

論文の内容の要旨

論文題目 胎仔肝幹・前駆細胞の増殖・分化機構の解析

(Analyses of the mechanisms regulating proliferation and differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells)

氏名 伊藤慶一

【研究の背景と目的】

肝臓は成体の恒常性維持を担う重要な臓器であり、脂質・アルコール・薬物などの代謝機能を持つ。肝機能を担う中心的細胞が肝細胞(成熟肝細胞)である。難治性肝疾患患者への移植、創薬時の肝毒性試験や薬物動態の評価、肝炎ウイルスの感染実験等、再生医療や創薬の分野において、機能的なヒト肝細胞が必要とされている。肝臓は高い再生能力を持つ臓器として知られているが、肝細胞の試験管内増幅は困難であり、また培養によって急速にその機能を失う。従って、生体外で肝細胞の機能を維持しつつ増幅させる系の確立が必要とされる。

肝幹・前駆細胞は、高い増殖能と、成熟肝細胞と胆管細胞への分化能を併せ持つ細胞である。胎仔期に存在する肝幹・前駆細胞は前腸内胚葉に由来し、心臓原基や横中隔膜からのシグナルによって誘導され、増殖しつつ肝細胞および胆管上皮細胞へと分化する。このような、肝組織に存在する肝幹・前駆細胞を試験管内で効率的に増幅し、必要に応じて成熟肝細胞へ誘導することで、再生医療や創薬に資する機能的肝細胞を大量に得ることが可能になると考えられる。しかし、現在では肝幹・前駆細胞の自己複製制御機構については未解明であり、その未分化性や高増殖能を長期間にわたり培養系で維持することは困難である。

幹細胞の自己複製を制御する分子メカニズムとして、外部因子(サイトカイン・増殖因子および細胞接着因子)および、それにより制御される内因性の転写因子ネットワークがある。ES細胞においては、LIFや

BMP4といった液性因子によりJAK-STATやSmadシグナル伝達経路が活性化され、Oct3/4やSox2といった多能性を規定する転写因子ネットワークを制御する。また分化シグナルであるFGF受容体がES細胞培養系では恒常的に活性化されており、阻害剤の添加によりFGFの下流シグナルを抑制することで、ES細胞の分化を抑制し自己複製能を向上できることが示されている。従って、組織幹細胞においても、自己複製および分化シグナルの両方を制御することで組織幹細胞の試験管内での機能維持・長期増殖が可能となると予想される。そこで本研究では、外因性シグナル(液性因子および細胞間相互作用)および内因性シグナル(転写因子等)の両方に注目し、胎生中期肝臓由来肝幹・前駆細胞の分化・増殖を制御するメカニズムの解析を細胞・分子レベルで行った。

① 肝発生過程における間葉系前駆細胞と肝幹・前駆細胞の相互作用

幹細胞の生体内での機能維持において、ニッチ構造に他の細胞との相互作用が重要なことが知られている。例えば、血液幹細胞では骨芽細胞や血管内皮細胞、シュワン細胞等により構成されたニッチ構造で増殖や分化が制御されている。発生過程では、腸管の一部が肝臓原基として分化した後に、横隔膜の間葉系組織へと侵入することで初期肝臓が形成される。

当研究室の先行研究により、肝発生初期の肝芽細胞(胎生肝幹・前駆細胞)を生体外での増幅に、マウス胎仔由来の間葉系細胞集団であるマウス胎仔線維芽細胞(MEF)との相互作用が必要なことを見出している。そこで生体内においても、胎仔肝臓に存在する横隔膜由来の間葉系細胞との相互作用が、肝芽細胞の機能維持に必要な可能性が考えられた。本研究では、外因性シグナルの供給源として胎仔肝臓内の間葉系細胞に着目し、その純化・性状解析を通じて肝幹・前駆細胞の増殖・分化機構の解明を行うことを目的とした。

