

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### 胆管系三次元組織構造の適応的リモデリング (Adaptive remodeling of the biliary architecture)

氏 名 金子 洸太

#### 【研究背景】

肝臓は薬物や代謝異常による障害に対し、高い再生能力により機能を素早く回復することが出来る。肝臓の上皮組織は、肝細胞および胆管上皮細胞からなる。肝細胞は肝組織の大半を占め、肝機能の大半を担う実質細胞である。肝臓が障害により一部の肝細胞を失った場合、その再生過程として、残存した成熟肝細胞の増殖や肥大以外に、胆管増生という現象が知られる。胆管増生は、胆管上皮マーカー陽性の細胞が異常に増生する現象で、ヒトの病態やマウスモデルでの重篤な障害肝において認められる (Figure 1)。これらの細胞は Liver progenitor cell (LPC) とよばれ、肝幹／前駆細胞を含み、肝細胞に分化することで肝再生に寄与すると考えられている。また、胆管増生が誘導されない各種の遺伝子改変マウスモデルでは障害が重篤化することから、胆管増生は、肝障害からの再生に重要であると考えられる。しかしながら、その実体に関しては不明な点が多い。特に、LPC は胆管と同じマーカーを発現し、胆管周囲から出現するが、その出現様式や、胆管との関係などは未解明であった。

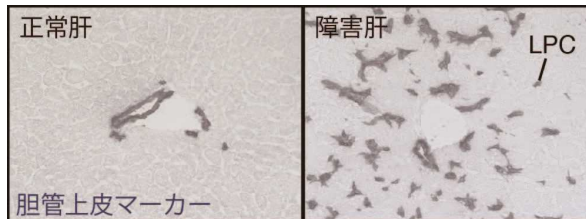


Figure 1 組織切片において観察される胆管増生と LPC

#### 【本研究のアプローチ】

本研究では、マウスにおいて胆管を中心として肝臓の組織を三次元的に解析する手法を開発した。これにより、実質的に全ての LPC が、正常時から存在する胆管と接続された管状構造を形成していること

を初めて示した。すなわち、組織切片上で観察された LPC の出現・増幅といわれていた現象の実体は、胆管組織の構造変化であることが明らかとなった。このことから、成熟した成体において、肝臓は障害に応答して胆管の三次元的組織構造をリモデリングする能力を有すると考えられた。本研究では、肝障害時における胆管の動態について解析した。

## 【方法・結果】

### インクによる胆管樹状構造の可視化

従来の組織切片による観察では、胆管は胆管上皮細胞からなる管腔組織として観察され、門脈に隣接している (Figure 2A)。胆管は門脈とともに肝内に張り巡らされているため、門脈と同様の樹状構造をとっていると考えられている。しかしながら、従来の解析法では胆管の細かい枝を含めた詳細な構造をとらえることは出来ていなかった。そこで本研究では、マウスの胆管の三次元的な樹状構造を観察するための新規可視化法を開発した。

肝外の総胆管から逆行性にインクを注入することで肝内の胆管の樹状構造をインクで標識し、肝臓を摘出した後、組織中の水分を脂質やタンパク質に近い屈折率を持つ BABB に置き換えることで組織内の光の乱反射を軽減し、肝組織を視覚的に透明化した。この簡便な方法により、マウス成体の胆管の樹状構造を肝臓全体で可視化することに成功した (Figures 2B, 2C)。これにより、胆管の詳細な三次元的構造が初めて示された (Figure 2D)。正常肝において胆管には、門脈におよそ 1 : 1 で沿って走る太い管と、門脈周りを網状に取り囲んでいる細い管が存在することが明らかとなった。また、インクを胆管に注入した肝臓の組織切片において、胆管上皮細胞マーカー *cytokeratin 19* (CK19) に対して免疫染色を行なったところ、インクと CK19 の分布は完全に一致していた (Figure 2E)。このことは、インクの流路により観察される管の構造が、胆管上皮細胞からなる上皮管腔構造を反映していることを示している。

