

学位論文

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)

平成26年12月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

金子 洸太

目次

略語	3
要旨(Abstract)	4
第 1 章 序章	6
第 2 章 材料と方法	1 4
第 3 章 結果	2 1
第 4 章 考察	4 8
第 5 章 結論	5 5
第 6 章 引用文献	5 6
謝辞	6 4

略語

BABB: ベンジルアルコール (benzyl alcohol) と安息香酸ベンジル (benzyl benzoate) の 1 : 2 の混合液

CCl₄: carbon tetrachloride (四塩化炭素 ; 肝細胞に代謝され活性酸素を生じる)

CDE: choline-deficient, ethionine-supplemented diet (コリン欠乏食+エチオニン含有飲料水)

CK19: cytokeratin 19

DDC: 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (肝毒素の一種)

EpCAM: epithelial cell adhesion molecule

FGF7: fibroblast growth factor 7

HGF: hepatocyte growth factor

HTVi 法: hydrodynamic tail vein injection 法

Lgr5: leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5

LPC: liver progenitor cell の略であるが、ここでは (また、これまでの多くの研究では)、肝障害時に出現する異所的な CK19 陽性細胞集団の全てを LPC とよぶ。肝前駆細胞は、この雑多な細胞集団の一部に含まれていると考えられている。

LPM: Liver Perfusion Medium

Prom1: Prominin1

ROI: region of interest

SEM: standard error of the mean

TAA: thioacetamide (チオアセトアミド ; 肝毒素の一種)

TH: tyrosine hydroxylase

TUNEL 法: TdT-mediated dUTP nick end labeling 法

TWEAK: tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis

要旨

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。その再生過程として、肝実質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。これらの細胞は肝幹／前駆細胞を含み、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、増生する胆管上皮マーカー陽性の細胞の出現様式や、胆管との関係などは未解明であった。

私は、胆管を中心にマウス肝臓の組織構造を三次元的に解析する新たな手法を確立した。本研究では、①胆管の脈管構造をインクで標識し、三次元的に観察する方法、②標識したインクを切片において免疫染色と組み合わせて観察する方法、③厚みのある組織片または④ホルマウントでの免疫染色による三次元的解析、を組み合わせた総合的なアプローチにより、障害時における肝臓の組織構造の動態を解析した。これにより、増生した胆管上皮マーカー陽性の細胞は、元々存在する胆管に接続された構造体として出現することを初めて示した。すなわち、肝幹／前駆細胞の出現・増幅といわれていた現象は、胆管の構造変化を反映していることが明らかとなった。さらに、種々の肝障害モデルの比較から、障害部位や病態に応じて、増生した胆管の組織形態が大きく異なることを見いだした。肝臓は成体においても、薬物や代謝異常といった環境の変化に応じて上皮の三次元的組織構造を変える能力を有しており、これが強い再生能に寄与していると考えられる。本研究の成果は、多様なストレス環境に対する組織応答の理解を進展させるものである。

Abstract

The liver is a central organ for homeostasis and has a high capacity to recover its functions upon injuries. In severely damaged livers where hepatocyte proliferation is impaired, atypical ductular cells, which presumably include liver progenitor cells, proliferate and are assumed to contribute to regeneration. This phenomenon is known as the ductular reaction. Mutant mice that fail to induce such ductular cells are susceptible to injury, indicating the importance of the ductular reaction for liver regeneration. However, the nature of these emerging cells is still not fully understood. In particular, it remains unknown how these ductular cells emerge, and whether/how they are related to the pre-existing biliary tree.

To address these issues, I have developed novel methods to visualize the 3D structure of biliary trees in mouse liver. In this study, the dynamics of the liver tissue in response to injuries was analyzed by combining multiple methods including the 3D observation of the biliary tree with ink injection, the sectional analysis of the ink-injected liver with immunostaining, and 3D analysis of thick tissue slices or whole organ with immunostaining. This revealed for the first time the fine 3D architecture of the mouse biliary tree, and that the emerging ductular cells form a contiguous tubular structure connected to the pre-existing biliary tree. Thus, the emergence and expansion of these cells actually reflects bifurcation and extension of the biliary tree. Moreover, comparison of various liver injury models revealed the diverse architectures of the growing biliary tree. This may allow an efficient cell supply from liver progenitor cells, which reside in the biliary branches, to nearby injury areas. In conclusion, the hepatobiliary system possesses a unique and unprecedented structural flexibility and can remodel dynamically and adaptively in response to various stress conditions. I propose this to be a paradigm showing that dynamic tissue remodeling occurs even in adulthood as an adaptive response. This plasticity should constitute an essential component to maintain organ homeostasis, especially for the liver, which is inherently susceptible to a wide variety of injury conditions imposed by toxins or chemicals.

第1章 序章

1. 成体における肝臓の機能と高い再生能力

肝臓は、代謝・解毒・胆汁の分泌など多岐にわたる機能をもち、生体の恒常性の維持に必須の役割を担っている。動物が摂取した栄養素や有害物質は、消化管から門脈と呼ばれる静脈を通り、肝臓に運ばれる。肝臓は、それらを代謝・解毒することで血液成分を調節している。このような役割から、肝臓は様々な薬物などの外来物質や代謝異常により障害を受ける危険に曝されている⁽¹⁾。例として、過剰なアルコール摂取による肝炎や、肥満による脂肪肝などが挙げられる。一方、このように障害に曝された場合においても、肝臓は自身の高い再生能力により素早く肝機能を回復することができる。このため肝臓は、種々の障害に対する組織の再生応答を解析する優れたモデルになると考えられる。肝臓の体積の大半は肝細胞（肝実質細胞）が占めており、肝細胞は代謝や解毒、胆汁の生成など、主要な肝機能を担っている。すなわち、肝機能の回復には肝細胞の再生が重要であると考えられる。本研究において、肝再生に関しては、肝細胞の再生について述べる。

肝臓の組織構造の簡略的な模式図を Figure 1 に示す。門脈から流入した血液は、中心静脈から肝外へと流出する。胆汁を排出する胆管は門脈に隣接して存在し、門脈とともに肝内に張り巡らされており、最終的には肝外の総胆管（肝外胆管）へと合流し、肝臓から十二指腸へと胆汁を排出している（Figure 1A）。肝臓の組織構造は肝小葉とよばれる構造単位からなる（Figure 1B）。肝小葉は、中心静脈を中心に、門脈同士を結ぶようにおおよそ六角形に区切られた構造を指す。門脈からの血液は類洞とよばれる毛細血管を通して中心静脈へ流れている。肝細胞は門脈-中心静脈間で肝細胞索とよばれる索状の構造を形成している（Figure 1C）。肝細胞索は、肝内の胆管上皮とヘリング管とよばれる部分で接続しており、肝細胞が分泌した胆汁は毛細胆管とよばれる肝細胞の間隙から、胆管上皮細胞からなる胆管へと排出される。肝組織のうち、門脈周囲および中心静脈周囲を除いた、肝細胞の並んでいる領域を実質域とよぶ。

実質域の中でも、門脈側から中心静脈側にかけて、ゾーンごとに肝細胞の代謝や解毒における役割は異なる。例えば、門脈に近いゾーンでは、コレステロール合成や尿素合成などが行なわれ、中心静脈に近いゾーンでは、解糖系や脂肪酸生合成が盛んである。また、代謝酵

素であるシトクロム P450 (CYP) の発現もゾーンにより異なる。四塩化炭素 (CCl₄) は CYP2E1 によって代謝されることでラジカルが生じ、肝障害を引き起こすが、CYP2E1 は中心静脈に近いゾーンで高く発現しているため、このときの障害部位は中心静脈周辺の実質域となる。このように、肝障害は肝細胞の機能と関連しており、薬剤などの作用機序によって異なるゾーンの肝細胞が障害を受ける。

肝臓の再生過程は、大きく 2 種類に分けることが出来る。一つは、代償性の再生といわれる再生過程である。例えば肝臓は、外科的に肝重量の 70% 程度を切除しても、残りの組織が大きくなることで元の肝重量に戻り、肝機能も回復することが知られている。この再生は、残存組織の分化成熟した肝細胞が増殖や肥大することにより行なわれる⁽²⁻⁵⁾。また、薬剤などによる急性肝炎により一部の肝細胞が死滅した場合においても、障害を受けなかった残存肝細胞が増殖や肥大することにより、失われた組織を補う形で再生させる⁽⁶⁻⁸⁾。もう一方の再生過程は、胆管増生という現象を伴う再生である。胆管増生は、実質域に胆管上皮細胞マーカー陽性の細胞が出現し、その数が実質域内に増えていく現象であり、ヒトの病態やマウスモデルでの慢性的／重篤な障害肝において認められる (Figure 2)。これらの細胞集団は形状や性質から、オーバル細胞や Liver Progenitor Cell (LPC) とよばれ、肝臓の上皮細胞である肝細胞と胆管上皮細胞の両方への分化能をもつ肝前駆細胞を含むと報告されている⁽⁹⁻¹⁶⁾ (現在、これらの前駆細胞のみを識別・単離することが出来ないため、肝障害時に実質域に現れる胆管上皮細胞マーカー陽性細胞の全てを LPC とよぶ)。LPC の出現の頻度はヒトの病態における肝障害の重篤度に比例することが報告されていることから⁽¹⁷⁾、成熟した肝細胞による代償性の再生が困難または不十分な場合に、その一部が肝細胞へと分化することで再生に寄与すると考えられている (Figure 3、青矢印)。

代償性の再生がおこる場合と、胆管増生が誘導される場合の違いは、主に肝細胞の障害のされ方・重篤度によるものと考えられる。例えば、代償性の再生がおこる代表的な障害モデルである部分肝切除の場合、残存組織の肝細胞は損傷を受けていないため、分裂・肥大することができる。一方で、薬剤などによる肝障害では、肝細胞の壊死やアポトーシスがおこり、炎症反応も誘導される点で部分肝切除とは大きく異なる。このような障害においても、障害の程度が軽微な場合には、損傷されない肝細胞は増殖することが出来るが、障害の程度が重

篤な場合や長期間に及んだ場合には、肝細胞の増殖は、薬剤や死細胞・炎症の影響などによって制限される、あるいは分裂の繰り返しにより限界に達すると考えられる。胆管増生はこのような障害に応答して誘導される。

近年、胆管増生（LPC の出現・増幅）を制御するシグナルが報告されている。fibroblast growth factor 7（FGF7）欠損マウスや、hepatocyte growth factor（HGF）の受容体である c-Met の欠損マウスでは、肝障害に応答して胆管増生が誘導されず、障害が重篤化することが報告された^(18, 19)。さらに、FGF7 を強制発現するトランスジェニックマウスや、tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis（TWEAK）をアデノウィルスにより強制発現したマウスでは、正常肝においても胆管増生が誘導・促進され、肝障害に対して感受性が低下することが報告された^(18, 20)。すなわち、胆管増生は、これらのシグナルによって制御されることで、肝機能を維持していることが示唆され、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。以上のことから、本研究は、胆管増生を伴う肝再生に着目した。

2. LPC と胆管

LPC は、肝細胞および胆管上皮細胞の境界部位であるヘリング管の部分から出現すると考えられている⁽²¹⁾（Figure 3）。また当研究室では、肝障害時の LPC の出現に重要なシグナル因子である FGF7 を分泌する間葉系細胞が、胆管周囲に存在していることを明らかにしており⁽¹⁸⁾（Figure 3）、胆管およびその周囲が LPC のソースあるいはニッチであると考えられる。

しかしながら、LPC と胆管の関係の大部分は未だ不明である。LPC は、前駆細胞としての性質よりも、肝障害時に出現すること、および、組織学上の形態や存在場所によって、胆管上皮細胞とは異なる集団として定義されることが多い。LPC に肝前駆細胞が含まれるという報告は、細胞系譜解析や *in vitro* でのコロニーアッセイに基づいており、これらはマーカーの発現に基づいた解析法である。ところが、LPC と胆管上皮細胞は共通のマーカー（CK19, EpCAM, CD133 など）を発現しており、両者を区別するマーカーは同定されていない。そのため、肝細胞への分化能やコロニー形成能といった細胞の機能について、LPC と胆管上皮細胞を区別した解析はなされていない。また、*in vitro* でのコロニーアッセイでは、正常肝の胆管上皮細胞内にも、高いコロニー形成能をもち肝細胞への分化能を示すものが存在すること

が知られている^(14, 15, 22, 23)。さらに、LPC の出現様式については、ヘリング管から実質域へ浸潤する^(19, 24)、あるいは、ヘリング管ではない異所的な細胞の分化転換／脱分化によっても生じる、と推察されてきた⁽²⁵⁾ が (Figure 4)、その実態は未だ不明である。また、組織切片を用いた LPC の観察により、一部の肝障害モデルでは、管腔様の構造を形成する集団 (Figure 2C、矢印) (偽胆管とよばれる) もしばしば見られる。このことは、一部の LPC が元から存在する胆管の管と接続されている可能性を示唆しているが、LPC と胆管の接続の有無は未解決の課題である。

3. 本研究のアプローチ

上述のように、LPC と胆管の間には深い関連があると考えられるが、両者の関係の大部分は不明であった。本研究では、LPC と胆管の位置関係に着目し、従来の組織切片による二次元的な解析では不十分であると考えたため、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。この手法により、組織切片において管腔様に観察される LPC のみならず、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脈管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・増幅といわれてきた現象の実体は、胆管組織の構造変化であることを明らかにした。このことから、成体の肝臓は、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。

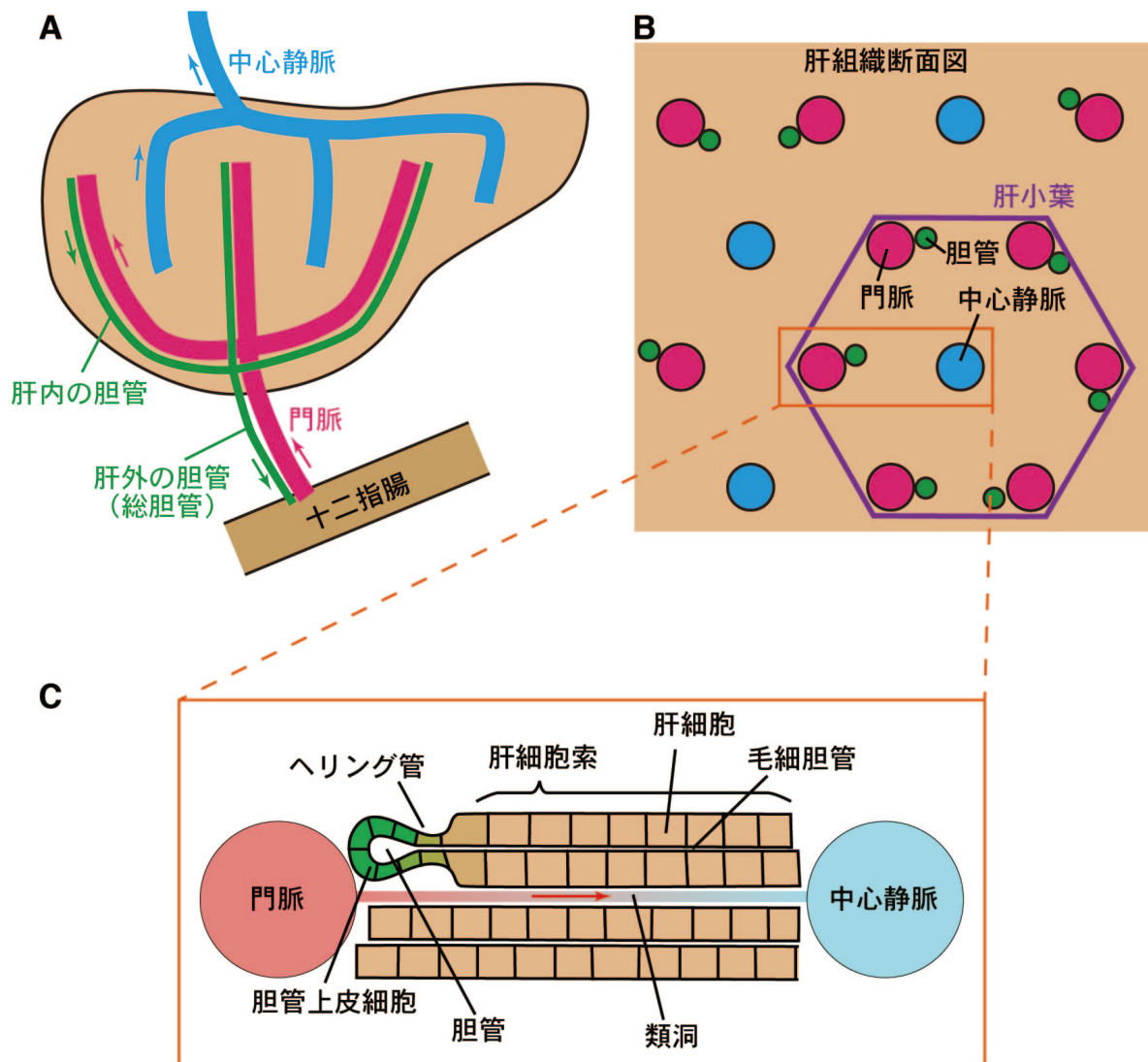


Figure 1. 肝臓の組織構造

肝臓の組織構造の簡略的な模式図。

(A) 十二指腸を主とした消化管からの血液は、門脈から肝臓へ流入し、肝臓において代謝・解毒された後、中心静脈から流出する。胆管は門脈に隣接して肝内に張り巡らされ、肝外の総胆管により十二指腸へ接続されている。矢印は、血流／胆汁の流れる向きを示している。

(B) 組織切片では、門脈と中心静脈の断面が繰り返し並ぶ。組織学において、中心静脈を中心に、門脈同士を結ぶようにおおよそ六角形に区切られた単位構造を肝小葉とよぶ(紫枠)。