【方法と結果】

(i) 胎生中期肝臓からの間葉系細胞の分離

これまでにマウス胎仔肝臓から間葉系細胞を分離するマーカーとして Thy1 (CD90)、p75NTR、ALCAM (CD166)などが報告されている。我々は、複数の膜表面抗原抗体とFACSを用いて、胎仔肝臓細胞における表面抗原の網羅的解析を行った。その結果、肝幹・前駆細胞マーカーである Dlk1 の弱陽性分画に、CD38, PDGFR α , ALCAM, p75NTR などが陽性の細胞集団が存在することを見出した。CD38, PDGFR α , ALCAM そして p75NTR はほぼ同一細胞で発現する一方で、Thy1 陽性細胞とはほとんどオーバーラップしないことがわかった。更に、この間葉系マーカーを発現する細胞は、Flk1, CD31 陽性の内皮細胞および PCLP1 陽性の中皮細胞とは異なる細胞集団であることを明らかとした。

Dlk1 弱陽性 PDGFR α 陽性細胞を FACS により純化し培養した結果、繊維芽細胞様の形態を持つ。また、胎仔肝臓の間葉系細胞特異的な転写因子である Hlx1, Lhx2 および Foxf1 を強く発現する細胞集団であることを明らかとし、Dlk1 および PDGFR α を用いることで、発生肝臓における間葉系細胞の純化が可能であることが示唆された。また、Dlk1 弱陽性 PDGFR α 陽性細胞を純化・培養した後に、適切な分化条件で誘導した結果、軟骨・脂肪・骨細胞系の 3 方向への多分化能を持つことがわかった。以上の結果か

ら、胎生肝臓に、Dlk1 弱陽性 PDGFR α 陽性の間葉系前駆細胞が存在することを示した。

(ii)胎生肝臓における間葉系細胞の局在

次に *in vivo* における間葉系細胞の分布を免疫染色を用いて解析した。PDGFR α 陽性の間葉系細胞は CK19 陽性の mesothelial 細胞 (肝臓の膜表面を構成する) の一層内側にあたる submesothelial 領域および肝実質画分に存在していた。また、PDGFR α 陽性細胞の一部は Albumin 陽性の肝芽細胞と近接して存在しており、*in vivo* における間葉系細胞と肝芽細胞との相互作用が示唆された。

(iii)*in vitro* 共培養系を用いた肝幹・前駆細胞への間葉系細胞の機能評価

胎生期における間葉系細胞の肝芽細胞の増殖及び分化に対する機能を解析するため、肝芽細胞と間葉系細胞を、FACSを用いて純化・共培養を行った。①Transwellを用いた肝芽細胞と間葉系細胞の間接共培養系により間葉系細胞由来の分泌因子の効果を検討した結果、間葉系細胞由来液性因子存在下では肝芽細胞の増殖能が亢進した。②間葉系細胞と肝芽細胞が直接相互作用できる共培養系では、間葉系細胞との相互作用により肝芽細胞の機能的肝細胞への分化を促進した。以上の結果から、胎生肝臓由来の間葉系幹細胞との液性因子または細胞間接着を介した相互作用が、肝芽細胞の増殖・分化を制御する可能性を示唆した。

② 肝幹・前駆細胞の増殖を制御する内因性シグナルの解析

幹細胞は特異的転写因子などの様々な核内因子を発現しており、そのネットワークによって未分化性や高増殖能を維持している。肝幹・前駆細胞においても、Bmi1 や Tbx3 といった核内因子の関与が報告されているが、肝幹・前駆細胞の増殖を制御する内因性シグナルの詳細は未だ明らかでない。そこで本研究では、肝幹・前駆細胞に高発現する核内分子を候補として、細胞の長期増殖を制御する因子の網羅的探索を行った。

【方法と結果】

(i) 肝幹・前駆細胞の長期増殖能に関与する核内分子の網羅的探索

肝幹・前駆細胞や成体肝細胞等のマイクロアレイによる網羅的発現解析の結果から、肝幹・前駆細胞に高発現する核内因子群を未分化性・高増殖性を制御する候補遺伝子として同定した。これらの遺伝子をレトロウイルスベクターにクローニングし、肝幹・前駆細胞に強制発現させた。FACS を用いて純化した胎生肝幹・前駆細胞をフィーダー細胞 (MEF) 上に低密度で播種し、レトロウイルス感染による遺伝子導入を行った。培養 7 日後に増殖した 1 次コロニーを酵素的に分散させた後に新しいフィーダー細胞上に継代し 2 次コロニーの形成を観察することで、肝幹・前駆細胞の長期増殖能を解析した。複数の遺伝子を導入しその効果をみたところ、Chromobox8 (Cbx8) の強制発現により肝幹・前駆細胞の長期増殖能が上昇した。