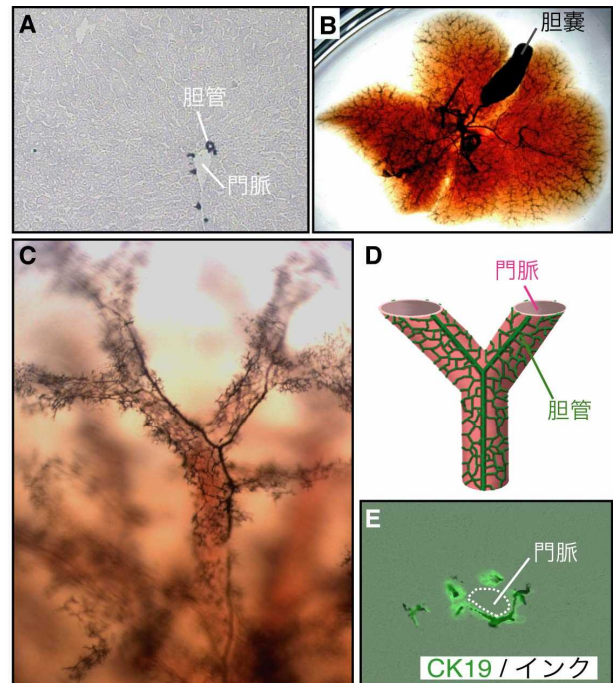


Figure 2 新規可視化法により明かされた胆管の三次元構造 (A) 切片における、胆管の免疫染色。(B) 肝臓の全体の胆管 (黒)。(C) 細部の高倍率の写真。(D) 観察された三次元構造のモデル図。(E) インクと CK19 が一致している。

### LPC の出現／拡散は胆管樹状構造のリモデリングを反映している

次に、インクの注入により、LPC と胆管との接続の有無を検討した (Figure 3A)。LPC を誘導する典型的な肝障害モデルである DDC (肝毒性を示す薬剤の一種) 食餌投与モデルにおいて、胆管へのインク注入後に組織切片を作製し CK19 に対する免疫染色を行なったところ、ほとんど全ての CK19 陽性細胞がインクにより標識されていた (Figure 3B)。このことは、これらの LPC が管腔を形成し、元から存在する胆管に接続された脈管構造を形成していることを示している。さらに、他の様々な慢性的肝障害モデルについても検討したところ、同様に、実質的に全ての LPC が元から存在する胆管に接続されていることが明らかとなった。

次に、インクによる新規可視化法を利用し、DDC 食餌投与モデルにおける胆管の樹状構造を三次元レベルで観察した。その結果、胆管の樹状構造が大きく変化しており、実質域へと枝を広げた構造をとっていることが明らかとなった (Figure 4)。さらに時系列を追って観察したところ、DDC 食餌投与により

障害を与え続けている間、LPC は常に胆管に接続されており、胆管の構造は連続的に変化していくことが明らかとなった。さらに、これらの観察を裏付けるため、200  $\mu\text{m}$  の厚みのある切片を用いて、免疫染色により胆管の樹状構造の一部を三次元的に解析する手法を確立し、胆管の枝から分離された CK19 陽性細胞が存在しないことを観察した。すなわち三次元的な免疫染色によっても、全ての LPC が、胆管から連続した構造物を形成していることが確認された。以上のことから、組織切片を用いた二次元的な組織学において観察され、定義されてきた LPC は、三次元的な観測では胆管の組織構造のリモデリングの結果として出現していることが示された。

これまでに、肝障害時に LPC の制御に重要であるシグナルがいくつか報告されている。なかでも、fibroblast growth factor 7 (FGF7) と tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) は、障害のない正常肝においても、強制発現すると LPC のような細胞群を誘導することが出来る。しかしながら、このとき FGF7 や TWEAK が胆管組織の三次元構造に与える影

響は不明であった。そこで、FGF7 や TWEAK を肝細胞への遺伝子導入により肝臓に強制発現させ、胆管組織に与える効果を解析した。強制発現の結果、どちらの因子もコントロールの LacZ 強制発現に比べ、CK19 陽性細胞を増殖させ、組織切片中の CK19 陽性領域の面積を増加させた (Figure 5A–5C)。次に、インクによる三次元的な観察を行なった結果、TWEAK を強制発現させた肝臓では、正常肝と比べても胆管の脈管構造に大きな変化は見られなかったのに対し、FGF7 を強制発現させた肝臓では胆管の枝の密度が高くなっており、枝が実質域へ浸潤していることが明らかとなった (Figures 5D, 5E)。FGF7 と TWEAK は、ともに CK19 陽性細胞の増殖を誘導するが、前者にのみ、胆管の分岐構造を変化させるという後者とは異なる作用があると考えられる。

