

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670187

研究課題名(和文) 肝臓の再生および発癌に寄与する肝幹/前駆細胞の実体の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of liver stem/progenitor cell in liver regeneration and carcinogenesis

研究代表者

田中 稔 (TANAKA, Minoru)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：80321909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な肝障害時に出現するオーバル細胞は旺盛な増殖能と未分化性を有し、肝細胞と胆管上皮細胞へ二方向性に分化することで肝再生に寄与する幹/前駆細胞(LPC)と考えられてきた。しかし、実際にオーバル細胞がどの程度、肝再生に寄与しているのかは不明であった。そこで、オーバル細胞特異的マーカー分子であるTROP2に遺伝子改変を加えたマウスを作製し、肝障害後に出現するオーバル細胞の標識を行なった。その結果、DDC薬剤による肝障害後の再生過程では、オーバル細胞はほとんど肝細胞を供給していないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hepatic oval cell is observed in chronic liver injury models of rodents and considered as liver stem/progenitor cell, which is capable of differentiating into biliary epithelial cells and hepatocytes. However, the contribution of hepatic oval cell to liver regeneration remains unclear. Because we have previously reported that Trop2 is a specific marker gene for mouse hepatic oval cells, we generated a genetically engineered mouse in which the Cre-recombinase was knocked in to the Trop2 locus for lineage-tracing analysis. As a result, most of hepatic oval cells formed pseudo-biliary ducts and rarely produced hepatocytes in the DDC-injured liver, indicating that hepatic oval cells don't mainly contribute to the supply of hepatocytes at least in this liver injury model.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 再生 肝細胞 胆管上皮細胞 前駆細胞 肝障害

1. 研究開始当初の背景

肝臓は再生能の高い臓器として知られる。重篤な肝障害時に出現するオーバル細胞は旺盛な増殖能と未分化性を有し、肝細胞と胆管上皮細胞へ二方向性に分化することで肝再生に寄与する幹/前駆細胞 (Liver stem/progenitor cell: LPC) と考えられてきた。オーバル細胞は胆管様の構造を取りながら増殖することから、その出現は偽胆管増生とも呼ばれる。マウスではオーバル細胞が誘導される肝障害モデルとして、ヒトポルフィリン症モデルでもある DDC 肝障害と非アルコール性脂肪性肝炎モデルでもある CDE 肝障害モデルが知られる。一方、ヒト肝硬変や肝癌においても同様の細胞が出現することから、LPC と肝発癌や癌幹細胞との関連が指摘されてきた。しかし、これまでの LPC に関する研究の多くは組織学的な解析によるものであり、LPC の肝再生や肝発癌における役割や因果関係は明らかとなっていなかった。これまでに、研究代表者は DDC 混餌食による肝障害モデルマウスから、オーバル細胞を規定するマーカー分子として TROP2 と EpCAM を同定した。EpCAM は正常肝臓では胆管上皮細胞に発現するが、TROP2 はほとんど発現していないことから、オーバル細胞の実体を解明するためには、TROP2 を指標とした解析が有効であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オーバル細胞マーカー分子である TROP2 と EpCAM を利用することで、様々な肝障害後の再生や発癌における LPC の役割を明らかにすることである。本研究により、オーバル細胞に関するこれまでのパラダイムに一定の見解を示す。

3. 研究の方法

(1) DDC と CDE による肝障害モデルにおける TROP2 の発現解析。

TROP2 は DDC 投与による障害肝で出現するオーバル細胞で強く発現することは既に報告したが、他の障害肝で出現するオーバル細胞については不明であった。そこでまず、DDC と CDE の肝障害間で、TROP2 の発現の違いの有無を遺伝子発現解析、免疫組織染色およびフローサイトメトリー解析により比較する。

(2) TROP2-Cre ノックインマウスの作製。

肝障害後のオーバル細胞の分化系譜を追跡するために、Trop2 の遺伝子座に Cre recombinase をノックインした Trop2-Cre マウスを作製する。このマウスと Rosa26 レポーターマウスとを交配することで得られる F1 マウス (Trop2-Cre; R26-LacZ) について X-gal 染色を行ない、Cre の発現が TROP2 の発現様式を反映しているかどうかを確認する。

(3) TROP2-Cre ノックインマウスを利用した肝障害後の細胞系譜追跡解析。

TROP2 は正常肝臓にはほとんど発現しておら

ず、DDC 投与による肝障害時にオーバル細胞で誘導されてくることから、肝障害を受けた Trop2-Cre; R26-LacZ マウスではオーバル細胞がレポーター遺伝子を発現し続けることになる。そこで、DDC 障害後にマークされたオーバル細胞がその後、どのような細胞へと分化したのかについて解析する。そのために、肝細胞分化マーカーとして HNF4 を、胆管上皮細胞分化マーカーとして CK19 を設定し、抗ガラクトシダーゼ (LacZ) 抗体と共染色する。