(ii) Cbx 因子の長期増殖能の制御機構

Cbx8 は Cbx family に属する遺伝子であり、polycomb 複合体の構成因子である。Cbx8 による肝幹・前駆細胞の長期増殖能維持機構が Cbx ファミリーに共通したものであるかを検討するために、ファミリー分子である Cbx2, 4, 6, 7, 8 を導入し、肝幹・前駆細胞の長期増殖能における効果を比較した。その結果、

Cbx7, 8 を強制発現することで肝芽細胞の長期増殖を有意に誘導できた。さらに遺伝子発現解析から Cbx7, 8 の強制発現によって、細胞周期を抑制するサイクリンインヒビター Cdkn2a の発現が低下することを確認した。

Cbx7,8 における肝幹・前駆細胞の長期増殖能が Cdkn2a の抑制に依存的であるかを検討するため、Cdkn2a 遺伝子欠損マウス由来の肝幹・前駆細胞へ Cbx family の遺伝子導入を行い、長期増殖能への影響を検討した。その結果、Cdkn2a^{+/+}マウス由来の肝幹・前駆細胞では Cbx7,8 を強制発現した時に継代後での高い増殖能が確認されたのに対し、Cdkn2a^{-/-}マウス由来の肝幹・前駆細胞では Cbx7,8 非依存的に長期増殖が可能であった。

【考察】

肝臓の発生過程では、肝幹・前駆細胞が様々な外来性および内在性シグナルにより制御され、組織構築のための細胞増殖や分化・成熟化を行うと考えられる。しかし、その詳細な細胞・分子レベルでのメカニズムは不明な点が多い。本研究では、胎仔肝臓に存在する間葉系細胞との相互作用に注目し検討を行った。その結果、Dlk1 および PDGFR α の特異的抗体を用いることで胎生期肝臓における間葉系細胞の純化を可能にした。Dlk1 弱陽性 PDGFR α 陽性細胞は高い増殖能と軟骨・脂肪・骨細胞系への多分化能をもつ間葉系前駆細胞であり、*in vitro* における共培養実験から分泌因子を介して肝幹・前駆細胞の増殖を亢進させる一方で、細胞間相互作用により機能的肝細胞への分化を誘導することが確認された。間葉系細胞による肝芽細胞の増殖・分化制御がどのようなシグナルを介して行われているかはいくつかの液性因子の関与が指摘されるものの、その詳細は不明である。肝芽細胞の増殖・分化を支持するまたは支持しない間葉系細胞株等の探索を行い、細胞株間での網羅的遺伝子発現比較を行うことで、肝芽細胞の増殖・分化に重要な外来性シグナルの同定が可能と期待される。さらに同定された分化シグナルを低分子化合物等で抑制することで、肝幹・前駆細胞の未分化性を維持した培養系が構築可能か検討したい。

また、本研究では肝幹・前駆細胞の長期培養を制御する内因性因子の網羅的探索を行った。その結果、過去に幹細胞性のへ関与が報告されている遺伝子 Bmi-1 と同様に、ポリコーム複合体の構成因子の一つである Cbx family が肝幹・前駆細胞の長期増殖能を制御することを見出した。胎仔肝幹・前駆細胞を試験管内で培養すると、Cdkn2a の発現上昇による細胞周期停止が誘導され長期増殖が阻害されている。Cbx7, 8 は Cdkn2a の発現上昇を抑制することで、肝芽細胞の長期増殖能を誘導すると考えられる。これまでに Cdkn2a は異常な癌遺伝子の発現時や、細胞外ストレスの存在下において発現が誘導されることが報告されており、今後生体内および培養系におけるポリコーム複合体、Cdkn2a と肝幹・前駆細胞の機能についての更なる解析が期待される。