#### 異なる種類の肝障害に応じた、胆管の多様な構造変化

肝臓は、生体内での代謝や解毒作用を担う中心器官であり、様々な種類の薬物や代謝異常により、多様な障害を受ける。そこで、LPC が誘導される様々な障害モデルにおいて胆管樹状構造の動態を比較したところ、異なる障害モデルでは、胆管の構造変化の形態が大きく異なることを見出した (Figure 6)。興味深いことに、これらの構造はそれぞれの障害パターンに適応した形態を示していると考えられた。ここで用いた障害モデルは、単純化すると大きく 2 パターンに分けることが出来る。門脈周囲に障害が引き起こされるモデルである DDC モデルや CDE モデ

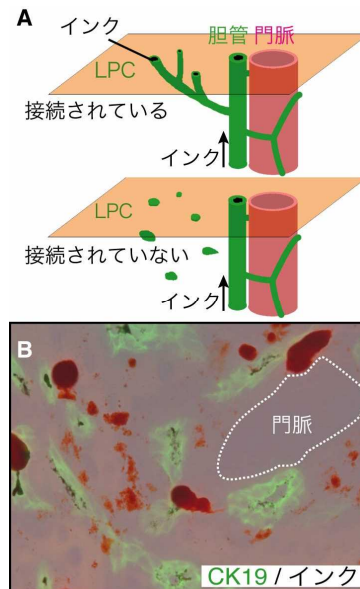


Figure 3 LPC の胆管への接続  
(A) インクの注入による、LPC の胆管への接続の検討。インクを肝外の総胆管から逆行性に注入すると、インクは肝内に張り巡らされた胆管樹状構造の中に入っていく。LPC がもし、この胆管の樹状構造に接続されていれば、インクは LPC とともに観察される (上段)。LPC が胆管に接続されていなかった場合、インクは LPC とともに観察されない (下段)。(B) DDC モデル障害肝。インク (黒) が LPC とともに観察される。赤は DDC により蓄積するポルフィリン。

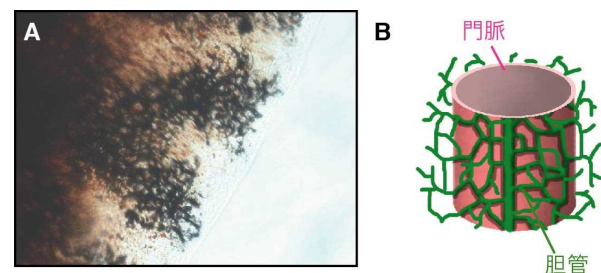


Figure 4 障害肝における胆管のリモデリング  
(A) インク (黒) により可視化された DDC モデル障害肝の胆管の三次元構造。(B) DDC モデル障害肝において変化した胆管の三次元構造の模式図。胆管の枝が門脈から実質域へ広がっている。

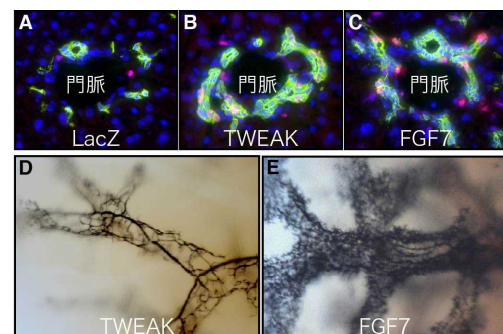


Figure 5 TWEAK と FGF7 が胆管の構造変化に与える効果  
(A–C) LacZ (A, コントロール)、TWEAK (B)、または FGF7 (C) を HTVi 法により強制発現させた肝臓の切片。CK19 (緑) および細胞増殖マーカー Ki67 (赤) に対する免疫染色。青は核染色。(D, E) TWEAK (F)、または FGF7 (G) を HTVi 法により強制発現させた肝臓において、インク (黒) により可視化された胆管の三次元構造。



ルでは、胆管の枝は門脈周囲で著しく分岐することが観察された (Figures 6A, 6B, 6E)。一方、障害部位が門脈から遠い中心静脈周囲に限定される四塩化炭素 ( $\text{CCl}_4$ ) モデルや TAA モデルでは、胆管の枝は比較的直線的に障害部位の方へと伸びた構造を示していた (Figures 6C, 6D, 6F)。そこで、組織切片における LPC の分布に着目し、胆管上皮マーカー陽性細胞集団の門脈-中心静脈間の分布を定量したところ、TAA モデルでは、CDE モデルに比べ、分布が中心静脈側まで伸張しており、後者は門脈周囲で密度が高くなっていることが確認された。すなわち、胆管の枝は、障害部位における密度が高くなる分布をとっていると考えられる。さらに、肝障害時に構造変化した胆管の枝の三次元的な方向性を解析するため、200  $\mu\text{m}$  の組織片の免疫染色による部分的な三次元画像構築を用いて定量解析を行なったところ、TAA モデルでは強い方向性を示し、CDE モデルではほぼランダムな向きに拡散していることが明らかとなった。組織切片における LPC の分布の解析と合わせ、これらの結果は、リモデリングにより生じた胆管の枝の方向性が、障害のパターンに応じて顕著に変化することを示している (Figures 6E, 6F)。