(C) (B) のオレンジ色の枠に対応する組織構造。赤矢印は、類洞内の血流の向きを示している。

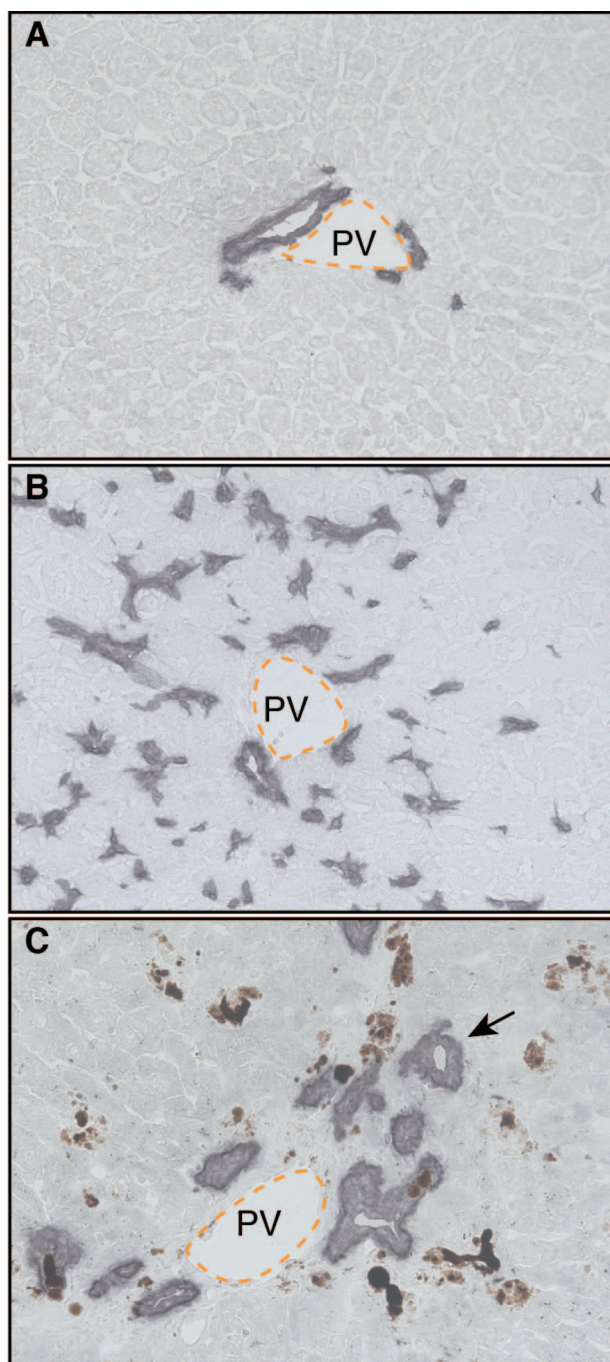


Figure 2. 組織切片において観察される胆管増生と LPC

肝臓の組織切片を用いて胆管上皮細胞マーカー CK19 に対する免疫染色（紫）を行なった。

(A) 正常肝。門脈周囲に胆管上皮が観察される。

(B, C) 胆管増生が誘導される CDE モデル (B) および DDC モデル (C) の障害肝。正常肝には観察されない、実質域に広がる CK19 陽性細胞が観察される。これらの異所的な CK19 陽性細胞が LPC とよばれている。LPC の中には管腔様の構造を示す集団も観察される (C, 矢印)。

PV, portal vein (門脈)。

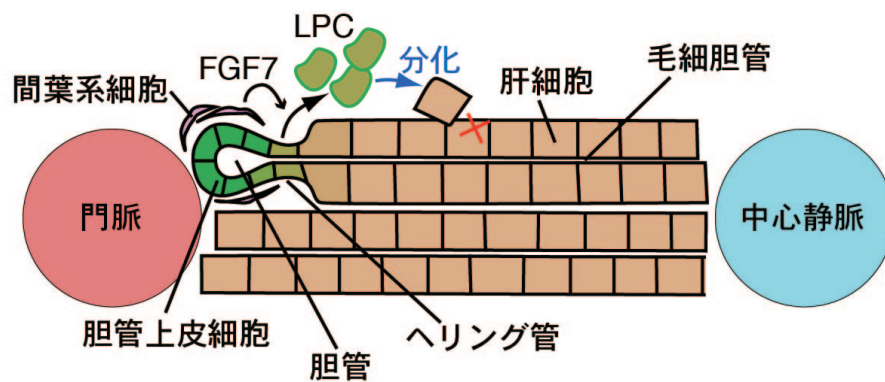


Figure 3. 肝臓の組織構造と LPC

死んだ肝細胞に対し、他の肝細胞による代償性の再生が困難または不十分な場合、ヘリング管付近から出現した LPC が肝細胞に分化することで再生に寄与と考えられている (青矢印)。

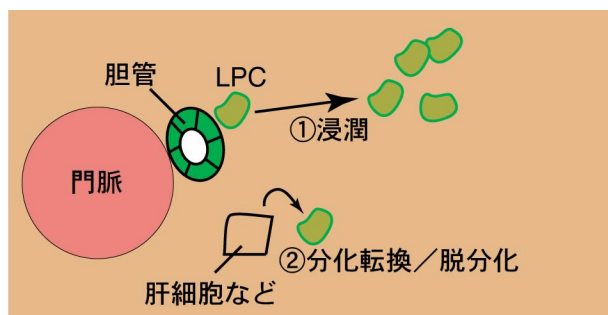


Figure 4. LPC の出現がどのように起こるか

- ①LPC はヘリング管付近から出現し、実質域へと浸潤していくと考えられてきた^(19, 24)。
 ②場合によっては、実質域の肝細胞などが分化転換などにより LPC になるという説⁽²⁵⁾も提唱されている。

第2章 材料と方法

マウスと障害モデル

野生型マウスとして日本クレア社より購入した C57BL/6/J 系統マウスを用いた。細胞系譜解析には、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から入手した *Prominin1* (*Prom1*) *promoter-CreERT2* ノックインマウス [B6N;129S-Prom1^{tm1}(cre/ERT2)Gib/J]⁽²⁶⁾ と *R26R-YFP Cre* レポーターマウス⁽²⁷⁾を掛け合わせたものを使用した。すべての動物実験は、東京大学の実験動物指針に基づいて行った。障害モデルの誘導は、DDC モデルについては 0.1% 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) 含有飼料 (F-4643; Bio-serv) を食餌投与、choline-deficient, ethionine-supplemented diet (CDE) モデルについてはコリン欠乏食 (MP Biomedicals) の食餌投与と 0.165% (wt/vol) エチオニン (E5139; Sigma-Aldrich) 含有飲水投与、CCl₄ (四塩化炭素) モデルについては四塩化炭素を 1 mL/kg body weight の濃度で 4 週にわたり週 2 回の腹腔投与、thioacetamide (TAA) モデルについてはチオアセトアミド (300 mg/L; Wako) 含有飲水投与を行った。タモキシフェン (10 mg/20 g body weight; Sigma-Aldrich) は経口投与した。

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法による強制発現

Fgf7 と Tnfsf12 (Tweak をコード) のマウス cDNAs は DDC 投与マウスの肝臓由来 cDNA をもとに以下のプライマーセットにより PCR で増幅した。

Fgf7 : 5'-gaattgccaccatgcgcaaatggatactgacac-3' と 5'- gcggccgcatgtacacttaggttattgcca-3'

Tnfsf12 : 5'-cagatctgccaccatggccgcccgtcggagccag-3' and 5'- gcggccgctcagtgaaactgaaagagtcc-3'

増幅断片は、まず pGEM-T Easy vector (Promega, USA) に組み込まれ、配列確認後、発現ベクター pLIVE (Mirus, USA) にサブクローニングした (高瀬、伊藤による)。pLIVE-Fgf7 や pLIVE-Tweak (20 µg) を、TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus, USA) を用いて、hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法により C57BL/6J マウスに導入した^(28, 29)。この手法では、マウスの体重 20 g に対して 2 ml のプラスミド溶液を 7-8 秒間かけて尾静脈から注入する。pLIVE-LacZ (20 µg) をコントロールとして用いた。遺伝子導入して 12-14 日後に、解析に使用した。

インクによる胆管樹状構造の可視化

胆管の樹状構造を可視化するため、数種類のインクを入手し、胆管の可視化に適したものを検討した。インクの性質・性状には、水性と油性、顔料と染料などの違いがある。試した中で、万年筆用の黒インクであるプラチナカーボンインク (SPC-200; プラチナ万年筆株式会社) が適していることが明らかとなった。このインクの主要成分はカーボンブラックとよばれるもので、タイヤのゴムなどの原料となる炭素の微粒子である。ヘマトクリットチューブ (22-362-566; Fisher Scientific) をガスバーナーで熱して延ばすことで胆管径に合わせた微細なガラスのキャピラリーを作製した。成体のマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、腹側を開き、肝外胆管と十二指腸の吻合部を切り、切り口からキャピラリーを挿入し、肝内胆管の方へとインクをゆっくり注入した。このとき、カーボンブラックの微粒子が胆管の樹状構造を満たし、溶媒は血管へと漏れだしているようである。水性染料のインクを注入した結果から、溶液は門脈へと漏れると推察される。肝臓の表面を観察しながら注入し、インクが表面に達する直前にインクの注入を停止した。過剰に注入すると、炭素の微粒子も門脈へと漏れてしまい、さらに注入すると、実質域へと漏れてしまう。適切なインクの量は、溶媒の量ではなく炭素の微粒子の量に依存し、8 週から 12 週齢のマウスの正常肝では、原液のインクでおよそ 15–20 μl である。胆管にインクを注入した後、肝臓を摘出し、段階的に脱水した。脱水は Phosphate buffered saline (PBS) とエタノールの混合液で、エタノールの濃度を徐々に上げていった。エタノール濃度は、体積で 10%、40%、80% と、それぞれ 1 時間程度の間隔で上昇させた。低濃度から処理しないと、肝臓全体で脱水の具合に偏りが生じることで、一部固くなった組織により溶液の浸透が悪くなり、一部に脱水出来ない部分が生じてしまうと考えられる。最後に 100% エタノールにより一晚脱水した。その後、脱水された肝臓を、安息香酸ベンジルとベンジルアルコールの 2:1 の混合液 (BABB) に浸けた。この溶液中で、肝臓は 1 日から 2 日程度で透明になる。透明化の後、肝臓を BABB の溶液に浸したまま、胆管の樹状構造を顕微鏡 (Axio Observer.Z1, Zeiss and MZ16, Leica) で撮影した。各観察は 3 匹以上のマウスで行った。

インクと胆管上皮細胞マーカー cytokeratin 19 (CK19) の共局在を観察するため、インクを注入した肝臓から、切片を作製した。切片の作製と免疫染色は、透明化した後の肝臓からでも

可能であった。この場合、BABB から取り出した肝臓を 100% エタノールに浸し、組織中の BABB をエタノールに置き換えるため、2 時間置きに 3 回液を換え、最後に一晚インキュベートした。組織中の BABB をエタノールに置き換えた後、次に PBS に置き換えるため、肝臓を PBS に浸し、2 時間置きに 3 回液を換え、最後に一晚インキュベートした。その後、後述の前固定の肝臓と同じ過程で ティッシュテック O.C.T. コンパウンド (4583; Sakura Finetek USA, Inc.) に包埋し、液体窒素で凍結させ、切片を作製し、免疫染色を行った。

組織切片による解析

摘出した肝臓を、PBS で洗浄した後、5 mm 程度の厚さに切り、前固定の場合は、ザンボニ固定液に一晚浸漬し固定した後、10%、15% スクロースに 3 時間ずつ浸漬した後に 20% スクロースに一晚浸漬し、O.C.T. コンパウンドに包埋し、液体窒素を使って凍結した。凍結切片 (10 μ m) は HM525 クライオスタット (Microm International) を用いて作製し、APS (アミノシラン) コートスライドガラス (松浪ガラス工業) に貼り付け 1 時間ほど風乾した。後固定 (切片作製後の固定) の場合は、4°C の 100% アセトンに一晚、または 4% パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde; PFA) 溶液に 10 分、切片を浸けて固定した。前固定のサンプルから作製した切片または、後固定した切片は、PBS で洗浄後、5% スキムミルク/PBS でブロッキングし、一次抗体と一晚 4°C で反応させた。その後、PBS で洗浄後、二次抗体と 2 時間室温で反応させ、PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (Sigma) により核を染色した。染色したサンプルは蛍光/光学顕微鏡 (Axio Observer.Z1; Zeiss) または 共焦点顕微鏡 (Fluoview FV1000; Olympus) により観察し、撮影した。インクを注入した肝臓の切片に対して免疫染色を行なったものは、蛍光像 (免疫染色) と明視野像 (インク) を画像解析ソフトウェア Photoshop (Adobe) によりレイヤーとして重ね、画像を作製した。

胆管の枝の三次元画像構築による解析に用いた 200 μ m 厚の切片については、切片作製後にスライドガラスに貼り付けず、2 ml チューブ中で溶液に浸けた状態で震盪し、抗体と反応させた。PBS による洗浄は 50 ml チューブ内で、45 ml の PBS に浸漬し震盪することで行なった。共焦点顕微鏡により撮影する直前にスライドガラスに乗せた。切片は、5% メルカプトエタノール (Sigma) /1% Triton X-100/PBS 溶液に一晚浸けることにより浸透化処理し、

その後は通常の切片と同様の処理を、各ステップの時間を長くして行なった：抗体反応はおよそ 1-2 日、洗浄は一晩程度で行なった。

一次抗体は、rat anti-mouse EpCAM antibody (1:200; 552370; BD Bioscience)、rat anti-mouse Ki67 antibody (1:200; 14-5698-82; Abcam)、rat anti-mouse CK19 (TROMA-III) antibody (250 ng/mL; Developmental Studies Hybridoma Bank)、rabbit anti-mouse CK19 antibody (1:1000-1:2000; 当研究室で作製)⁽³⁰⁾、rabbit anti-collagen type I antibody (1:100; 2150-1410; AbD Serotec)、rabbit anti-collagen type III antibody (1:300; ab7778; Abcam)、rat anti-GFP antibody (1:200; 04404-84; Nacalai tesque)、rabbit anti-Lgr5 antibody (1:100; ab75732; Abcam)、rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (AB152; Merck Millipore) を使用した。TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法は In Situ Apoptosis Detection kit (MK500; TaKaRa) を説明書に従って使用した。肝組織の自家蛍光は緑または赤の波長域で撮影し、擬似カラーで示した。

組織切片における定量解析

LacZ、TWEAK、FGF7 を強制発現した肝臓の解析 (Figures 11D, 11E, 11J) には、それぞれに対して 5 匹のマウスを用いた。左葉の真ん中から作製した切片を免疫染色した。Figure 11D の解析には、各切片あたり 20 視野以上を撮影した。Ki67 陽性/CK19 陽性細胞の数を数え、CK19 陽性細胞中の割合を計算した。Figures 11E と 11J では、In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) を用いて、切片全体の CK19 陽性領域を撮影し、領域全体の面積および周囲長の合計を計算した。切片全体の面積も Hoechst 33342 による核染色を元に計算した。

200 μ m 厚の切片における三次元画像構築

共焦点顕微鏡により、60 \times /1.2 NA 水浸レンズ (UPLSAPO 60XW; Olympus) を用いて撮影した。次のような設定により撮影した：320 \times 320 pixel frame size; 662 nm pixel size; 800-nm z-distances between sections; 20 μ s/pixel scan speed。蛍光の検出は FV10-ASW (Olympus) というソフトウェアの Bright Z Stack 機能を用いて、焦点の深さによって適切な露光時間などを設定した。撮影した Z スタック画像は IMARIS (Bitplane) を用いて三次元構築した。明るさとコントラストは線形的に調整した。Figure 14A の三次元表示には、Gaussian smoothing

(0.662 voxel radius) を行なった。解析する区域 (region of interest; ROI) は $120 \times 120 \times 120$ pixel の大きさで設定した。胆管の枝は、IMARIS に組み込まれている Filament Tracer という機能により、骨格を抽出した。三次元画像における血管は、組織中の自家蛍光のない部分として構築した：自家蛍光を三次元画像構築し、反転させ、IMARIS に組み込まれた Surface 機能を用いて構築した。

200 μm 厚の切片における胆管の枝の方向性の解析

枝をベクトル集団として解析することで、解析がより単純となり、例えば、枝同士が接続しているか否か、小さい突起を枝とするか否かといった細かく複雑な要素の影響が最小限となる。それぞれのベクトルは門脈と反対側に向いていると仮定して解析した。門脈のおよそ片側のみに解析を限定するため決まった大きさの ROI を設定した (上述、および Figure 14C)。

ここで、パラメーター、Directionality (D) を次のように定義した：

$$D = \frac{\left| \sum_i \vec{a}_i \right|}{\sum_i |\vec{a}_i|}$$

ここで、 \vec{a}_i は ROI の中の全てのベクトルである。Figure 14D に示すように、枝が接平面上に均一に拡散する場合、 D は 0 となり、枝が完全に一方向に向いている場合、 D は 1 となる。枝の長さが均一で、向きが三次元的に完全に均一に拡散している場合を、 D_{random} として次のように計算した：

$$D_{random} = \frac{\int_0^{\pi/2} \sin \theta d\theta}{\pi/2} \approx 0.64$$

ここで、 θ は各ベクトルと、ベクトルの総和に垂直な平面との間の角度である (Figure 14E)。ベクトルの総和は、ベクトルが均一に拡散している場合、接平面に垂直となる。 θ は、0 から $\pi/2$ の間の値をとり、ベクトルが均一に拡散している場合、この区域に均一に分散しているとした。ベクトルの数が多い場合には、ベクトルの長さや向きが均一であるパターンが、ランダムなパターンに近い値をとると考えられる。

さらに、以下のような D' を計算した：

$$D' = \frac{\left| \sum_i \vec{a}_i \right|}{T}$$

ここで T は、ROI 中の枝の骨格の長さの合計を IMARIS で計算した値である。すなわち、パラメーター D において、ベクトルの長さの総和を使用していた部分を、 D' では枝の長さの総和に置き換えている。 D では、湾曲した枝を直線として近似しているが、 D' では近似しないため、 D' は D より小さい値となる。 D と D' を CDE モデルと TAA モデルで比較した結果、両モデルの差は、二つのパラメーターの間で大きく変わらなかった (D' の値は CDE モデルにおいて 0.51 ± 0.02 、TAA モデルにおいて 0.81 ± 0.03 であった)。この結果は、2つのモデルを比較する際に、枝をベクトルとして近似する影響が少ないことを示している。