4. 研究成果

(1) DDC 障害肝と CDE 障害肝における TROP2 の発現解析。

まず、正常肝臓、DDC 障害肝臓、CDE 障害肝臓からそれぞれ分離した EpCAM 陽性細胞における Trop2 の発現を調べた結果、DDC 障害肝に比べ、CDE 障害肝での Trop2 の発現は低かった (図 1a)。そこで、各肝臓から切片を作製し、抗 EpCAM 抗体と抗 TROP2 抗体による二重染色を行なった (図 1b-d)。その結果、DDC 障害肝で出現するオーバル細胞はほぼ総てが二重陽性になったのに対し、CDE 障害肝のオーバル細胞では門脈域に一部二重陽性細胞が見られたものの (図 1d, 矢印)、周辺部の EpCAM 陽性細胞では TROP2 の発現が見られなかった。また、このような EpCAM 陽性細胞中の TROP2 の発現の違いはフローサイトメトリー解析によっても確かめられた。以上の結果から、オーバル細胞における TROP2 の発現様式は異なる肝障害モデル間で違いがあることが明らかとなった。

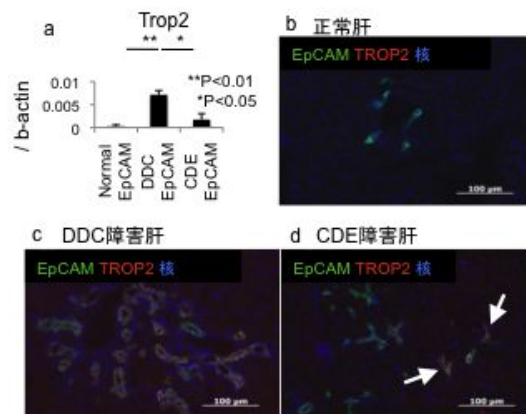


図1. 異なる肝障害モデルにおけるTROP2の発現様式の違い (a) Realtime RT-PCRによるTrop2の発現解析。正常肝、DDC 障害肝、CDE障害肝よりそれぞれEpCAM陽性細胞をセルソーターで分離し、TROP2の発現を調べた。(b,c,d) 免疫組織化学的染色による各障害肝におけるTROP2 とEpCAMの発現解析。矢印:共陽性細胞

(2) TROP2-Cre ノックインマウスの作製。

まず、本研究を遂行する上で必須となる Trop2-Cre ノックインマウスの作製を行なった。得られたマウスが実際に TROP2 の発現制御下に Cre 遺伝子を発現するか否かを確認するために、R26-LacZ マウスと交配を行ない、F1 マウス (Trop2-Cre; R26-LacZ) の X-gal 染

色を行なった。正常マウスにおいて TROP2 は肝臓では発現しないが、皮膚で発現していることが分かっていたため、まず、皮膚のサンプルを採取し、X-gal 染色を行なった。その結果、コントロールマウスでは全く染色されなかったのに対し、Trop2-Cre;R26-LacZ マウスでは表皮の細胞が青く染色された(図2)。このことから、Trop2-Cre ノックインマウスは TROP2 を発現する細胞で適正に Cre 遺伝子を発現するマウスであることが確認できた。次に、正常肝臓についても X-gal 染色を行なった。その結果、正常肝臓では青色の染色はほとんど認められなかった(図2)。

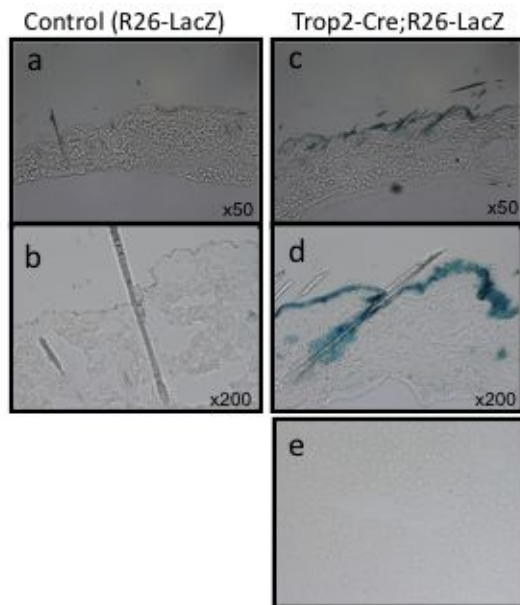


図2 Trop2-Cre;R26-LacZマウスにおけるX-gal染色 (a,b,c,d). コントロール(a,b)では青く染色された細胞が見られないのに対し、Trop2-Cre;R26-LacZ(c,d)では表皮の細胞が青く染色された。(e) Trop2-Cre;R26-LacZの肝臓では明瞭なシグナルは認められなかった。