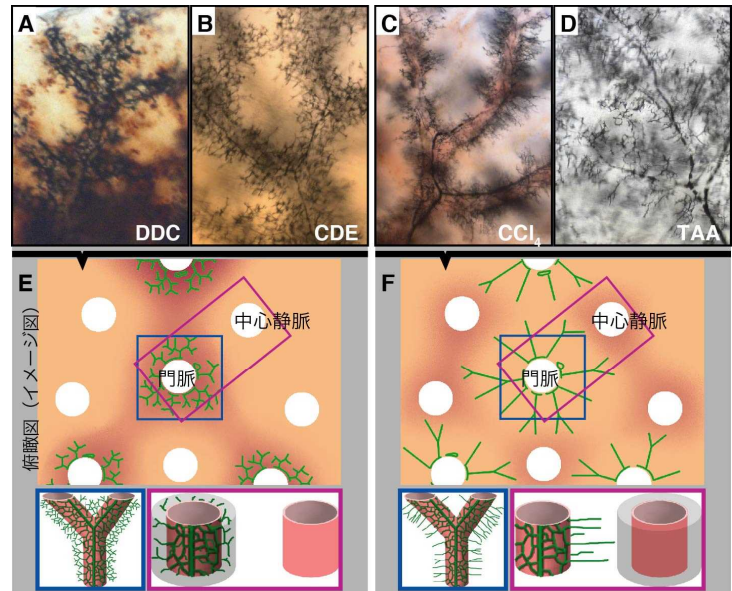


Figure 6 異なる肝障害に応じた胆管の構造変化  
(A-D) DDC モデル (A)/CDE モデル (B)/ $\text{CCl}_4$  モデル (C)/TAA モデル (D)  
障害肝において、インク (黒) により可視化された胆管の三次元構造。(B, D, F, H) は高倍率の写真。(E, F) 障害パターンと胆管の構造のモデル図。

#### 【考察・今後の展望】

障害の種類に応じた胆管のリモデリングは、肝臓の適応的応答と考えられ、いくつかの生理的意義が考えられる。胆管の主要な役割は胆汁の排出であるため、胆汁鬱滞を伴うような肝障害では、増生した胆管は実質域からの胆汁の排出を促している可能性がある。また、胆汁は界面活性剤であるため、疎水性の薬物や、障害時に生じる老廃物を排出し、組織への更なるダメージを軽減している可能性も考えられる。さらに、これまで LPC や胆管は、肝前駆細胞を含むといわれてきた。本研究では、障害部位付近において、LPC の一部が肝細胞に分化することも観測した。肝臓は障害に応じて、肝前駆細胞のソースあるいはニッチとして胆管の構造を変化させることで、障害部位付近における効率的な肝前駆細胞による再生を促しているというモデルが考えられる (Figure 7)。

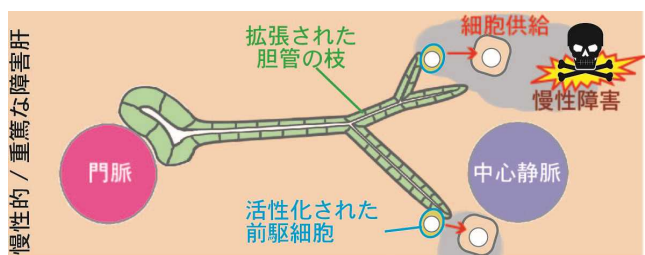


Figure 7 胆管の構造変化による障害部位付近での前駆細胞様細胞からの細胞供給

本研究により、肝臓は障害に応じて胆管の構造を顕著に変化させることが明らかとなった。胆管は典型的な上皮管腔組織であるが、このような組織が発生だけでなく成体においても、環境に応じて顕著な形態変化を起こすといったことは、他に例がない。乳腺は成体においても、ホルモンにより成長が促されるが、これは時期も限定されており形態も決まっていると思われる。胆管組織は、上皮組織としては特殊な可塑性を有しており、このような組織構造の可塑性が、多様なストレス環境に対する肝臓の強い再生能力の基盤となっていると考えられる。今後、胆管のリモデリング機構を解明することで、障害の多様性に対する組織の恒常性維持機構の理解が進展することが期待される。