切片における二次元的分布の解析

Figure 13K については、左パネルに示したように各区域を設定し、epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) 陽性領域の密度分布を、画像解析ソフトウェア ImageJ の plot profile により解析した。切片中の EpCAM 陽性領域の面積比率も ImageJ により解析し、Figure 13K のグラフの Y 軸の値は、合計が切片中の EpCAM 陽性領域の面積比率になるように標準化した。Figure 15H の X 軸については、Figure 15G のように区域を設定した。障害部位は、自家蛍光に基づいて ImageJ により推定した。TAA モデルでは障害部位に自家蛍光の強い粒子が見られる (Figure 12F)。自家蛍光の粒子に対し、ImageJ では“close,” “open,” “maximum,” “Gaussians,” threshold of 105 の処理を行なうことで、粒子の多い領域を認識し、障害部位とした。CK19 陽性領域の密度分布は上述の EpCAM 陽性領域と同様に解析した。YFP 陽性の肝細胞は、面積ではなく、細胞の数の分布を示した。CK19 陽性領域および YFP 陽性の肝細胞の数の両方について、それぞれ Y 軸の値は、合計が 1 となるように標準化した。

ホールマウント免疫染色

成体マウスに麻酔をかけ、4°C の Liver Perfusion Medium (LPM; 17701038; Invitrogen) を、肝臓内の血液が除去されるまで、5 分程度、門脈から灌流した。次に、4°C の 4% PFA 固定液を 10 分灌流した後、4°C の PBS を 20 分灌流することにより PFA を洗い流した。さらに、5% メルカプトエタノール (Sigma) /PBS を 30 分還流すると、PFA 固定液により固

くなっていた肝臓が弾力を持つようになり、膨潤する。その後、PBS を 20 分灌流した後、肝臓を摘出し、液体窒素を用いて凍結させた。凍結させた肝臓は、免疫染色する前に 0.1% Triton X-100 / PBS に 3 時間浸漬した後、フィルムケース内で 1-2 ml の一次抗体反応液に浸漬し、3 日ほど震盪した。2 日ほど 0.1% Triton X-100 / PBS で洗浄した後、二次抗体反応液に浸漬し 2 日ほど震盪した。最後に 1 週間ほど 0.1% Triton X-100 / PBS で洗浄した後、先述したように BABB による透明化を行なった。洗浄や抗体反応は全て 4°C で行なった。

統計処理

データは、平均 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で示した。Figure 11 では両側の Student t-test、Figure 15F では片側の Welch's t-test を行なった。P 値が 0.05 より小さい場合に、有意な差があるとした。

第3章 結果

インクによる胆管樹状構造の可視化

これまで、肝臓の組織の解析は、組織切片によるものが主流であった。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 5A)。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。これまで、この胆管の樹状構造を観察するための方法としては、胆管に樹脂を流し込み、固まった樹脂を観察する方法や、胆管に排出される造影剤を用いた胆管造影などがあった^(31, 32)。しかしながら、これらの方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 (Figure 1A) 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 (Figure 5B–5E)。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 5F)。正常肝において胆管には、門脈におよそ 1 : 1 の割合で並走する太い管と、門脈周囲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。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結果、インクと CK19 の分布は完全に一致していた (Figures 5G, 5H)。この結果は、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。

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 6A)。LPC を誘導する典型的な肝障害モデルである DDC モデル (DDC という肝毒素を食餌投与) 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。その結果、ほとんど全ての CK19 陽性細胞がインクを囲むように局在していた (Figures 6B, 6C)。

この結果は、CK19 陽性の LPC が総胆管から連続した脈管構造を形成していることを示している。インクは逆行性に圧力をかけて注入しているため、このような脈管構造は、実際に胆汁を排出する管腔構造を反映しているかは不明であるが、インクの粒子を通す一定の連続した間隙を有すると考えられる。一方で、インクが共に観察されない CK19 陽性細胞も稀に観察されるが、このような細胞が観察される要因としては、いくつかの可能性がある。まず、インクは細胞そのものを標識するのではなく、細胞から形成される流路を流れるため、細胞とインクは隣接するものの完全には一致しない。このため、組織の断面を観察する切片において、流路を形成する細胞の断面のみが観察され、流路の中のインクが断面に含まれないということは、一定の確立で起こると考えられる。また、注入したインクの量が不十分で、部分的にインクが充填されない脈管が生じる可能性もある。別の可能性としては、一部の少数細胞が胆管の脈管構造から離れるように、組織に浸潤していることや、脈管構造から離れた位置に存在した肝細胞などから CK19 陽性細胞に分化転換しているといったことが考えられる。ただし、インクが共に存在しない細胞は、インクが共に存在する細胞集団の近くにのみ分布することから、浸潤や分化転換といった反応が起こっていたとしても、脈管構造を形成する LPC のごく近傍に限局されることが示唆された。

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、組織切片上で明確な管腔構造の認められないものも含め、同様に、ほとんど全ての LPC がインクと隣接して存在し、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 (Figure 7)。また、中心静脈周囲まで分布する LPC にもインクは隣接して存在していた (Figure 7D)。

次に、インクによる新規可視化法を利用し、DDC モデルにおける胆管の樹状構造を三次元的レベルで観察した。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 8)。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 (Figure 9)。これらの観察を裏付けるため、200 μm の厚みのある組織切片を用いて、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 (Figure 10)。すなわち、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、三次元的な免疫染色によって確認された。これらの結果を総合的に勘案すると、胆管の構造変化において、細胞が胆管の枝から離れて組織に浸潤する可能性や離れた位置の肝細胞から CK19 陽性細胞に分化転換するといった可能性は、完全には否定されないものの、主要なメカニズムではないと考えられる。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、実質域に出現・浸潤した特殊な細胞として定義されてきた LPC は、実体としては胆管の組織構造のリモデリングの結果を反映していることが、三次元的な観測により示された。

肝障害時に働くシグナルの胆管のリモデリングに対する効果

これまでに、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^(18-20, 33-37)。これらのシグナルは障害に応答して惹起または増強され、LPC を誘導／増幅することで再生に寄与すると考えられている。なかでも、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、強制発現するとそれぞれ単独で LPC のような細胞群を誘導することが出来る^(18, 20)。本研究では LPC の出現が胆管の構造変化を反映していることを示してきたため、これらのシグナルは、障害に対する再生応答として、胆管の構造変化を誘導・制御している可能性が考えられる。しかしながら、FGF7 や TWEAK が胆管組織に与える影響は不明である。

そこで、FGF7 や TWEAK を HTVi 法により肝細胞に強制発現させ、胆管組織に与える効果を解析した。HTVi 法は、大量の溶媒とともに発現プラスミドをマウスの尾静脈から短時間で注入することにより、圧力によって肝細胞に遺伝子を導入する方法である⁽²⁸⁾。FGF7 や TWEAK は分泌因子であるため、肝細胞に強制発現させると肝臓組織中へ拡散し、胆管に作用できると考えられる。強制発現の結果、コントロールの LacZ 強制発現に比べ、どちらの因子も、CK19 陽性細胞を増殖させ、組織切片中の CK19 陽性領域の割合を増加させた (Figures 11A-11E)。すなわち、過去の報告^(18, 20)において LPC の誘導といわれた現象と同様の結果が得られた。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 11F, 11G)。さらに、インク注入後の切片においてインクと CK19 の免疫染色が一致していることから (Figures 11H, 11I)、FGF7 には、胆管を管としての構造を保ったまま分岐させる効果があると考えられる。

三次元的な解析における TWEAK と FGF7 の効果の違いは、組織切片における解析において、TWEAK と FGF7 がどちらも同じ程度に CK19 陽性の領域を増加させていたこと (Figure 11E) とは一見、相反する結果である。そこでこれらの因子の効果について、組織切片において、CK19 陽性領域の面積だけでなく、領域のパターンに対する影響を解析した。ここで、領域パターンを解析するパラメーターとして、領域の(周囲長)²/面積 の値を計算した。相似的なパターンの変化では(周囲長)²は面積に比例して変化するため、(周囲長)²/面積 の値は変化しない。一方、この値はパターンがより複雑で散乱している場合に大きくなると考えられる (Figure 11J、模式図)。(周囲長)²と面積の比率を示す同様のパラメーターは、様々な対象の形状の解析に利用されており、対象としては例えば細胞や核、傷害、ナノワイヤが挙げられる⁽³⁸⁻⁴¹⁾。切片全体における CK19 陽性領域に対して、(周囲長)²/面積 の値を計算した結果、LacZ と TWEAK をそれぞれ強制発現した肝臓の間に有意な差は認められなかったが、FGF7 を強制発現した肝臓において有意に値が大きかった (Figure 11J)。この結果は、FGF7 が CK19 陽性領域のパターン変化を誘導していることを示しており、胆管の分岐構造の誘導・増大により、領域パターンの複雑さを増加させていると考えられる。一方で、TWEAK による CK19 陽性領域の拡大は相似的な変化に近い可能性を示唆している。

以上から、FGF7 と TWEAK は、ともに同程度の CK19 陽性領域の増大を誘導するが、その増大の様式に有意な差があり、これは三次元的な構造の差を反映していると考えられる。FGF7 には TWEAK と異なり、胆管の分岐構造を顕著に変化させる効果があることが示唆された。

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⁽¹⁾ (Figure 12)。いくつかの障害モデルが、LPC が誘導されるモデルとして研究されているが、近年、異なる障害モデルでは LPC の性質も異なることが報

告されている^(10, 42)。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、障害モデルごとに、胆管の構造変化の様態が大きく異なることを見いだした (Figures 13A–13H)。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応じ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。これは肝細胞の機能の多様性によるもので、特に門脈周囲と中心静脈周囲では、肝細胞の代謝や解毒における役割が異なるため、薬物の種類などによって、門脈周囲に障害が引き起こされる場合と、中心静脈周囲に引き起こされる場合がある (Figure 12)。門脈周囲から引き起こされる障害モデルである DDC モデルや CDE モデルでは、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 13A–13D, 13I)。一方、障害部位が中心静脈周囲に限定される CCl₄ 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長した構造を示していた (Figures 13E–13H, 13J)。そこで、組織切片における LPC の分布に着目し、胆管上皮細胞マーカー epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) 陽性領域の門脈-中心静脈間の分布を定量した。その結果、TAA モデルでは、分布が中心静脈側まで伸展しているのに対し、CDE モデルでは、門脈周囲で密度が高くなっていることが確認された (Figure 13K)。すなわち、胆管の枝は、障害部位において密度が高くなる分布をとっていると考えられる。

インクによる三次元的観察により、障害パターンに応じて異なる胆管の構造において、形成された枝の「方向性」が主要な違いであると考えられた。そこで、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 μm 厚の組織切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。まず、共焦点顕微鏡により三次元画像構築した胆管の枝の骨格を解析ソフトにより抽出し、これをベクトルの集合体として解析した (Figure 14A–14C)。これに対し、Figure 14D に示すように定義した directionality (D) を、方向性を解析するパラメーターとして計算した。枝が門脈の接平面上のみに均一に拡散した場合、すなわち門脈から実質域に向かって全く進行せずに拡散した場合、 D は 0 となり、枝が門脈から離れて全て一方向に直進した場合、 D は 1 となる。また、例えば、枝が均一の長さで三次元空間をランダムに拡散した場合、 D の理論値はおよそ 0.64 と計算された (Figures 14D, 14E、材料と方法)。このパラメーター D を、異なる障害モデルの典型として、

TAA モデルと CDE モデルにおいて広がった胆管の枝に対して計算した。その結果、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に近い値を示すことが明らかとなった (Figure 14F)。また、材料と方法に示すように D' を計算し、枝をベクトルとして近似することが、この解析にほとんど影響しないことを確認した。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 13I, 13J)。

肝前駆細胞のソースあるいはニッチとしての胆管の構造変化

従来、胆管または LPC は肝前駆細胞を含むといわれ、肝再生に寄与することが報告されてきた^(9-11, 43, 44)。これらの知見を、本研究のこれまでの結果と統合すると、障害に応答して拡張した胆管の枝は、障害部位付近において、肝前駆細胞のニッチあるいはソースとして働き、新しい肝細胞を供給する役割をもつことが考えられる (Figure 15A)。

この仮説を検証するため、胆管/LPC に発現していることが知られる CD133 (Prominin1, Prom1)^(14, 45) を利用して細胞系譜解析を行ない、障害部位へ胆管の枝が伸びる肝障害モデルにおいて、障害部位付近における新しい肝細胞の供給が起こるかを解析した。CD133 陽性細胞が肝前駆細胞を含むことは *in vitro* の実験により報告されてきたが、*in vivo* において CD133 を用いた細胞系譜解析はなされていなかった。特に、障害部位へ胆管の枝が伸びる TAA モデル障害肝において、肝前駆細胞が肝細胞へと分化することによる肝再生への寄与の有無は不明であった。*Prom1 promoter-CreERT2* ノックインマウスと *R26R-YFP* レポーターマウスを交配し、タモキシフェン投与により、TAA モデルにおいて障害部位へ枝が伸長した状態の胆管/LPC にパルス標識を誘導した (Figures 15B, 15C)。3 日後、YFP 陽性細胞は CK19 陽性細胞中のみ観察され、肝細胞や他の細胞には見られなかった (Figure 15D)。この状態から、TAA の投与を中止し、肝再生の期間を設けた (Figure 15C)。過去の研究では、このような期間において肝前駆細胞から肝細胞への分化が促進されることが報告されている⁽¹¹⁾。この期間の後、障害部位の周囲に有意な数の YFP 陽性の肝細胞が観察された (Figures 15E-15H)。これらの肝細胞は、伸びた胆管の枝から局所的に生じたと考えられる (Figure 15A)。

また、最近、肝障害時に活性化した肝前駆細胞のマーカーとして leucine-rich

repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) が報告されたため⁽⁴³⁾、TAA モデルおよび CDE モデルにおいて、Lgr5 陽性／CK19 陽性細胞の分布を観察した。その結果、TAA モデルでは伸びた枝の障害部位に近い部分に観察された (Figure 16A)。一方、CDE モデルでは拡張した胆管中に比較的均一に散在していた (Figure 16B)。CDE モデルでは、障害部位の中で胆管のネットワークが広がっているため、ネットワーク内での障害部位との関係に偏りが少ないためと思われる。

以上のことから、胆管が構造変化することで、肝前駆細胞が障害部位に効率的に配置され再生が促進されている可能性が考えられる (Figure 15A)。

マウス成体肝臓に対するホールマウント免疫染色法の確立

ここまでに、インクによるマクロなスケールでの胆管の解析と、200 μm 切片による小スケールでの三次元的な免疫染色による解析を行なうことで、従来の組織切片を用いた 2 次元的な解析では明らかにされることのなかったダイナミックな胆管組織構造の変化を初めて捉えることに成功した。このようなマクロスコピックかつ 3 次元的な組織構造解析手法は、胆管のみならず、肝臓の他の組織、さらには他の固形臓器・組織の解析においてもきわめて有効だと考えられる。そこで、汎用性のある、マクロな臓器レベルでの免疫染色による解析法として、マウス肝臓のホールマウント免疫染色法の確立を行った。

肝組織は主に、上皮細胞である肝細胞からなるため、肝臓全体に上皮バリアが張り巡らされた状態であるといえる。肝臓に対するホールマウント染色は、胎児の肝臓では可能であるが、上皮バリアが成熟していると考えられる成体の臓器レベルにおいては報告がなく、困難であると考えられた。組織に対する抗体の浸透性が主要な問題点であると考えられる。電気泳動により浸透させる方法や、灌流により直接抗体を流し込む方法が、他の組織で報告されているが^(46, 47)、肝臓に適用された例はなく、また、これらには特殊な装置や大量の抗体が必要とされる。そこで本研究では、まず先に灌流により組織の透化処理を行ない、その後は、臓器を抗体の液に浸けるのみで、自然な浸透により反応させた。

肝臓を灌流により透化処理した後、CK19 に対する免疫染色を行なったところ、臓器の全体で胆管の樹状構造を高いシグナル／ノイズ比で染色することに成功した (Figure 17; 肝臓は

分葉構造をとるため、そのうち最も大きい葉である左葉を示した)。胆管の構造が、インクにより可視化されたものと同様に観察されたことは、この手法による大きな組織の変性がないことを示唆している。透化处理の方法としては、メタノールや界面活性剤による処理では良い結果が得られなかった。メルカプトエタノールを用いることで肝臓全体における高いシグナル／ノイズ比での染色が可能となった。

この手法が胆管以外の組織に対しても適用可能なことを示すために、交感神経の染色を試みた (Figure 18)。交感神経も、胆管と同様に肝臓内での詳細な形態は不明であったが、今回確立したホールマウント染色法によりその3次元構築が初めて明らかとなった。交感神経は門脈の周囲において、神経叢と考えられるネットワークを形成していたが、まばらに実質域へ進入している神経線維が観察された。

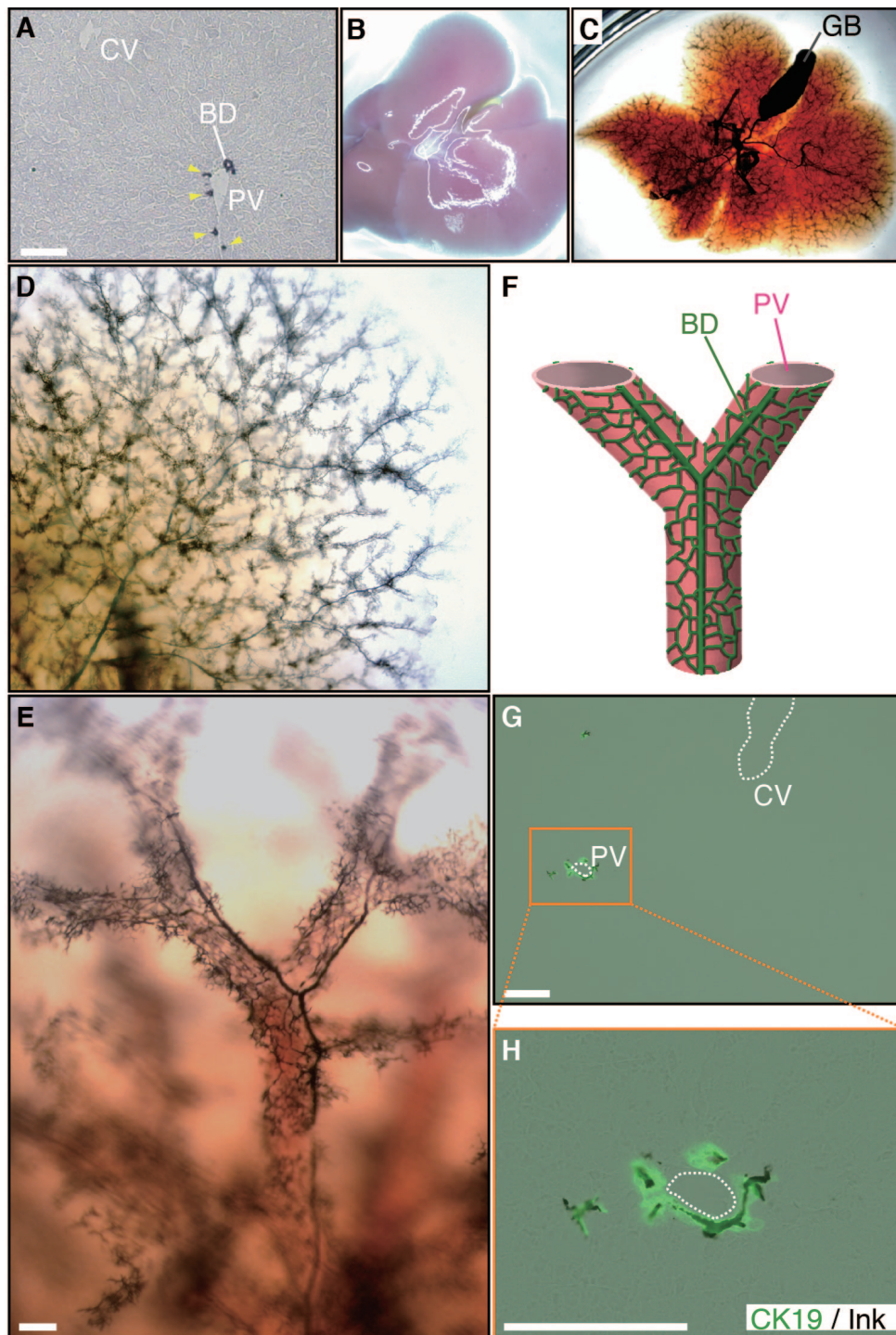


Figure 5. 新規可視化法により明らかとなった胆管の三次元構造

(A) 肝臓の組織切片における胆管上皮細胞マーカー CK19 に対する免疫染色 (紫)。正常肝において胆管は常に門脈に隣接して存在し、実質域や中心静脈の方には存在しない。

(B) 摘出した透明化処理前の肝臓。

(C-E) インク (黒) により可視化された胆管の三次元構造。

(F) 明らかとなった胆管の三次元構造の模式図。緑が胆管、ピンクが門脈を示している。

(G, H) インク (黒) を胆管に注入した肝臓の切片における CK19 に対する免疫染色 (緑)。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); BD, bile duct (胆管); GB, gall bladder (胆嚢); scale bars, 100 μ m。

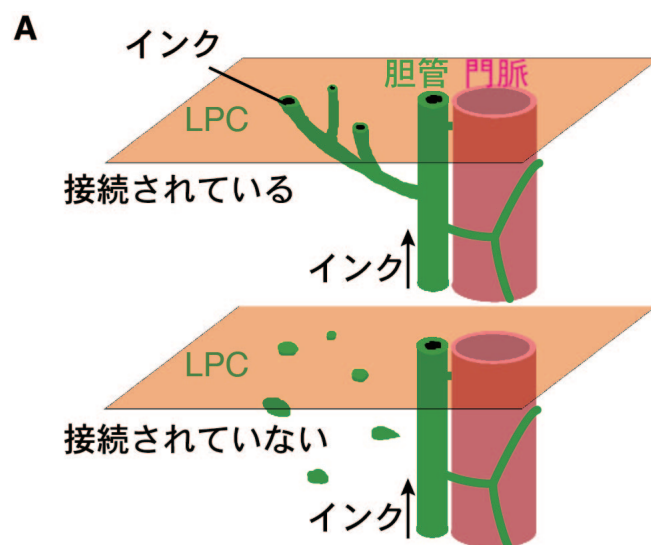
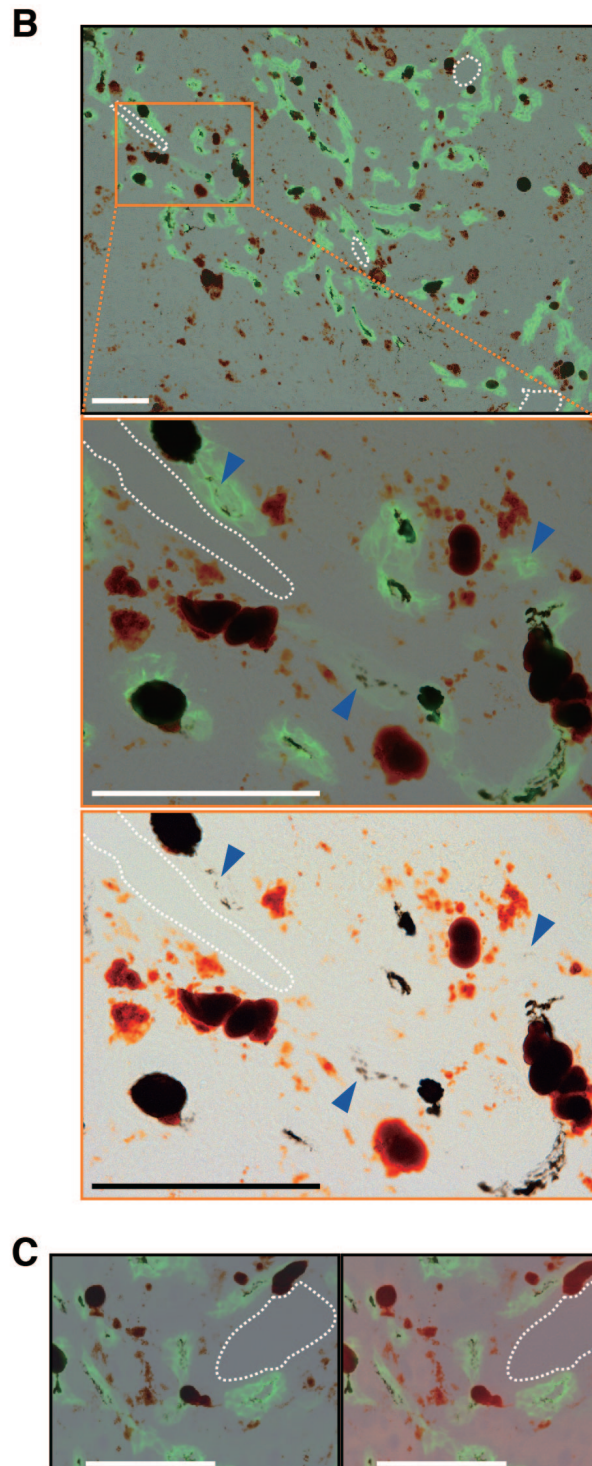


Figure 6. LPC の胆管への接続

(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へ流入する。LPC が、この胆管の樹状構造に接続されていた場合、インクは LPC とともに観察される (上段)。一方、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, C) 胆管にインク (黒) を注入した DDC モデル障害肝の切片における、CK19 に対する蛍光免疫染色 (緑)。

(B) 中段は上段のオレンジ枠の拡大。下段は中段の写真と同じ視野で、明視野像のみ表示。茶色の粒子は DDC モデルで蓄積するポルフィリン (C を参照)。CK19 陽性細胞とインクがともに存在している (矢頭)。

(C) 左右は同じ視野で、右にはポルフィリンの自家蛍光 (遠赤色用の蛍光フィルターで撮影、赤で表示) を重ねた。インクとポルフィリンが明確に区別される。

白の破線は門脈を示す。scale bars, 100 μm 。

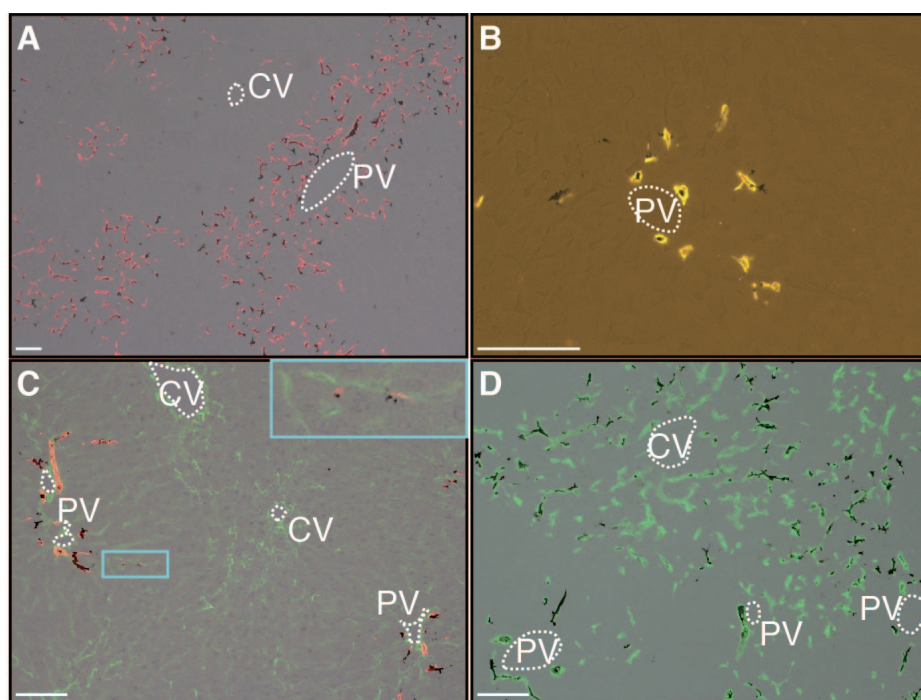


Figure 7. 各種障害肝における LPC の胆管への接続

(A–D) 胆管にインク (黒) を注入した各種障害肝の切片。

(A) CDE モデル障害肝。胆管上皮マーカー EpCAM 陽性細胞 (赤) とともにインクが観察される。

(B) CCl_4 頻回投与モデル障害肝。CK19 陽性細胞 (黄) とともにインクが観察される。

(C) TAA モデル障害肝。TAA を 4 週にわたり投与した。CK19 陽性細胞 (赤) とともにインクが観察される。CK19 陽性細胞集団が障害部位に溜まるコラーゲン繊維 (緑) の方へ広がっている。

(D) TAA モデル障害肝。TAA を 8 週にわたり投与した。CK19 陽性細胞 (緑) とともにインクが観察される。CK19 陽性細胞集団が中心静脈周囲まで存在している。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); scale bars, 100 μm 。

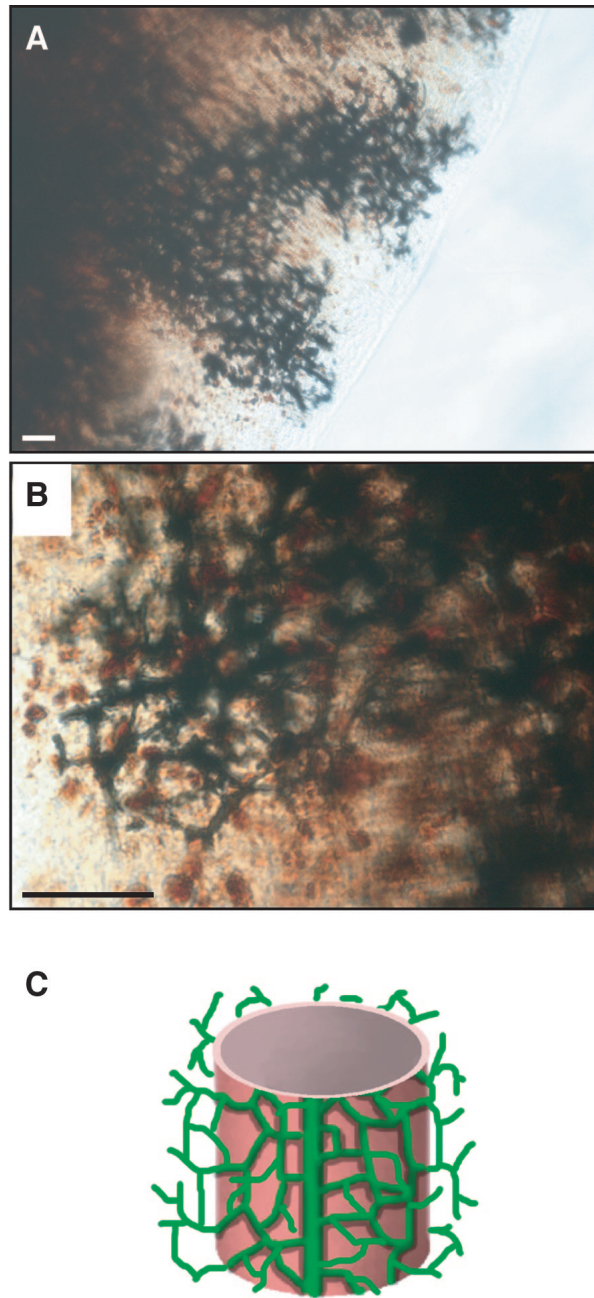


Figure 8. 障害肝における胆管のリモデリング

(A, B) 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。茶色の粒子はポルフィリン (Figure 6C を参照)。

(C) 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。

scale bars, 100 μm 。

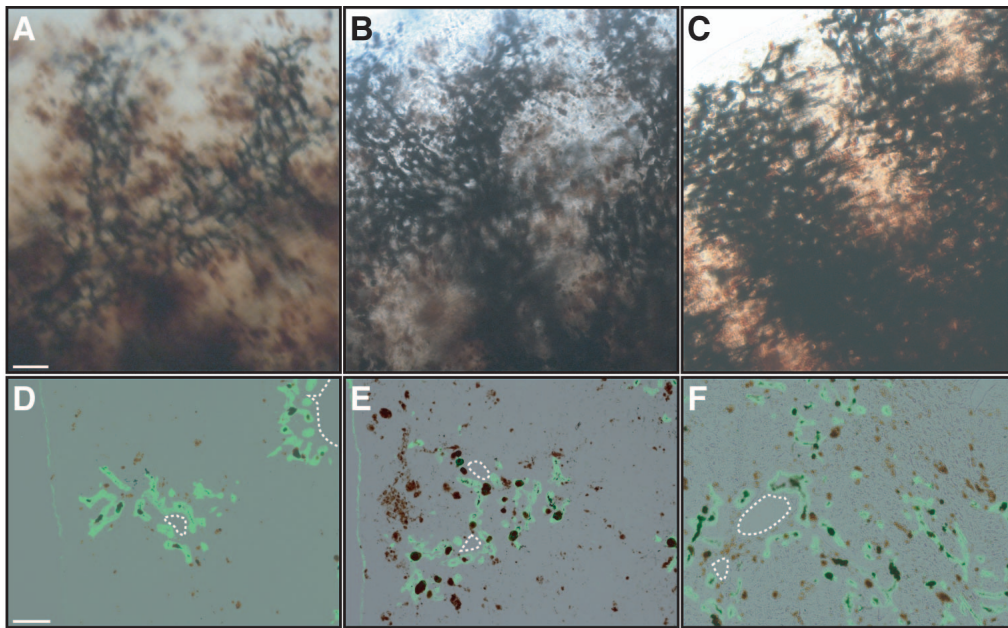


Figure 9. DDC モデル障害肝において変化する胆管の経時解析

(A–C) インク (黒) により可視化した DDC モデル障害肝における胆管の樹状構造。DDC 食餌を 3 週 (A) / 5 週 (B) / 8 週 (C) 与えた。

(D–F) 胆管にインクを注入した DDC モデル障害肝の切片における、CK19 (緑) に対する免疫染色。(D), (E), (F) の DDC 食餌投与期間は、それぞれ (A), (B), (C) に対応している。どの時期においても、CK19 陽性細胞とともにインクが観察される。