(3) Trop2-Cre ノックインマウスによる肝障害後の細胞系譜追跡実験。

TROP2 は DDC 投与による肝障害時に出現するオーバル細胞で強く発現することから、Trop2-Cre;R26-LacZ マウスに DDC を 3 週間投与してオーバル細胞をラベルした。その後、2 週間通常食に戻した後にオーバル細胞がどのような細胞に分化したかを追跡した。オーバル細胞の運命を辿った細胞を β -gal 抗体で、肝細胞の細胞系譜を HNF4a で、胆管上皮細胞の系譜を CK9 でそれぞれ単染色または二重染色を行なった。その結果、Trop2-Cre でマークされた細胞(β -gal 陽性細胞)が偽胆管様に観察された。共染色の結果から、 β -gal 陽性細胞のほとんどが胆管上皮細胞マーカー分子である CK19 陽性細胞であり、HNF4a 陽性の肝細胞はほとんど認められなかった。以上の結果から、少なくとも DDC 投与による肝障害モデルでは、オーバル細胞による肝細胞への分化はほとんど起こっていないことが明確に示された。

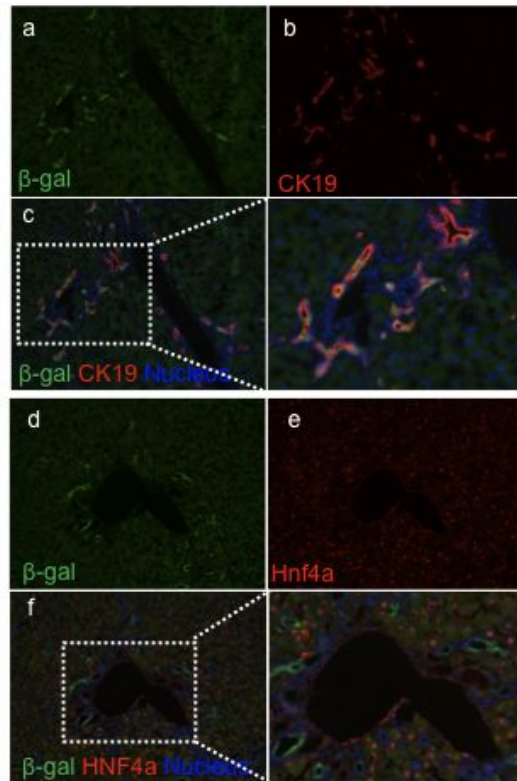


図3. Trop2-Cre;R26-LacZを用いた細胞系譜追跡解析 DDC混餌食を3週間投与した後、2週間通常食で飼育したマウスより肝切片を作製し、免疫組織化学的染色を行なった。(a-c) 抗 β -gal, 抗CK19による単染色および共染色像を示す。(d-f) 抗 β -gal, 抗HNF4aによる単染色および共染色像を示す。

これまでのオーバル細胞を対象とした細胞系譜追跡解析では、胆管上皮細胞で発現する分子のプロモーターを利用したレポーターマウスを用いたものがほとんどであり、オーバル細胞特異的な解析がなされていなかった。本研究では、オーバル細胞特異的マーカー分子である Trop2 の Cre ノックインマウスを作製し、DDC 肝障害後の再生におけるオーバル細胞の役割を明確に示すことに成功した。しかし、DDC 肝障害は主に胆道が障害を受ける系であることから、肝細胞が障害を受ける CDE 障害やその他の肝障害においてもこのマウスを用いて肝再生への寄与を検証する必要がある。また、Trop2 は前立腺の幹細胞にも発現することが報告されたことから、本研究で作製された Trop2-Cre ノックインマウスはその他の幹細胞研究にも有用であると考えられる。

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 8 件)

1. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Miyajima A, *Tanaka M, *Itoh T. *Cell Stem Cell* 14:561-74 (2014) DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.010. 査読無し

2. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by modulating adipogenesis and osteogenesis. Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A, *Tanaka M. *PLoS One* 9:e116209 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0116209. 査読有り
3. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. Yagai T, Miyajima A, *Tanaka M. *Am J Pathol.* 184: 2250-9 (2014) DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.04.018. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 田中稔. 細胞死から見た肝臓の再生と線維化の制御機構の解明. 新学術領域「ダイニングコード」キックオフシンポジウム, 東京大学 山上会館(東京), 11月13日, 2014.(口頭発表)
2. 田中稔. 細胞死から見た肝臓の再生と線維化のメカニズム. 第23回日本Cell Death学会, 東京医科歯科大学(東京), 7月18,19日, 2014.(口頭発表)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://ncgm-regenerative-medicine.org/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 稔 (TANAKA, Minoru)

国立国際医療研究センター研究所・細胞組織再生医学研究部・細胞療法開発研究室・室長

研究者番号: 80321909

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: