe, Naoki Tanimizu, Toshihiro Mitaka: Proliferation of Rat Small Hepatocytes Requires Follistatin Expression. *J Cell Physiol.* 227, 6, 2363-2370, 2012 査読有

DOI: 10.1002/jcp.22971.

(3) Minoru Tanaka, Tohru Ito, Naoki Tanimizu, and Atsushi Miyajima Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory

mechanisms. J. Biochem. 149, 231-239.  
査読有 2011. doi: 10.1093/jb/mvr001

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 谷水 直樹、三高 俊広  
“Differentiation potential of  
cholangiocytes” Liver Down Under 平成  
23年11月29日、オーストラリア パー  
ス

(2) 谷水 直樹、千賀 一徳、三高 俊広、  
宮島 篤「転写因子 Grhl2 は上皮バリア機能  
および上皮細胞の形態形成を制御する」第8  
4回日本生化学会大会、平成23年9月22  
日、京都国際会議場

(3) 谷水 直樹、三高 俊広「発生過程に  
おける胆管上皮細胞の分化能の変化」第44  
回北海道病理談話会、平成23年9月10日、  
旭川市国際会議場

(4) 千賀一徳、谷水 直樹、三高 俊広、  
宮島 篤「胆管上皮細胞に特異的な転写因子  
Grhl2 の機能解析」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

(5) 谷水 直樹、三高 俊広「胆管上皮細胞  
の肝細胞分化能の検討」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

(6) 谷水 直樹、三高 俊広「胆管上皮細胞  
の分化能の検討」第10回再生医療学会、  
平成23年3月2日、新宿京王プラザ

(7) 谷水 直樹、宮島 篤、三高 俊広  
“Role of laminins in bile duct  
morphogenesis” Keystone Symposia 平成  
23年1月23日、カナダ バンクーバー

(8) 谷水 直樹、宮島 篤、三高 俊広「上  
皮細胞による組織形成を制御する因子につ  
いての研究」第32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、神戸国際会議場

(9) 谷水 直樹、三高 俊広 「肝臓の胆  
管上皮細胞の分化や胆管構造形成を制御す  
る因子についての研究」第43回北海道病理  
談話会、平成22年10月30日、北海道大  
学医学部学友会館フラテ

(10) 谷水 直樹、千賀 一徳、宮島 篤、  
三高 俊広 「胆管の構造形成を制御する因  
子についての研究」第17回肝細胞研究会、

平成22年6月18日、秋田アトリオン  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷水 直樹 (Naoki Tanimizu)

札幌医科大学医学部・講師

研究者番号：00333386