白の破線は門脈を示す。scale bars, 100 μ m。茶色の粒子はポルフィリン (Figure 6C を参照)。

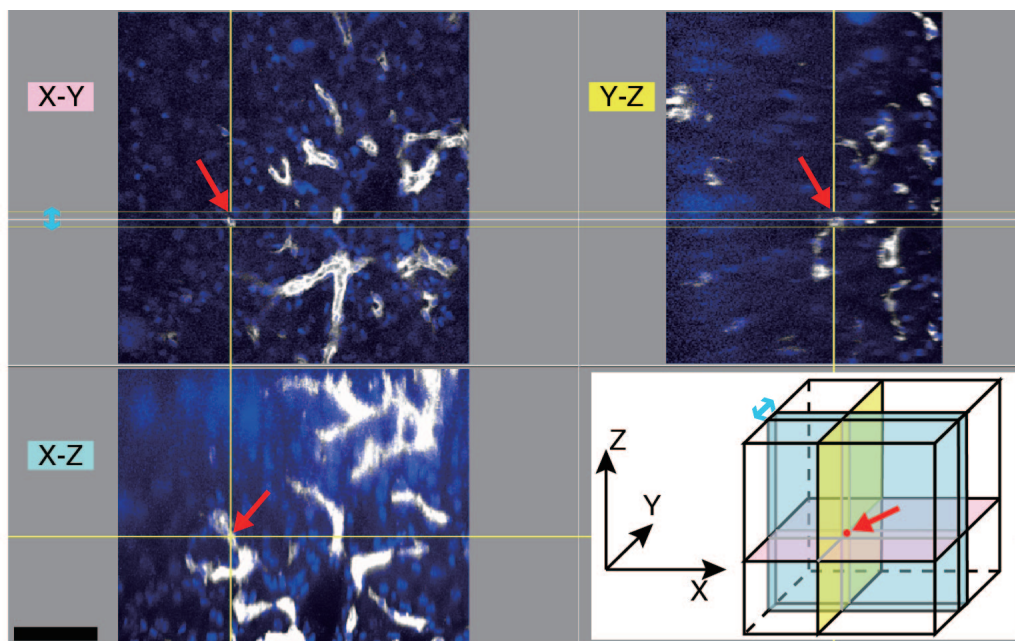


Figure 10. 200 μm 厚切片による、LPC の胆管への接続の確認

CDE モデル障害肝の 200 μm 厚切片における、CK19 に対する免疫染色 (白)。青は核染色。共焦点顕微鏡により撮影し、三次元画像構築した。右下の模式図に示したような断面図が各平面として示されている。X-Z 平面のみ、青の両矢印に示した厚みのある像を示している。赤矢印は 3 つの平面に共通の点を示している (模式図)。この点に存在する細胞は、X-Y 平面や X-Z 平面では、他の CK19 陽性細胞集団と隔離されて存在しているように観察されるが、X-Z 平面により、胆管と接続されていることが確認できる。

scale bar, 500 μm 。

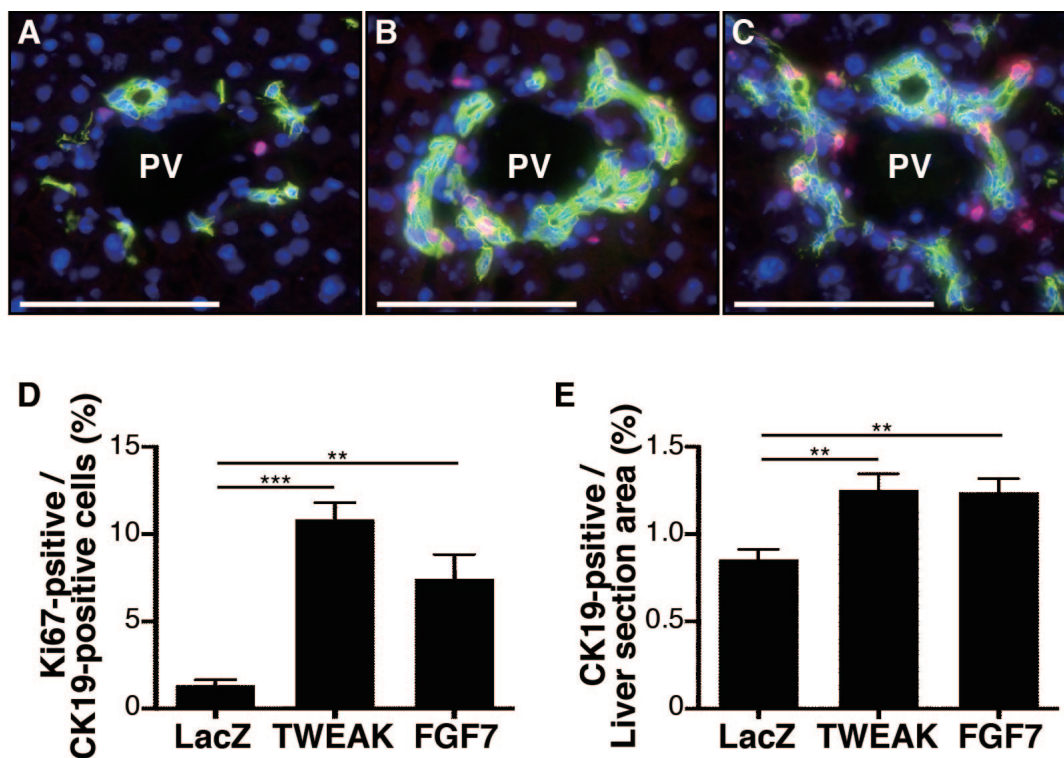


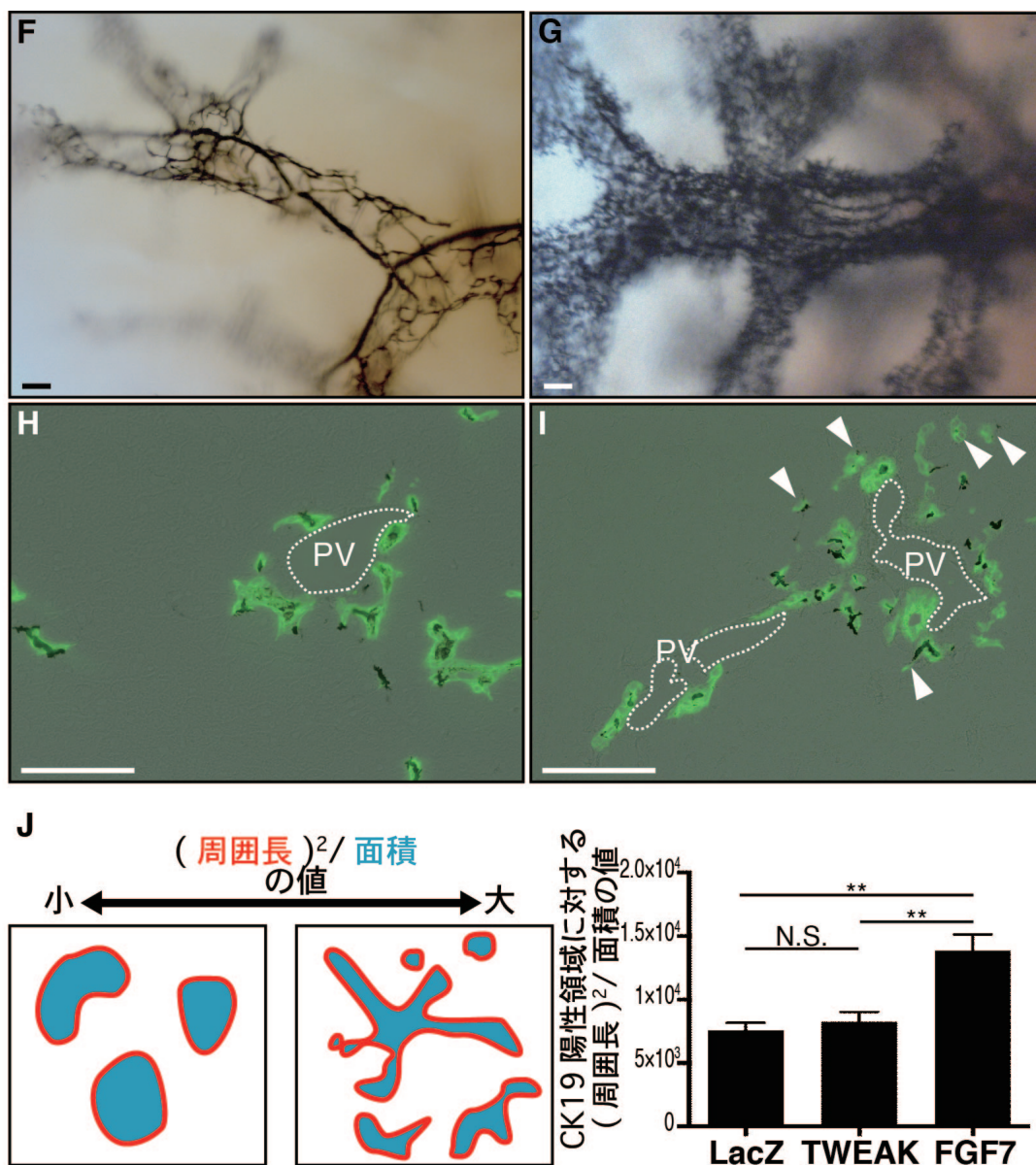
Figure 11. TWEAK と FGF7 が胆管の構造変化に与える効果

(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における、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) CK19 陽性細胞中の Ki67 陽性の細胞の割合。

(E) 切片に対する CK19 陽性領域の面積比率。

PV, portal vein (門脈); scale bars, 100 μ m; $n = 5$ mice for each group in (D, E); ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; error bars, SEM.



(F, G) 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。

(H, I) TWEAK (H)、または FGF7 (I) を HTVi 法により強制発現させた肝臓に対して、胆管にインク (黒) を注入したあと切片を作製し、CK19 に対して免疫染色 (緑) を行なった。

(J) (周囲長)²/面積の値を計算した。模式図は値の小さい場合と大きい場合に対する仮想的なパターンを示す。

PV, portal vein (門脈); scale bars, 100 μm; $n = 5$ mice for each group in (J); $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; N.S., 有意差なし; error bars, SEM.

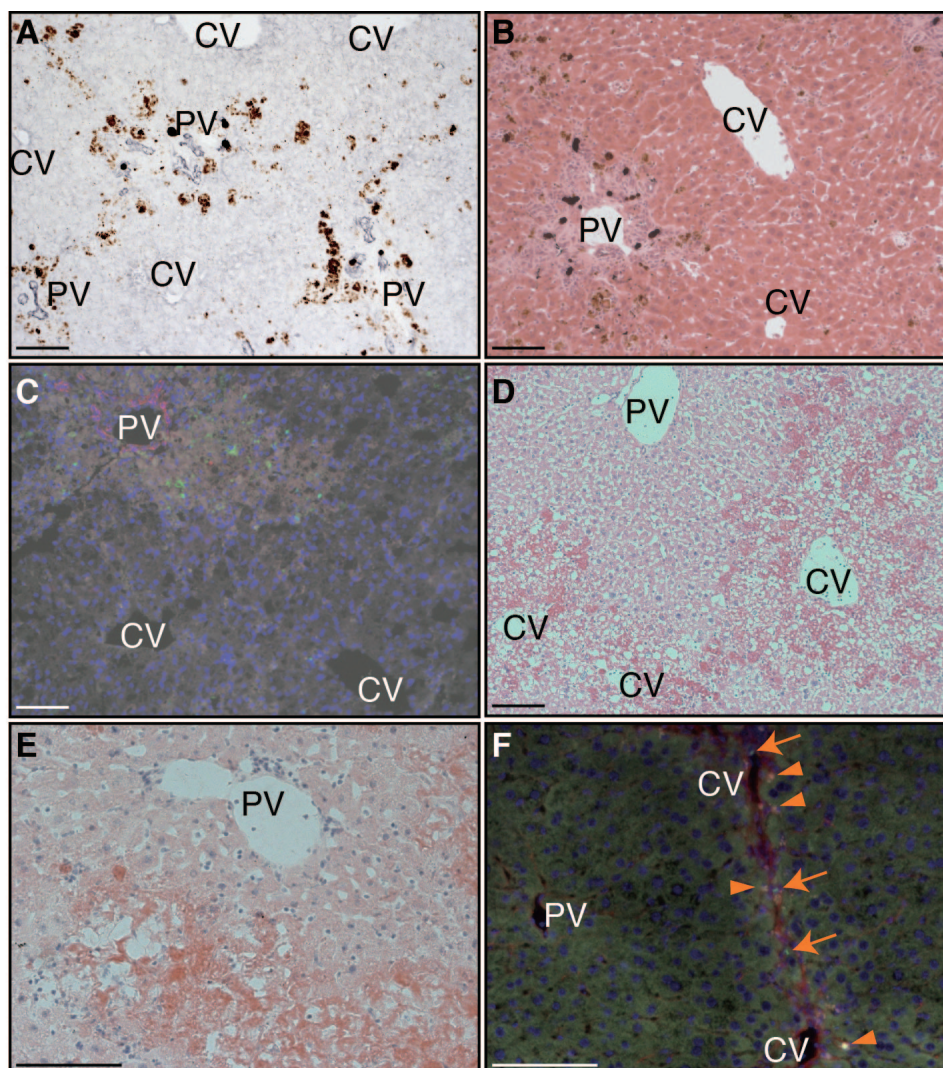


Figure 12. 各種障害モデルにおける障害パターン

(A, B) DDC モデル障害肝。CK19 に対する免疫染色 (A, 紫) と HE 染色 (B)。DDC 食餌投与期間は 3 週間。門脈周囲にポルフィリン (茶色) の蓄積と血球の集積が見られる。

(C) CDE モデル障害肝。CK19 (赤) と cleaved caspase-3 (緑) に対する免疫染色。青は核染色。障害期間は 1 週間。門脈周囲に障害が引き起こされている。

(D) CCl_4 単回投与による障害肝。HE 染色。中心静脈周りに壊死巣が見られる。

(E) TAA モデル障害肝。HE 染色。TAA の投与期間は 2 日間。中心静脈周りに壊死巣が見られる。

(F) TAA モデル障害肝。TUNEL 法による死細胞の染色 (緑) とコラーゲン繊維に対する免疫染色 (赤) と自家蛍光 (白)。青は核染色。TAA の投与期間は 1 週間。障害部位において繊維化が始まる。繊維の部分に死細胞が観察され (矢印)、自家蛍光の強い粒子が蓄積する (矢頭)。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); scale bars, 100 μm 。

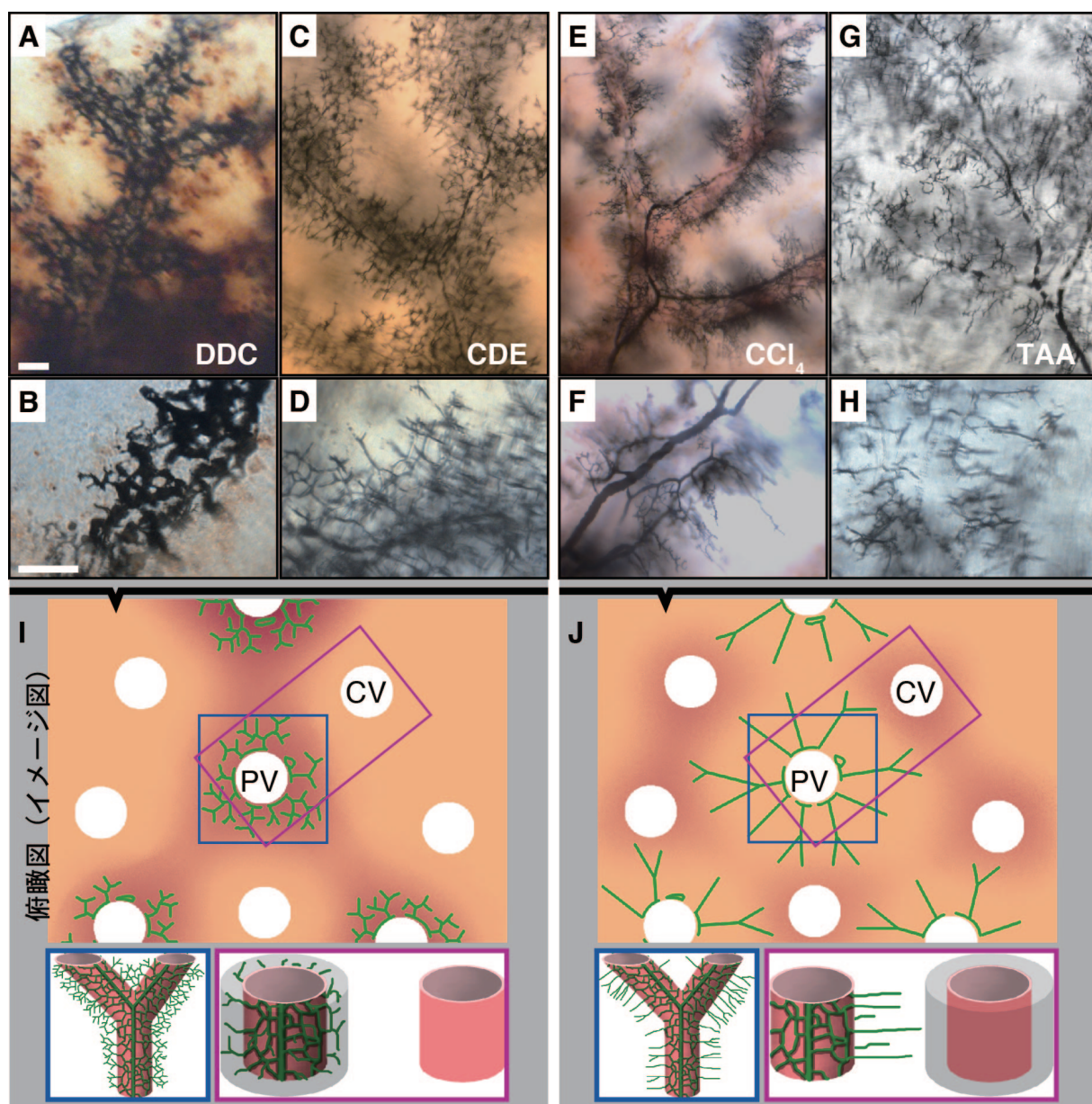


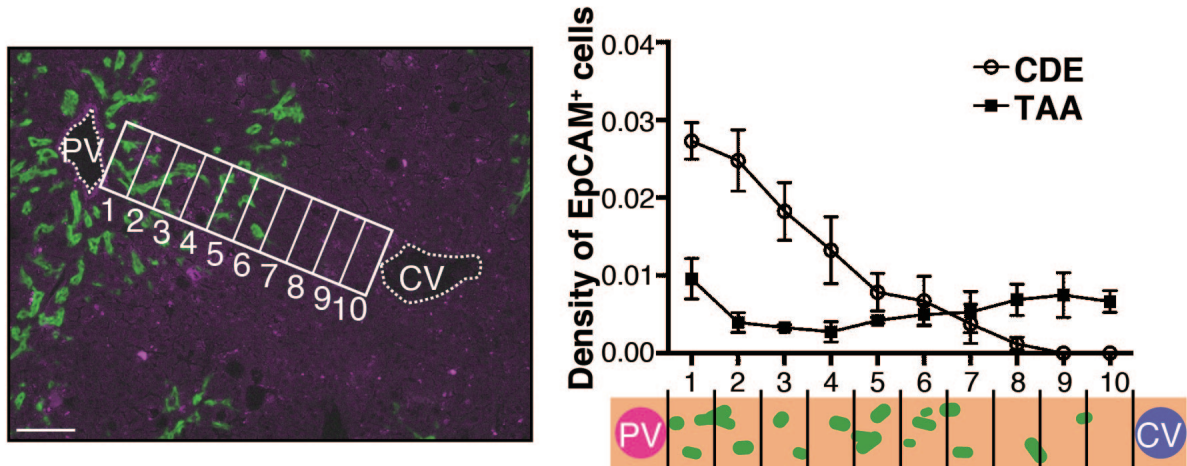
Figure 13. 異なる肝障害に応じた胆管の構造変化

(A-H) DDC モデル (A, B)/CDE モデル (C, D)/CCl₄ モデル (E, F)/TAA モデル (G, H) 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。障害の期間は、DDC モデルおよび CDE モデルは 3 週、CCl₄ モデルおよび TAA モデルは 4 週。(B, D, F, H) は高倍率の写真。

(I, J) 障害パターンと胆管の構造のモデル図。(I) は門脈周囲に障害が引き起こされた場合を示し、DDC モデル (A, B) および CDE モデル (C, D) が、このパターンに相当すると考えられる (Figure 12 を参照)。(J) は中心静脈周囲に障害が引き起こされた場合を示し、CCl₄ モデル (E, F) および TAA モデル (G, H) が、このパターンに相当すると考えられる (Figure 12 を参照)。上段は俯瞰図で、緑が胆管、赤褐色部分が障害部位を示している。下段左は門脈周りの胆管の枝の構造のモデル図 (上段の青枠に相当)。下段右は、門脈と中心静脈と胆管の枝の関係を示しており (上段の紫枠に相当)、灰色の部分は障害領域を示している。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); scale bars, 100 μ m.

