

東海大学大学院平成28年度博士論文

胎生期肝前駆細胞の胆管様細胞への
分化メカニズムの解明

指導 峯 徹哉教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

安齋 和也

・この学位申請論文は、**Scientific Reports** に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・**Scientific Reports** に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

1. 総括

肝臓は実質細胞である肝細胞と、胆管上皮細胞や星細胞やクッパー細胞をはじめとした非実質細胞とから構成される。肝細胞と胆管上皮細胞は肝前駆細胞 (**Liver progenitor cells : LPCs**) を共通の起源として持ち、**LPCs** を肝臓を構成する機能的細胞に分化制御させ、肝疾患に対する再生医療へと応用する系が期待されている。成体のヒト・マウスの肝臓にも **LPCs** が存在しており、3次元培養によって胆管様特徴を持つシストを形成する一方で、マウス胎生期由来の **LPCs** を同様の条件で培養しても胆管様シストを形成しない。つまり、胎生期 **LPCs** は肝発生・成熟過程において胆管系への分化能を獲得していると考えられる。

マウス胎生中期肝臓では **CD45⁺Ter119⁺Dlk1⁺**細胞が **LPCs** として同定されている。この胎生期 **LPCs** を直接3次元培養すると、肝細胞マーカーである **ALBUMIN(ALB)**が陽性で胆管細胞マーカー **CK19**が陰性のシスト構造を形成する。この胎生期 **LPCs** をゼラチンコートされた平面培養皿にて前培養を行い、その後に3次元培養に供すると逆に **ALB⁺CK19⁺**の胆管様シスト構造を形成することが分かった。一方で肝細胞系への誘導因子である **Hepatocyte Growth Factor** やオンコスタチン **M** を前培養中に添加すると胆管様シスト

形成を認めなかった。これらの結果は、ゼラチンコート平面培養皿での前培養が、胎生期 LPCs を胆管系の前駆細胞へ変化させることを示している。さらに、出生直後の新生児期 LPCs は前培養なしで 3 次元ゲル培養にて胆管系シストを形成することが可能であった。つまり、*in vivo* の胎児後期にみられる LPCs の成熟過程は、*in vitro* での前培養で代替が可能であることが示唆された。

2. 研究の背景

肝臓は体内で最も大きな臓器であり、代謝において重要な役割を担う。肝臓は、その主たる機能である代謝・解毒・胆汁の合成などを担う実質細胞である肝細胞[1][2]と、細胞間相互作用にて肝細胞の機能制御を担う胆管上皮細胞や星細胞、細胆管上皮細胞やクッパー細胞などの非実質細胞から構成される[3]。これらの細胞のうち肝細胞と胆管上皮細胞は、胎生期肝臓に存在する高増殖能を持つ肝幹・前駆細胞から分化する。肝臓は生体の恒常性維持のため、多様な機能をはたしており、その機能を工学的に再現することは困難である。そこで、*in vitro* にて作成された高増殖性を持つ肝幹・前駆細胞が再生医療の重要なソースとして期待されている。

マウスの胎仔発生過程では、前腸内胚葉の細胞が近位内胚葉と横中隔に由来する液性因子の刺激によって肝芽を形成することで肝発生が開始される。その後、肝芽は横中隔に移動し肝臓原基を形成する[4][5]。肝芽内部には肝芽細胞と呼ばれる胎生期 LPCs が存在し、胎児肝発生の中期から後期にかけてこれらが増殖・分化することで、成熟肝細胞・成熟胆管上皮細胞が形成される。