K



(K) 門脈 (PV) - 中心静脈 (CV) 間の胆管上皮細胞マーカー EpCAM 陽性領域の分布の解析。左の写真は解析例として、CDE モデル障害肝の切片における EpCAM に対する免疫染色 (緑) を示している。マゼンタは組織の自家蛍光を示しており、自家蛍光のない部分を血管とした。門脈から中心静脈までの領域は、写真に示したように 1~10 の区域を設定した。グラフの X 軸は、この区域を示している。グラフは、各区域における EpCAM 領域の占める面積比率を元に、門脈から中心静脈までの EpCAM 陽性領域の分布を示しているが、1~10 の全ての区間の Y 軸の値の合計が、組織切片全体に対する EpCAM 陽性領域の面積比率になるように、標準化してある。CDE モデルの方が TAA モデルに比べ、組織切片全体に占める EpCAM 陽性領域の面積比率 (Y 軸の値の合計) は大きい、その分布は門脈域の方へ留まっている。TAA モデルでは、全体の EpCAM 陽性領域は小さいが、分布は中心静脈の方まで及んでいる。障害の期間は、CDE モデルが 3 週、TAA モデルが 8 週。

$n = 3 \text{ mice} \times 10 \text{ fields}$ for each group; error bars, SEM; scale bar, 100 μm .

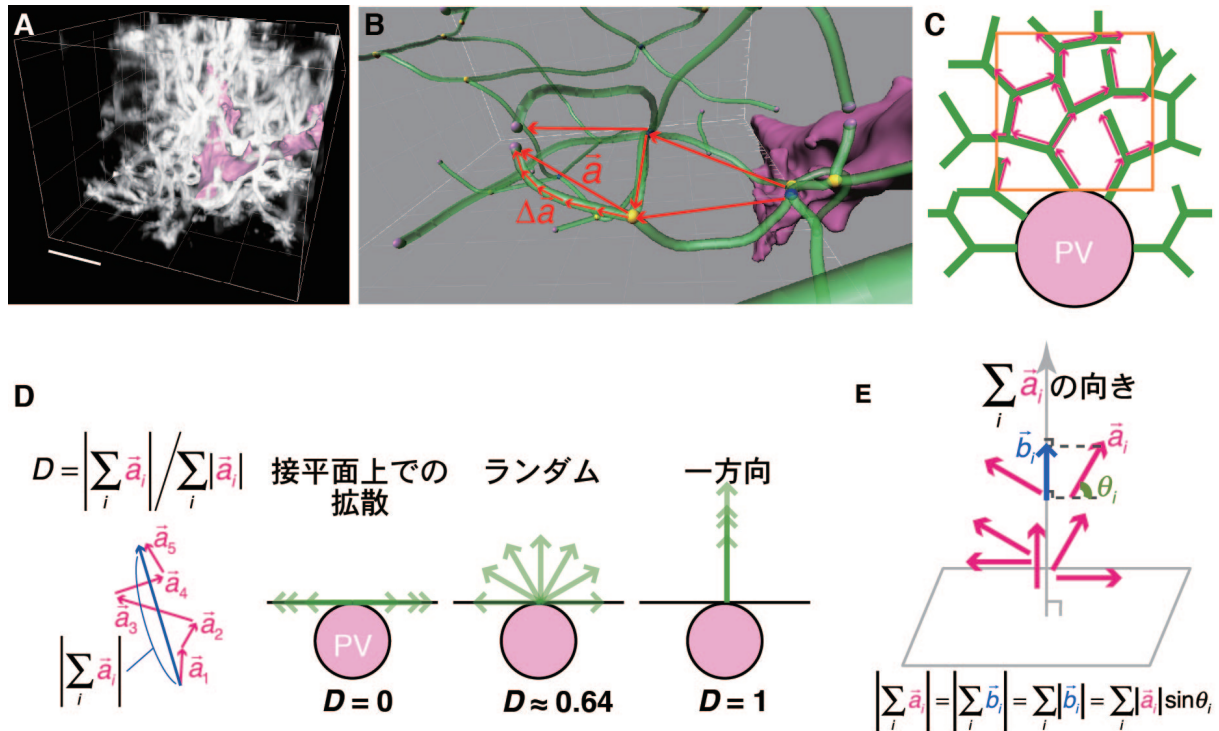


Figure 14. 胆管の枝の三次元的方向性の解析

(A) 胆管の枝の三次元画像構築の例。CDE モデルのサンプルが示されている。CK19 に対する免疫染色 (白) および、組織の自家蛍光を元に構築した門脈 (ピンク、材料と方法を参照)。

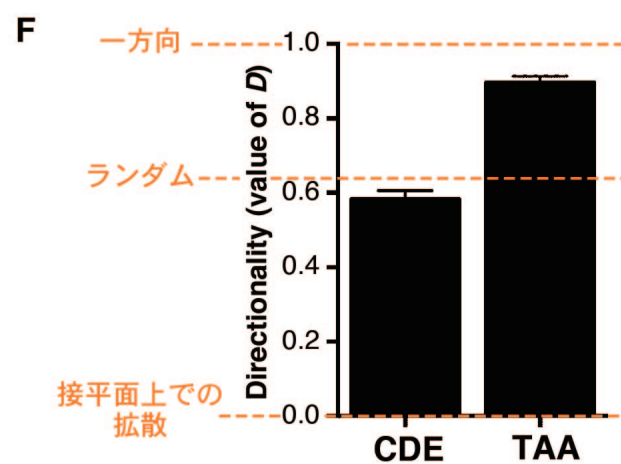
(B) 胆管の枝の骨格 (緑) とベクトル (赤) の抽出例の三次元画像。骨格に沿った微小なベクトルの合計は、始点から終点を結んだベクトルに等しい。

(C) 胆管の枝 (緑) からのベクトル (赤) の抽出方法の二次元的な模式図 (実際には三次元的に解析している)。オレンジの枠は ROI を示している (材料と方法を参照)。

(D) ベクトル集団の方向性の解析をするため、パラメーター D を設定した。この値は、ベクトル集団の向きが揃っているほど大きくなる。典型的なパターンの場合を模式図に示した。

(E) (D) においてランダムと表記したパターンに対する D の値を計算する際の補足図 (材料と方法を参照)。

PV, portal vein (門脈); scale bar, 100 μm 。



(F) 異なる障害パターンとして、CDE モデルと TAA モデルにおいて、パラメーター D を計算した。オレンジの破線は、(D) に示した各パターンに対する理論値。

PV, portal vein (門脈); scale bar, 100 μm ; $n = 3$ mice, total of 17 fields for each group; error bars, SEM。

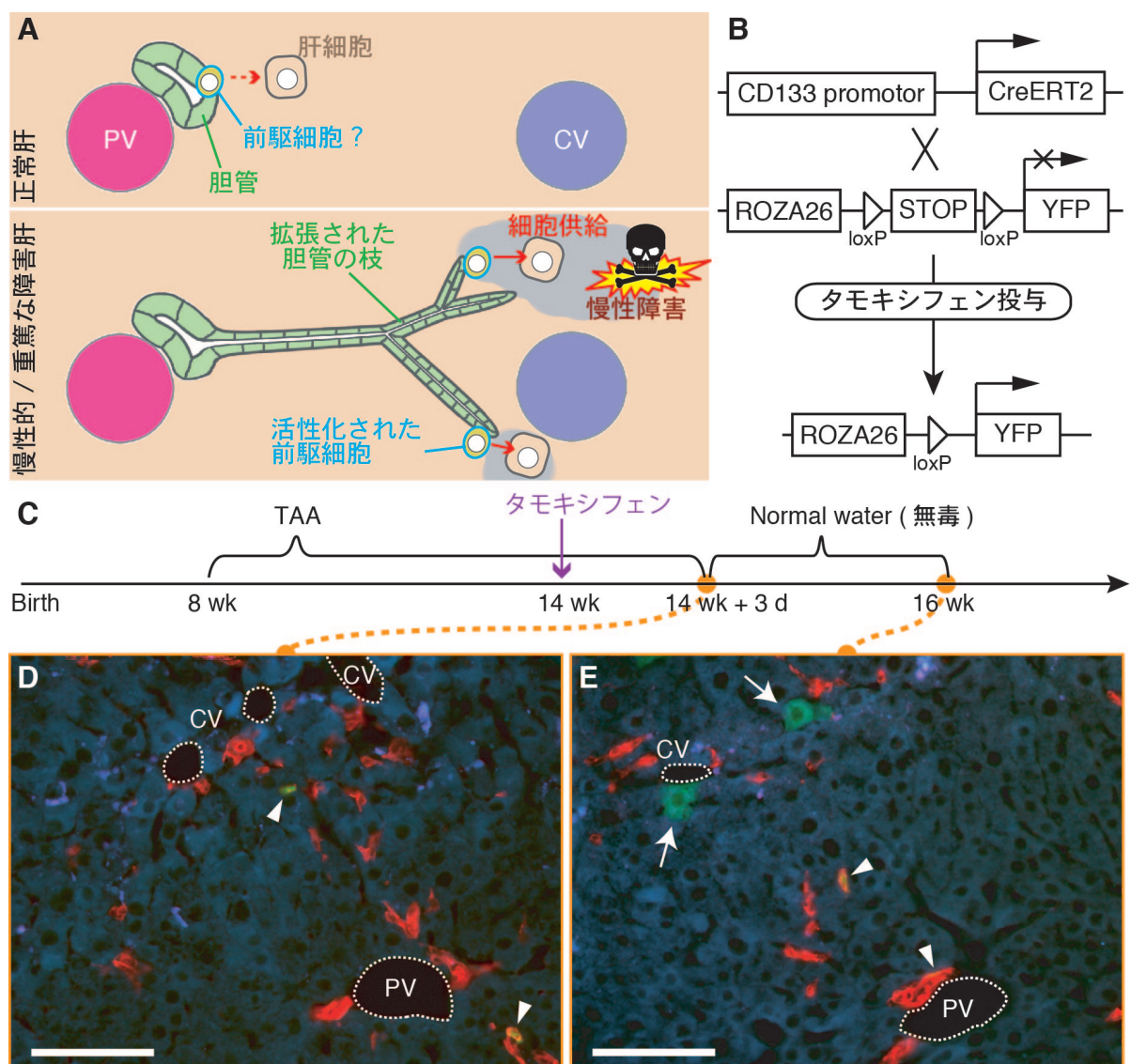


Figure 15. 胆管の構造変化による障害部位付近での前駆細胞からの細胞供給

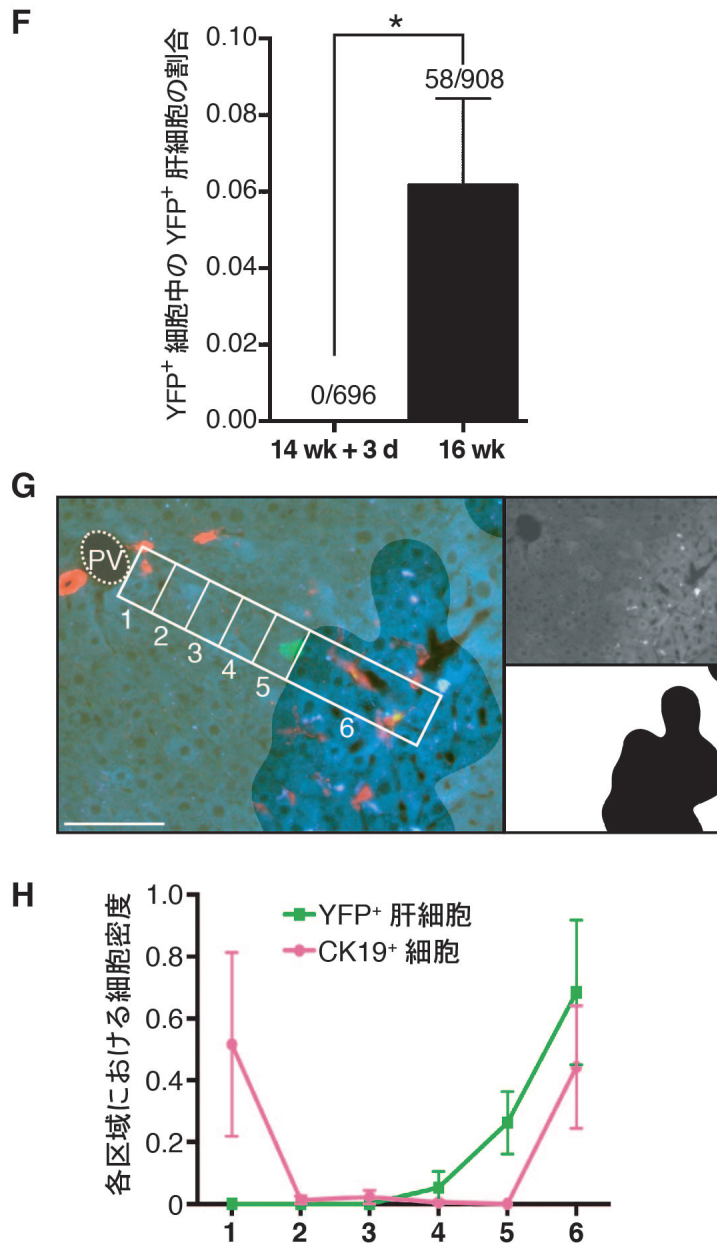
(A) 仮説モデル。慢性的／重篤な障害肝では、障害部位に胆管が伸びることで、胆管の中または隣に存在／出現した前駆細胞が障害部位付近に配置され、活性化し肝細胞に分化することで再生に働くことが考えられる。

(B) CD133 プロモーターを用いた細胞系譜解析の手法。タモキシフェン投与により、CD133 陽性細胞において、CreERT2 による組換え反応が誘導され、YFP が発現する。

(C) 細胞系譜解析の実験の流れ。横軸はマウスが生まれてからの時間軸。

(D, E) (C、オレンジ丸) に示した 2 つの時点でサンプリングした肝臓の切片。免疫染色により、CK19 (赤) と YFP (緑) を染色した。青は組織の自家蛍光。中心静脈周囲の障害部位に自家蛍光の高い粒子が蓄積する (Figure 12F)。矢頭は YFP 陽性 / CK19 陽性細胞を示し、矢印は YFP 陽性 / CK19 陰性細胞を示している。YFP 陽性 / CK19 陰性細胞は、パルス標識された YFP 陽性 / CK19 陽性細胞から分化して生じた肝細胞だと考えられる。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); scale bars, 100 μ m。



(F) 標識された YFP 陽性細胞のうち、CK19 陰性である肝細胞の割合を、(D, E) に対応する 2 つの時点 (C、オレンジ丸) で比較した。n = 4 and 5, respectively; * $P < 0.05$; error bars, SEM。

(G, H) (E) と同様なサンプルにおける、CK19 陽性領域および YFP 陽性肝細胞の分布の解析。

(G) 左は (E) と同様の別視野の写真。右上が自家蛍光のみの写真で、右下が自家蛍光の粒子の多い領域を障害部位として解析ソフト ImageJ により構築した画像。左の画像には、右下の画像もレイヤーとして重ねてある。門脈 (PV) - 障害部位の間の領域を左に示したような区域に分割した。

(H) グラフの X 軸は、(G) に示した 1-6 の区域に対応している。グラフは、これらの区域に対して、CK19 陽性領域 (細胞集団) の分布を面積比率に基づいて、YFP 陽性肝細胞の分布を数に基づいて計算し、Y 軸の値の合計が 1 となるように標準化してある。n = 5 mice; error bars, SEM; scale bar, 100 μm 。

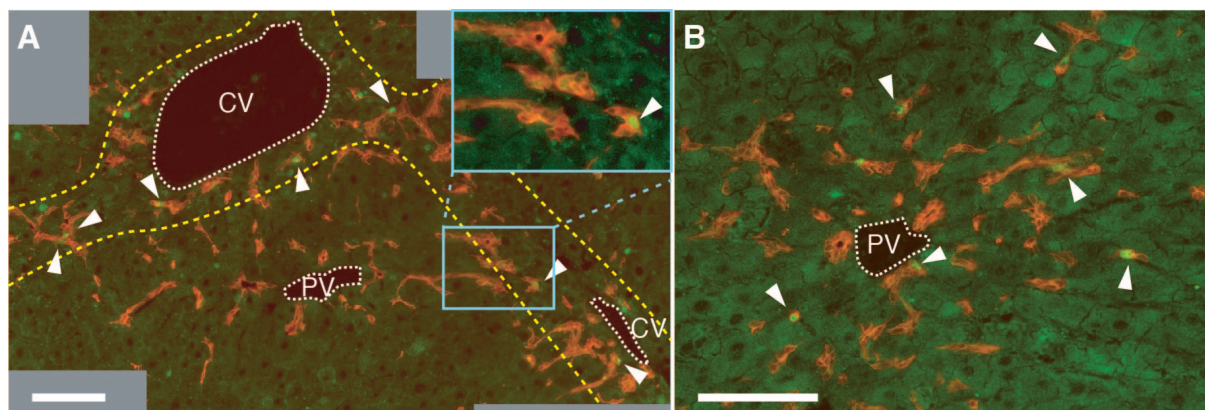


Figure 16. 増生した胆管中の Lgr5 陽性 /CK19 陽性細胞

TAA モデル (A) と CDE モデル (B) 障害肝の切片において、免疫染色により CK19(赤) と Lgr5(緑) を染色した。

(A) 黄色の破線は障害部位のおよその輪郭を示している。TAA モデルでは、伸びた胆管の障害部位の方で Lgr5 陽性 /CK19 陽性細胞が観察された (矢頭)。

(B) CDE モデルでは、Lgr5 陽性 /CK19 陽性細胞の分布に大きな偏りは見られなかった。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); scale bars, 100 μ m。

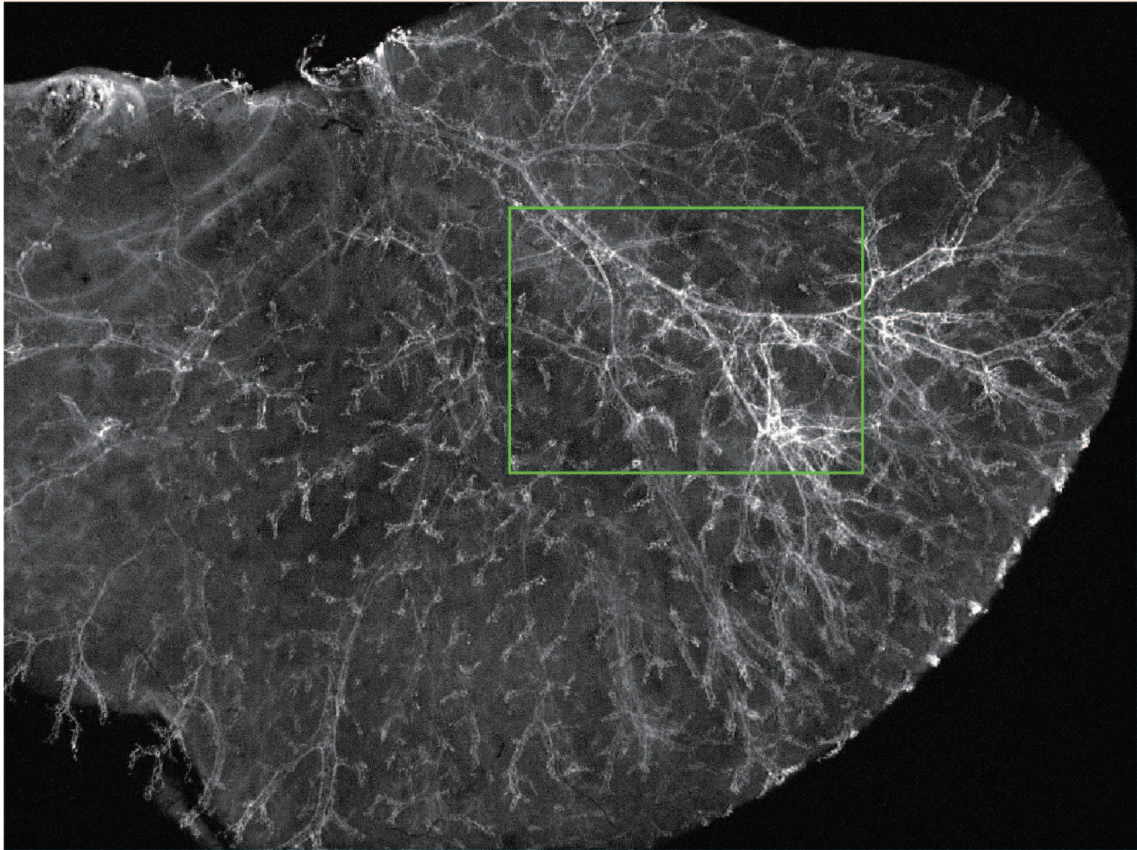
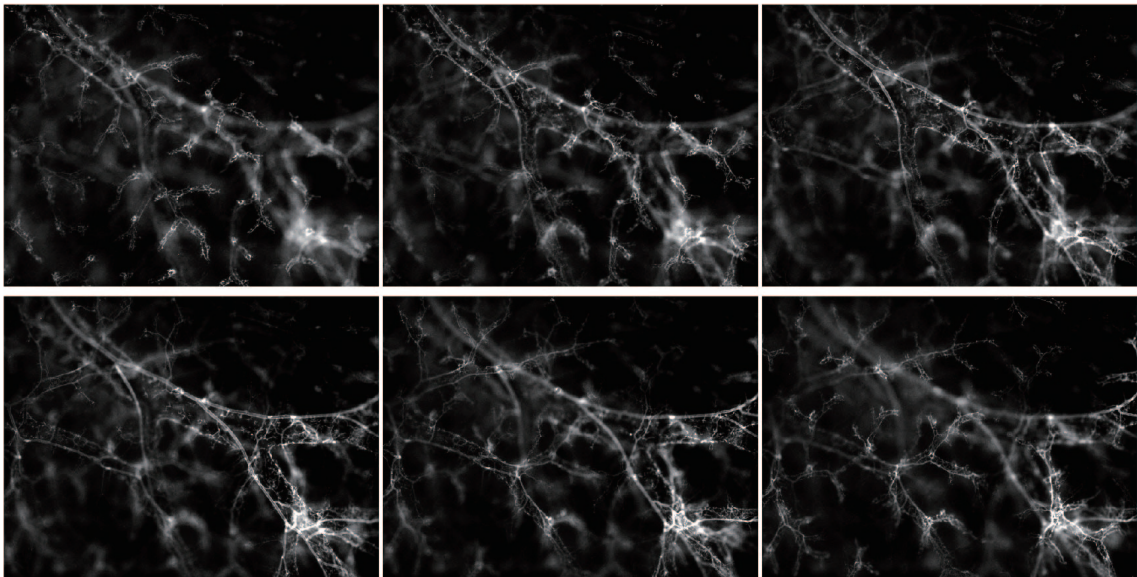
A**B**

Figure 17. ホールマウント免疫染色による胆管の観察

CK19 に対するホールマウント免疫染色。ズーム顕微鏡 (Zeiss) により撮影。

(A) 左葉の写真。全体にわたって染色されている。

(B) (A) の緑枠の部分において Z 軸方向に焦点を動かして撮影した。上段左から下段右の順番に焦点が深くなっている。細部まで染色されており、インクによって観察されたものと同様に太い胆管と細かい胆管が観察される。

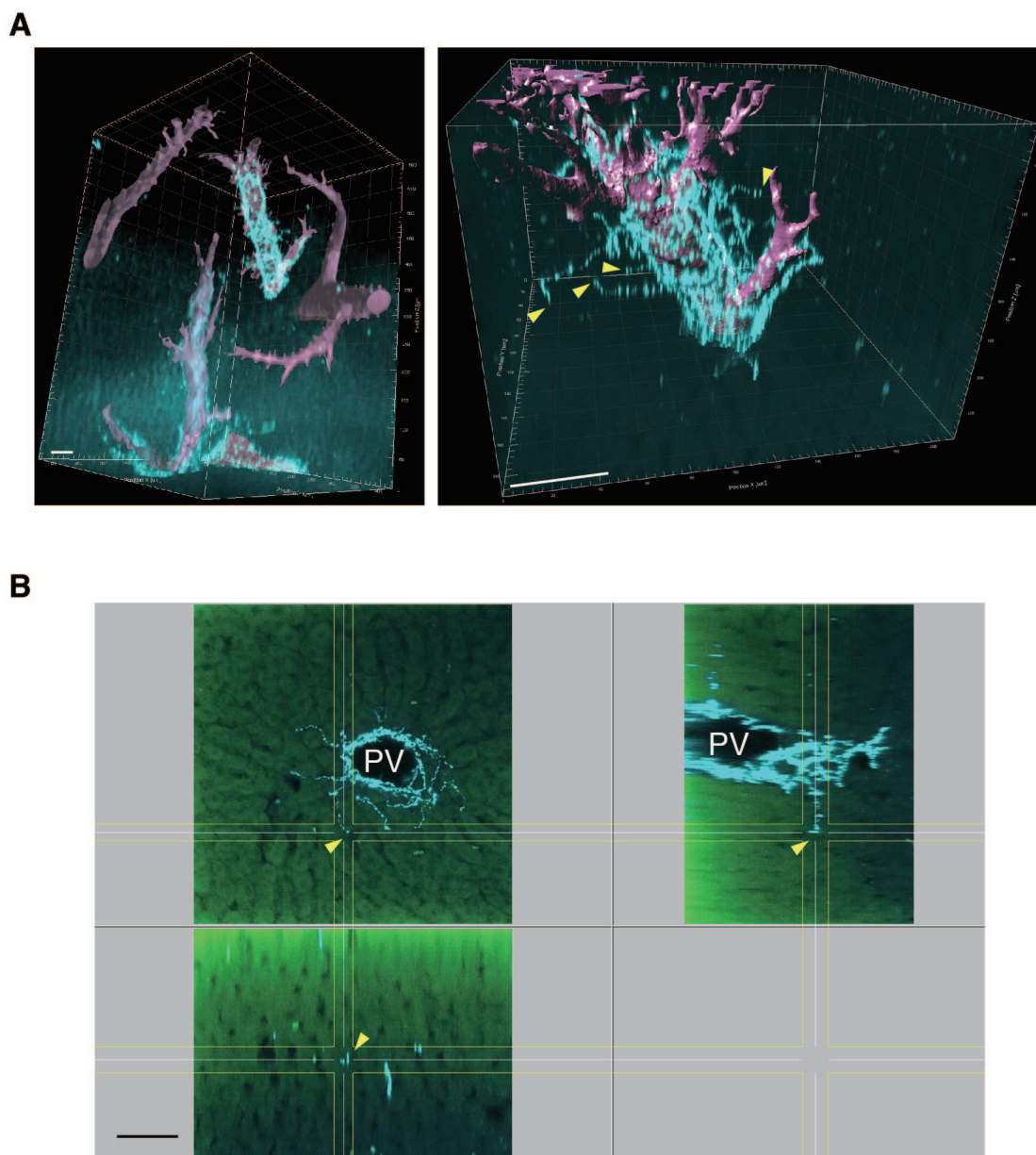


Figure 18. 肝臓の神経に対するホールマウント免疫染色

正常肝において、交感神経のマーカー tyrosine hydroxylase (TH) に対するホールマウント免疫染色（水色）を行なった。

(A) 左は、30 倍レンズ (UPLSAPO30×S; Olympus) で撮影。右は、60 倍レンズ (UPLSAPO30×S; Olympus) で撮影。ピンクは血管。交感神経の繊維は門脈周囲で網状構造を形成している。低頻度で実質域へ侵入している線維があり、これらの末端を矢頭で示した。

(B) (A) の右写真の断面。およそ 20 μm の厚み（黄色線の幅）をもった断面を示している。緑は組織の自家蛍光で、肝細胞が並んでいるのが分かる。神経繊維の末端が実質域に存在しているのが観察される（矢頭）。

PV, portal vein（門脈）; scale bars, 40 μm 。

第4章 考察

新規可視化法による肝組織の解析

本研究では、胆管組織を解析するため、複数の手法を確立した：すなわち、インクの注入と組織の透明化による胆管樹状構造の可視化、インク注入後の組織切片における免疫染色による脈管としての接続の解析、および、200 μm 切片における免疫染色による部分的な三次元画像構築、である。これらの手法を組み合わせることで、マウス正常肝における胆管樹状構造の詳細な三次元的構造を初めて明らかとし、さらに、これまで知られていなかった肝障害に対する胆管の大きな構造変化を見いだした。

正常肝の組織切片において、門脈周囲に明確な管腔構造を示さない胆管上皮細胞も観察されるが (Figure 5A、矢頭)、これらの存在や実体は深く追求されてこなかった。これらは、本研究の三次元的観察により同定された、門脈周囲に網状に張り巡らされた微細な胆管に対応していると推察される (Figure 5F)。この構造は、門脈に並走する太い胆管の管と明白に区別されるものであり、門脈の分岐とは別次元の細かい分岐構造を有している。胆管の不均質で複雑な構造は、胆管上皮細胞およびその周囲の肝細胞に遺伝子発現プロファイルの多様性があるという報告⁽⁴⁸⁾と関連している可能性がある。樹脂や造影剤を用いた手法も含め^(31, 32)、これまでの解析法では解像度が低く、胆管の2種類の構造を区別することが出来なかった。そのため、古典的な組織学においては、門脈に並走する太い胆管のみが着目され、細かい分岐構造は観察されてこなかった。インクによる可視化法は、複雑な胆管の樹状構造の詳細を簡便に解析することを可能にする。

インクによる可視化法と200 μm 厚の組織切片による部分的な三次元画像構築は相互補完的である。前者は臓器レベルで胆管のマクロな樹状構造を詳細に可視化することができるが、定量的な解析には適していない。一方、後者は小スケールの解析で、胆管樹状構造の一部の枝を定量的に解析することが出来る。加えて、前者は脈管としての胆管の流路を可視化しているのに対し、後者は上皮細胞からなる組織構造を、そこに発現するマーカー分子に対する免疫染色により可視化している。こういった異なるアプローチを組み合わせることで、胆管の形態や動態に関する様々な側面を明らかにすることが出来ると考えられる。

さらに、本研究では成体肝臓におけるホールマウント免疫染色法を確立した。インクによ

る可視化法は最短で 2 日で完了するのに対し、この手法は 2-3 週間を要するが、臓器レベルのマクロな組織構造を解析可能であり、さらに胆管以外の組織も解析可能である。この手法により、神経繊維の形態も明らかとなった (Figure 18)。まばらに、実質域へ進入する繊維が観察されたが、この頻度は低く、胆管や肝細胞索の繰り返し構造よりもかなり低い密度で観察された。すなわち、門脈や胆管、肝細胞の組織構造だけでは一見、一様に思われる構造単位であっても、神経繊維の存在する部分とそうでない部分が存在している。これらの神経繊維の末端に特殊な細胞が存在する可能性も考えられる。また今後は、胆管や神経、血管、間葉系細胞集団、肝細胞索を含む三次元的組織構造について、形態だけでなく遺伝子発現プロファイルによる組織の不均一性の解明も期待される。例えば、胆管は樹状構造のうち、肝門部（血管が肝臓に入ってくる部位）付近の一部にのみ、特殊な遺伝子発現パターンを示す細胞集団が存在することが報告されている⁽⁴⁹⁾。こういった不均一性の全体像を捉えるには、ホールマウントによる、マクロなスケールでの遺伝子発現パターンの解析が必要である。また、TAA モデル障害肝においては、胆管が障害部位へ伸びることを明らかにしてきたが、神経繊維も中心静脈周囲の障害部位へ到達している様子を組織切片において観察しており (Figure 19)、このときの胆管と神経の関係についての三次元的解析も今後の課題である。神経は、グリコーゲンの合成や分解といった代謝機能の制御だけでなく、再生や免疫反応とも関与する可能性がある⁽⁵⁰⁻⁵⁴⁾。長期間に及ぶ TAA の投与は、障害部位の肝繊維化から肝癌へとつながるが^(55,56)、最近、精巣においては末梢神経と癌の増悪化の関係が報告されており⁽⁵⁷⁾、胆管増生と神経については、炎症や再生、繊維化、肝癌との関連の有無も興味深い。

肝障害に応答した胆管樹状構造のリモデリング

障害肝において、LPC は実質域に存在し、特殊な形態を示すことから、胆管上皮細胞とは関連してはいるものの、異なる細胞集団であると解釈されてきた^(13,58)。本研究により、LPC は胆管上皮細胞とともに連続した脈管構造を形成しており、両者は三次元的な組織学レベルでは区別されないものであるということが明らかとなった。一方、これらの連続した細胞集団の中には、コロニー形成能や分化能といった機能面において、異なる細胞集団が存在していると考えられ、そういった細胞の機能面と組織構造との関連も興味深い。また、障害に応答して拡張した胆管は全て元から存在した胆管上皮細胞から由来するとは限らない。理論的に

は、胆管に隣接する細胞が連続的に次々と胆管の細胞に変化する可能性がある。すなわち、胆管上皮細胞の増殖に加え、ヘリング管の部分に存在する幹細胞のような細胞が増殖・分化する可能性や、肝細胞が分化転換する可能性が考えられる。近年、肝障害の種類によっては肝細胞が胆管上皮細胞マーカー陽性の細胞に分化転換／脱分化し、LPC の集団に寄与するという報告もなされている⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾。なお、本研究により、胆管が連続した構造物として変化することが明らかとなったため、肝細胞から胆管上皮細胞マーカー陽性の細胞への分化転換といった反応も胆管に隣接した部位に限定されることが示された。これに関して、胆管に隣接して存在する肝細胞だけが、胆管上皮細胞様に分化転換することのできる特殊な能力をもつ細胞であるという可能性や、胆管やヘリング管の部分においてのみ、肝細胞の分化転換を誘導するようなシグナルが働く可能性が考えられる。

本研究では新規可視化法により、FGF7 と TWEAK が胆管上皮に対して異なる作用をもつことを明らかにした。FGF7 は胆管の分岐を誘導することが示唆された。FGF ファミリーの分子は、様々な組織の発生において、形態形成を制御することが知られている⁽⁶²⁾。中でも FGF10 は、FGF7 と共通の受容体である FGFR2b に結合するが、肺の発生において、分岐構造の形成に働くことが報告されている⁽⁶³⁾。また、FGF7 と FGF10 は涙腺や顎下腺の分岐形成を誘導する際に、標的組織の細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンへの結合性の違いにより、組織に対して異なる濃度勾配のパターンで作用することで、異なる分岐パターンを誘導することが報告されている⁽⁶⁴⁾。このように、FGF7 は組織に結合する濃度勾配のパターンにより形態形成を制御する可能性がある。一方で、FGF7 または TWEAK を強制発現させた肝臓において、胆管の細胞を観察すると、FGF7 強制発現においてのみ、仮足を伸ばしたような形態を示す細胞が多数観察されることから、これらの因子の作用の違いは、組織に作用する濃度勾配の違いによるものではなく、例えば、細胞骨格などの制御の違いによることも考えられる。すなわち、細胞内シグナルのレベルで異なる作用を及ぼす可能性がある。FGF7 や TWEAK が胆管上皮細胞に作用するときの細胞内のシグナル経路は未だ不明であり、更なる解析が必要である。特に TWEAK は、作用する細胞種や組織の環境によって、アポトーシス・分化・細胞増殖の誘導など多様な働きを示すことが知られており、nuclear factor κ B (NF- κ B) や mitogen-activated protein kinase (MAPK)、extracellular signal-regulated kinase、

c-Jun N-terminal kinase (JNK)、phosphoinositide 3-kinase/AKT といった複数の経路に関与することが報告されている⁽⁶⁵⁾。本研究において、TWEAK は胆管上皮細胞に対しては増殖に働くことが確認されたが、さらに他の作用を及ぼしていることも考えられる。FGF シグナルは、MAPK や AKT、signal transducer and activator of transcription (STAT)、phospholipase C γ (PLC γ)、JNK といった経路に関与することが知られているため⁽⁶⁶⁾、TWEAK と FGF7 は一部共通する経路を活性化する可能性と、異なる経路を活性化する可能性がある。また、TWEAK の受容体である fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) は、Epidermal growth factor (EGF) や FGF1、FGF2、Interferon- γ 、Interleukin-1 β を含めた多数の因子により発現が誘導されることが報告されている⁽⁶⁵⁾。このことから、FGF7 が Fn14 の発現上昇を誘導する可能性も考えられたが、当研究室の先行研究 (高瀬ら、未発表) では、FGF7 を強制発現させた肝臓において、Fn14 の発現上昇は認められなかった。TWEAK と FGF7 が異なる作用を示す機構と、肝障害時の両者の相互関係の解明は今後の課題である。また、各種障害モデルの間における、これらの因子の働き方の差異の有無も興味深い。

肝臓は障害に応答し、異なる効果をもつ複数のシグナル経路を活性化し、組み合わせることで、胆管樹状構造の顕著なリモデリングを誘導することが考えられる。今後、胆管の構造変化における細胞動態やそのメカニズムについて、細胞の増殖や移動性だけでなく、分岐形成や分裂軸の方向決定といった形態形成に関する側面にも着目していく必要があると思われる。また将来的に、本研究のような固定された時点におけるマクロな三次元的解析に加え、ライブイメージングによる細胞レベルの経時解析などを組み合わせることで、胆管の動的なリモデリング過程が明かされることを期待している。

組織切片上で観察される胆管増生は無秩序に見えるが、本研究の新規可視化法は、この反応の三次元的な特徴を捉えることを可能にした。これにより、増生した胆管の枝は、障害部位での密度が高くなるような指向性をもった構造をとることが明らかとなった (Figures 13I, 13J)。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 の一部からの肝細胞の供給を確認した。組織幹細胞のソースあるいはニッチとしては、小腸の陰窩がよく知られる⁽⁶⁷⁾。胆管において、活性化した肝前駆細胞のマーカーとして報告された Lgr5 は、小腸の陰窩に存在する幹細胞のマーカーとして知られており、総胆管は小腸の陰窩と接続されていることから、肝臓における胆管と、小腸における陰窩の類似性が提唱されている^(43, 44) (Figure 20)。このような知見と本研究の結果から、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である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 15A)。

肝障害の程度がさほど重篤でない場合には、障害を受けなかった肝細胞による代償性の再生が十分に起こるため、肝前駆細胞による再生が僅かしか起こらないと考えられる^(16, 68, 69)。一方、より重篤な肝障害モデルでは、胆管細胞／肝前駆細胞からの顕著な寄与が報告されており^(16, 69, 70)、その寄与の程度は障害の重篤度に相関することが指摘されている。これらの点で、肝前駆細胞による再生が、局所的に障害がより重篤化した部分でのみ重要となる可能性が考えられ、胆管の構造変化はこういった部分への肝前駆細胞の配置につながる可能性がある (Figure 15A)。

本研究により、肝臓は障害の強さや部位・パターンに応じて胆管の構造を劇的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。本研究の成果は、多様なストレス環境に対する組織応答の理解を進展させるものである。

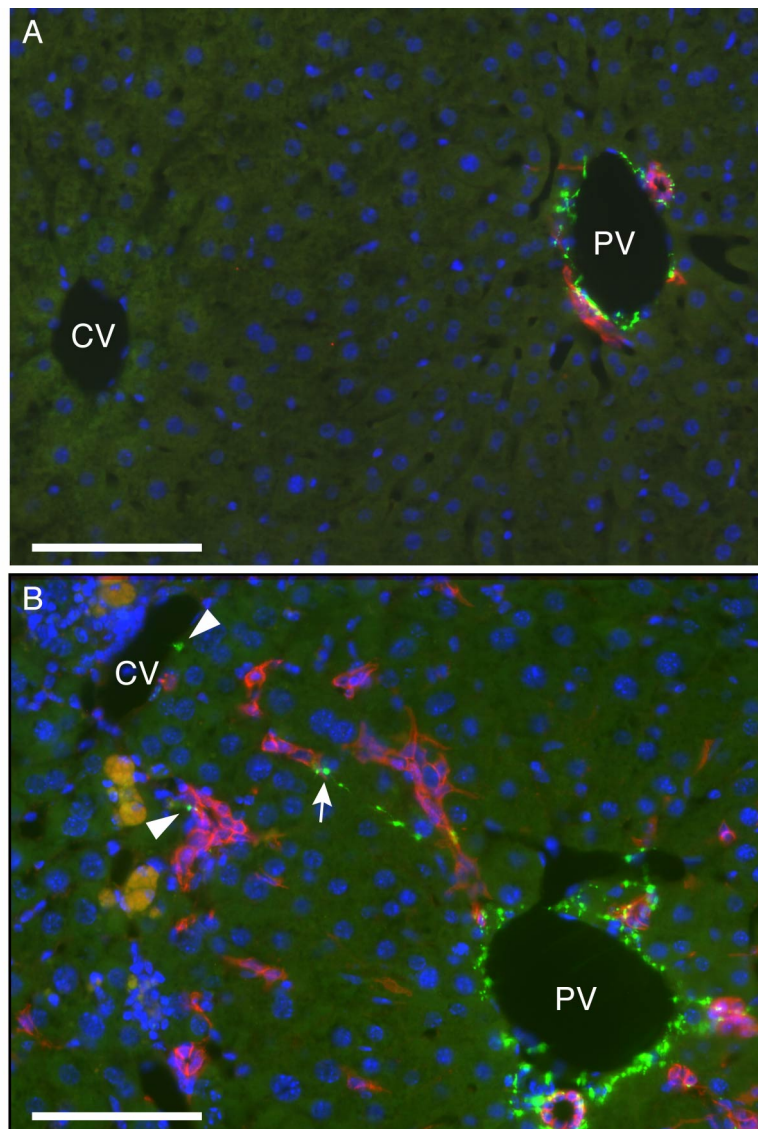


Figure 19. TAA モデル障害肝では、胆管だけでなく神経繊維も障害部位へ到達している

正常肝 (A) および TAA モデル障害肝 (B) の組織切片に対して、免疫染色により TH (緑) および EpCAM (赤) を染色した。門脈から 100 μm 以上離れた位置 (矢印) および障害部位 (矢頭) へ到達した神経繊維が観察される。

PV, portal vein (門脈); CV, central vein (中心静脈); scale bar, 100 μm 。

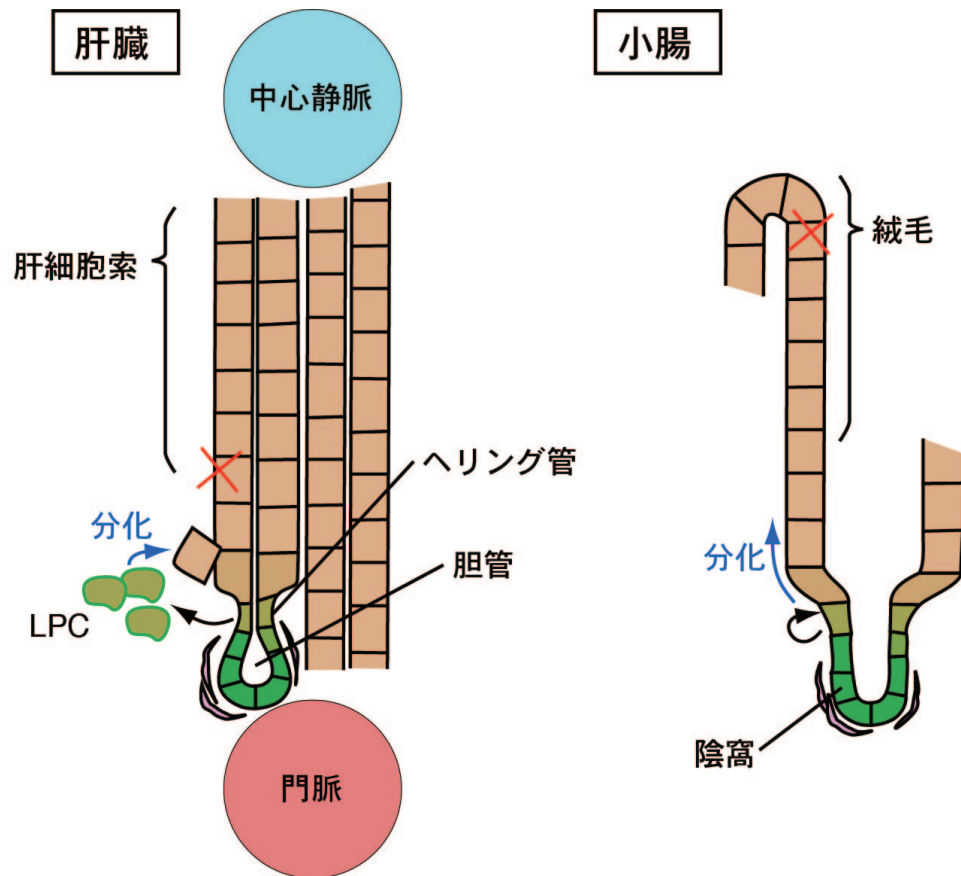


Figure 20. 肝臓における胆管と、小腸における陰窩

肝臓の胆管は肝細胞索に繋がっており、小腸の陰窩は絨毛に繋がっている。これらの構造が、それぞれの組織において、幹／前駆細胞のニッチあるいはソースとして似たように働くことが提唱されている。

第 5 章 結論

本研究では新規解析手法として、①胆管の脈管構造をインクで標識し、三次元的に観察する方法、②標識したインクを切片において免疫染色と組み合わせて観察する方法、③厚みのある組織片または④ホールマウントでの免疫染色による三次元的解析、を確立した。これらの手法により、マウスの正常肝および障害肝の詳細な胆管の構造を初めて明らかにした。肝障害時には、胆管三次元組織構造が大きくリモデリングすることが分かった。また、肝臓が障害に応答して増強させるシグナルである FGF7 と TWEAK が、胆管の構造変化に対して異なる作用を持つことが明らかとなった。さらに、異なる障害モデル肝臓では、胆管の構造変化の形態が大きく異なることを見いだした。この違いとして、胆管の枝の方向性が異なることを示した。これにより、障害部位における胆管の枝の密度が高くなっていると考えられる。また、構造変化した胆管の機能の一つとして、障害部位付近に伸びた胆管の枝から LPC 由来の肝細胞が生じることを観測した。肝臓は多様な障害に応じて、胆管三次元組織構造を変化させることで、高い再生能力を得ていると考えられる。

第 6 章 参考文献

1. Liu Y, Meyer C, Xu C, Weng H, Hellerbrand C, ten Dijke P, Dooley S. Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;304:G449-468.
2. Bucher NL, Swaffield MN. The rate of incorporation of labeled thymidine into the doxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res* 1964;24:1611-1625.
3. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007;213:286-300.
4. Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 2013;3:485-513.
5. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 2012;22:1166-1175.
6. Malato Y, Naqvi S, Schurmann N, Ng R, Wang B, Zape J, Kay MA, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 2011;121:4850-4860.
7. Tarlow BD, Finegold MJ, Grompe M. Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology* 2014;60:278-289.
8. Yanger K, Knigin D, Zong Y, Maggs L, Gu G, Akiyama H, Pikarsky E, et al. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 2014;15:340-349.
9. Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014;14:561-574.
10. Rodrigo-Torres D, Affo S, Coll M, Morales-Ibanez O, Millan C, Blaya D, Alvarez-Guaita A, et al. The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology* 2014;60:1367-1377.
11. Espanol-Suner R, Carpentier R, Van Hul N, Legry V, Achouri Y, Cordi S,

Jacquemin P, et al. Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1564-1575 e1567.

12. Sackett SD, Li Z, Hurtt R, Gao Y, Wells RG, Brondell K, Kaestner KH, et al. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 2009;49:920-929.

13. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487.

14. Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells* 2007;25:2419-2429.

15. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 2009;136:1951-1960.

16. Michalopoulos GK. The liver is a peculiar organ when it comes to stem cells. *Am J Pathol* 2014;184:1263-1267.

17. Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999;154:537-541.

18. Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* 2013;27:169-181.

19. Ishikawa T, Factor VM, Marquardt JU, Raggi C, Seo D, Kitade M, Conner EA, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 2012;55:1215-1226.

20. Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, Lincecum JM, Wang MZ, Zheng TS, Browning B, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 2005;115:2330-2340.

21. Kordes C, Haussinger D. Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest*

2013;123:1874-1880.

22. Kamiya A, Kakinuma S, Yamazaki Y, Nakauchi H. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology* 2009;137:1114-1126, 1126 e1111-1114.
23. Dorrell C, Erker L, Schug J, Kopp JL, Canaday PS, Fox AJ, Smirnova O, et al. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev* 2011;25:1193-1203.
24. Yeoh GC, Ernst M, Rose-John S, Akhurst B, Payne C, Long S, Alexander W, et al. Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/ 2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology* 2007;45:486-494.
25. Sekiya S, Suzuki A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest* 2012;122:3914-3918.
26. Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, Poppleton H, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009;457:603-607.
27. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 2001;1:4.
28. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999;10:1735-1737.
29. Wooddell CI, Reppen T, Wolff JA, Herweijer H. Sustained liver-specific transgene expression from the albumin promoter in mice following hydrodynamic plasmid DNA delivery. *J Gene Med* 2008;10:551-563.
30. Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 2003;116:1775-1786.
31. Sparks EE, Perrien DS, Huppert KA, Peterson TE, Huppert SS. Defects

in hepatic Notch signaling result in disruption of the communicating intrahepatic bile duct network in mice. *Dis Model Mech* 2011;4:359-367.

32. Ernst TM, Schwinge D, Raabe N, Daubmann A, Kaul MG, Adam G, Schramm C, et al. Imaging of the murine biliopancreatic tract at 7 tesla: Technique and results in a model of primary sclerosing cholangitis. *J Magn Reson Imaging* 2014;40:1355-1364.

33. Apte U, Thompson MD, Cui S, Liu B, Cieply B, Monga SP. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 2008;47:288-295.

34. Hu M, Kurobe M, Jeong YJ, Fuerer C, Ghole S, Nusse R, Sylvester KG. Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;133:1579-1591.

35. Itoh T, Kamiya Y, Okabe M, Tanaka M, Miyajima A. Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response. *FEBS Lett* 2009;583:777-781.

36. Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Yu LX, Zhang SH, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008;68:4287-4295.

37. Itoh T, Miyajima A. Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* 2014;59:1617-1626.

38. Wang Y, Filius A, Zhao C, Passe SM, Thoreson AR, An KN, Amadio PC. Altered median nerve deformation and transverse displacement during wrist movement in patients with carpal tunnel syndrome. *Acad Radiol* 2014;21:472-480.

39. Uchihara T, Iwabuchi K, Funata N, Yagishita S. Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates--a morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 2002;178:124-128.

40. Cardinal M, Eisenbud DE, Armstrong DG. Wound shape geometry measurements correlate to eventual wound healing. *Wound Repair Regen*

2009;17:173-178.

41. Fernandez-Garrido S, Kaganer VM, Hauswald C, Jenichen B, Ramsteiner M, Consonni V, Geelhaar L, et al. Correlation between the structural and optical properties of spontaneously formed GaN nanowires: a quantitative evaluation of the impact of nanowire coalescence. *Nanotechnology* 2014;25:455702.
42. Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, Ridgway RA, et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* 2012;18:572-579.
43. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, et al. In vitro expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013;494:247-250.
44. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa S, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011;43:34-41.
45. Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, Oshima N, Kiyonari H, Nakauchi H, Taniguchi H. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 2008;48:1964-1978.
46. Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 2013;497:332-337.
47. Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen CK, Lubeck E, Shah S, et al. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 2014;158:945-958.
48. Isse K, Lesniak A, Grama K, Maier J, Specht S, Castillo-Rama M, Lunz J, et al. Preexisting epithelial diversity in normal human livers: a tissue-tethered

cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells. *Hepatology* 2013;57:1632-1643.

49. Carpino G, Cardinale V, Onori P, Franchitto A, Berloco PB, Rossi M, Wang Y, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J Anat* 2012;220:186-199.

50. Kiba T. The role of the autonomic nervous system in liver regeneration and apoptosis--recent developments. *Digestion* 2002;66:79-88.

51. Kato H, Shimazu T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. *Eur J Biochem* 1983;134:473-478.

52. Ikeda O, Ozaki M, Murata S, Matsuo R, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, et al. Autonomic regulation of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Surg Res* 2009;152:218-223.

53. Kumar A, Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 2007;318:772-777.

54. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci* 2012;15:1063-1067.

55. Gothoskar SV, Talwalkar GV, Bhide SV. Tumorigenic effect of thioacetamide in Swiss strain mice. *Br J Cancer* 1970;24:498-503.

56. Rekha RD, Amali AA, Her GM, Yeh YH, Gong HY, Hu SY, Lin GH, et al. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology* 2008;243:11-22.

57. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, Frenette PS. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* 2013;341:1236361.

58. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004;39:1739-1745.
59. Yanger K, Zong Y, Maggs LR, Shapira SN, Maddipati R, Aiello NM, Thung SN, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev* 2013;27:719-724.
60. Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ, Grompe M. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014;15:605-618.
61. Sekiya S, Suzuki A. Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am J Pathol* 2014;184:1468-1478.
62. Bokel C, Brand M. Generation and interpretation of FGF morphogen gradients in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 2013;23:415-422.
63. Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 1997;124:4867-4878.
64. Makarenkova HP, Hoffman MP, Beenken A, Eliseenkova AV, Meech R, Tsau C, Patel VN, et al. Differential interactions of FGFs with heparan sulfate control gradient formation and branching morphogenesis. *Sci Signal* 2009;2:ra55.
65. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:411-425.
66. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116-129.
67. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007;449:1003-1007.

68. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130.
69. Choi TY, Ninov N, Stainier DY, Shin D. Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology* 2014;146:776-788.
70. He J, Lu H, Zou Q, Luo L. Regeneration of liver after extreme hepatocyte loss occurs mainly via biliary transdifferentiation in zebrafish. *Gastroenterology* 2014;146:789-800 e788.

謝辞

本研究は、東京大学分子細胞生物学研究所発生・再生研究分野において、宮島篤教授の指導のもとで行われました。的確なご指導と、このような研究の機会を与えて下さいました宮島篤教授に深く感謝いたします。

本研究において、良い環境とご指導・ご助言を下さいました同研究分野の伊藤暢講師に深く感謝いたします。

また、卒業された後にご助言を下さいました諸先輩方、丁寧にマウス管理をして下さった今泉典子技術職員に感謝いたします。

そして、多くのアドバイスや実験手技等を教えてくださり、研究生活において様々な面で支えて頂いた発生・再生研究分野の皆様に厚く感謝いたします。

最後に、今日まであらゆる面で支えてくれた家族に心より感謝いたします。