胆管発生過程では、まず胎生期 LPCs が胆管特異的な表面抗原タンパク質の発現上昇とともに一層の上皮細胞シートを形成する。これは ductal plates の第一層として知られている。その後、近接した ductal plates 内の LPCs が胆管系細胞へと分化し次の ductal plate を形成する。その後、胎生後期にこれらの ductal layer の細胞が分化し肝内胆管を形成する。門脈周囲の間葉細胞から分泌される数種類の液性因子または膜タンパク質がこの胆管分化過程に必要と言われている[6][7]。Transforming growth factor- β (TGF- β)の門脈周囲域における濃度勾配は Hepatocyte Nuclear Factor-1 β (Hnf1 β) や Hnf6 などの胆管上皮細胞特有の転写因子の発現誘導を介して、胎生期 LPCs を胆管前駆細胞に分化誘導する[8]。また、Jagged-1 は胆管形成に不可欠な遺伝子として知られ、ヒト遺伝病である Alagille 症候群にも関連している[9][10]。胎生期 LPCs は Notch を発現しており、Notch リガンドである Jagged-1 の間葉系細胞での欠失は、周産期の肝成熟段階での ductal plate の形成不全を引き起こす[11]。このように、細胞同士または細胞外の可溶性因子の相互作用は胎生期 LPCs を胆管上皮細胞に誘導する過程で非常に重要である。

Dlk1 や CD133、CD13、EpCAM (CD326) などの表面抗原タンパク質が、胎生期 LPCs の特異的マーカーとして知られている。例えば、マウス胎生 13 日の胎児肝細胞より純化された Dlk1 陽性細胞は、高い増殖性を持つとともに、分化誘導することで成熟肝細胞様細胞の機能を持つ[12]。また近年、成体の成熟肝臓から得られた Lgr5 陽性細胞または EpCAM 陽性細胞は、*in vitro* において細胞外マトリックスを用いた 3 次元細胞培養を行うことで、遺伝的安定性

を保持しつつ長期間の継代が可能な胆管系特徴を有するシスト構造を形成すること可能なことが報告されている[13][14]。このことは、出生後の肝臓は胎生期 LPCs より分化したより胆管系に近い前駆細胞を保持すると考えられる。一方、我々の検証では同様の条件で胎生中期肝臓由来の Dlk1 陽性 LPCs を培養したが、胆管様特徴を持つシストを形成しなかった。これらことから、胎生期 LPCs は出生後の前駆細胞と異なる特徴を持っており、胎生期 LPCs を胆管系の前駆細胞に分化させる重要な変化が、肝発生段階で起こっていることが示唆される。本研究では、Dlk1 陽性の胎生期 LPCs をゼラチンコート平面培養皿にて一時的に前培養することで、シスト形成能を持つ胆管前駆細胞へと変化することを見出した。また、形成されたシストは *in vitro* で 9 カ月以上も継代培養が可能で、免疫染色にて *ALB*⁺*CK19*⁺ の胆管様特徴を有していた。これらの結果は胎生期 LPCs が胆管系細胞に分化するためには何らかの時間的・内因的な変化が必要であることを示唆している。

5. 考察と展望

胎生期 LPCs は高い増殖能と肝細胞系と胆管系への二方向性分化能を持つ。胎仔発生過程では、門脈近傍の胎生期 LPCs が肝発生中期以降に胆管系分化能を発現し成熟胆管を形成するようになる。この成熟過程にはいくつかの細胞外のシグナル伝達経路が重要であることが知られているが、胎生期 LPCs を胆管前駆細胞に分化させる内因性的変化はほとんど解明されていない。本研究において、我々は胎生期 LPCs を 7 日間ゼラチンコート培養皿にて培養することで、胆管前駆細胞への変化を誘導できることを見出した。胆管発生は肝芽細胞と門脈近傍の Jagged-1 を発現する線維芽細胞の細胞間相互作用による Notch シグナルの活性化によって始まる[24]。また、血管内皮細胞や線維芽細胞から分泌される TGF β の刺激により肝芽細胞は胆管上皮細胞へ成熟する[8]。これらのサイトカインは、ductal plate と呼ばれる 1 層の胆管上皮の形成に寄与[6]することから、細胞外シグナル伝達が胎生期 LPCs の胆管系への分化に必須であると思われる。我々は胎生 13 日胎生期 LPCs が 2D 前培養なしでは *in vitro* 胆管構造形成能を保持しない一方で、CD133⁺新生児 LPCs が primary cell の状態で胆管系構造を形成できることを見出した。また、*in vitro* においてコロニー形成アッセイを行うと、E13 肝臓由来 CD133⁺ cultured cells と CD133⁺新生児 LPCs は *ALB*⁺*CK19*⁺を呈する胆管系コロニーを形成する一方で、*ALB* 陽性の肝細胞系コロニーをほとんど認めなかった。このことは、7 日間の 2D 前培養が胎生期 LPCs を新生児期 LPCs と同様の胆管前駆細胞に変化させたことを示唆している。つまり今回確立した培養系は、胎生期 LPCs が胆管系前駆細胞へ分化する過程での内因性変化の解

析に有用と考えられる。

HGF や OSM を添加しない状態での 2D 前培養では、得られた CD133⁺CD326⁺細胞は 3D ゲル培養にて胆管系シストを形成することができた。一方で HGF や OSM を添加して得られた cultured cells では CD133 の発現は著しく抑制され、また胆管系シスト構造の形成能が低下していた。CD133 の発現は胆管前駆細胞のシスト形成能力と密接に関連している可能性があり、実際に CD133 陰性細胞ではほとんど胆管系シスト構造の形成能が見られなかった。HGF や OSM は胎生期 LPCs における肝成熟因子として知られており [21][25]、HGF や OSM の胆管発生に対する効果を解明することは、さらなる肝芽細胞における運命決定の制御に対する理解につながると思われる。

3D ゲル培養において、EGF や R-spondin 1、さらに TGF β シグナル阻害剤である A-8301 が胆管様シスト形成に必要であった。特に Lgr5 は消化管・胃そして肝臓の幹・前駆細胞におけるマーカーであり [26]、Lgr ファミリーのリガンドである R-spondin 1 は消化管や結腸、膵臓などの臓器由来のオルガノイドの形成に重要であることも知られている [27][28]。本研究では Lgr レセプターファミリーによる Wnt シグナル伝達の制御がシスト構造の形成に重要な因子であることを見出した。さらに本研究では、ERK、p38、MAPK、PI3K 経路の活性が *in vitro* における胆管系シストの形成には重要であることが分かった。このことは *in vivo* における胆管形成にもこれらのシグナル経路が重要であることを示唆している。胎生期 LPCs に由来する門脈近傍の ductal plates は成熟胆管網を形成し、門脈周囲の線維芽細胞は細胞外因子を発現することで胆管上皮細胞

の成熟に重要な役割を果たす。この過程で、門脈周囲の間質細胞に由来する TGF β は胆管形成の初期段階として重要であるが、本研究では A-8301 による TGF β レセプターの阻害が胆管様シスト構造の形成・増殖に必須であった。つまり胆管形成過程では細胞シグナル伝達機構の活性化が複雑に制御されていると考えられる。これらの細胞外分子メカニズムの解明は *in vitro* における胆管上皮細胞機能誘導の解明に有用である。

Alagille 症候群や多発肝嚢胞、そして肝内胆管癌などの悪性腫瘍は胆管関連の疾患であり、適切な疾患モデルが治療効果や副作用の評価に必要である。本研究において、E13 LPCs が *in vitro* において胆管分化するためには 2D 前培養が必要であることを示した。2D 前培養の間、胆管関連遺伝子である *Ck19*、*Hnf1 β* 、*Hnf6* が誘導されていたが、これらの遺伝子を制御する転写メカニズムは未だ不明である。近年、*Sall4* や *Grhl2* などの転写制御因子が胎生期 LPCs の運命決定に関連しているとの報告がある[29][30]。今後の研究として、我々の培養系を用いて胎生期 LPCs を胆管前駆細胞に変化させるキーファクターを発見することは、*in vitro* における胆管系への分化効率をさらに向上させ、胆管関連の疾患モデルの構築に役立つことと思われる。

6. 結論

マウス胎生期肝前駆細胞をゼラチンコート平面培養皿にて7日間培養することで、増殖能を保持した胆管系シストに分化できる胆管前駆細胞が誘導できた。しかし、肝成熟因子である HGF や OSM の影響によりこの誘導が阻害されることが分かった。またこの胆管前駆細胞は *in vivo* で7日間成熟して得られる新生児 LPCs と同様の胆管系分化能を持つことから、*in vitro* での LPCs の成熟が *in vivo* での成熟を模倣していることが示唆された。本研究で見出した培養系を用いることで、胆管前駆細胞における成熟過程やシグナル伝達経路の解析に加え、胆管由来の疾患モデルの構築への寄与が期待される。