特集:肝臓の発生・再生

# 肝臓の発生・組織構築過程における細胞間相互作用ネットワーク

# 塩 尻 信 義

肝臓は、肝小葉を基本単位とする代謝臓器であるが、発生過程では、内胚葉に由来する肝前駆細胞である肝芽細胞と、中胚葉由来の肝星細胞や血管内皮細胞などとの相互作用の結果、高度に組織化された組織構築が起こる。遺伝子改変動物や細胞選別(cell sorting)などを利用した最近の研究では、各構成細胞種間での相互作用が、さらに高次のネットワークをつくっていることが明らかになりつつある。肝芽細胞(肝細胞)の増殖・成熟には、肝星細胞や血管内皮細胞などからの作用が必要不可欠であるし、他方、血管内皮細胞の形態形成や胆管形態形成には、肝細胞の成熟が重要である。その分子メカニズムとしては、各種細胞増殖因子、細胞外マトリックス、Notch シグナルなどが関与している。

#### 1. はじめに

肝臓は,成熟肝細胞が肝星細胞,血管内皮細胞, Kupffer (クッパー) 細胞などとともに、規則正しく配列 した肝小葉を基本単位とする臓器である. 成熟肝細胞は肝 小葉内で索状に整列する. 肝小葉中心部に中心静脈, 肝小 葉周辺部には、門脈(小葉間静脈)、肝動脈(小葉間動脈)、 そして肝内胆管(あわせて門脈トライアッド)が分布する (図1). 門脈と肝動脈から入った血流は類洞を経て、中心 静脈へと流れる. これら高次の組織構築が種々の肝機能の 遂行を保証している.しかし、発生初期の肝臓原基はい たって単純で、まず内胚葉の1層のシート構造、次に肝憩 室構造をとる. そして肝憩室から細胞索の伸長, 著しい細 胞増殖、さらにさまざまな細胞分化や形態形成を経て、成 熟肝組織が成立していくが、その過程では、細胞間ならび に組織間相互作用が必要不可欠である. 組織形成が非常に 活発な胎児肝臓は造血器官でもあり、組織像が複雑で、そ の発生・分化・組織構築メカニズムの研究はあまり進んで

Nobuyoshi Shiojiri (Department of Biology, Faculty of Science, Shizuoka University, Oya 836, Suruga-ku, Shizuoka City, Shizuoka Prefecture 422–8529, Japan)

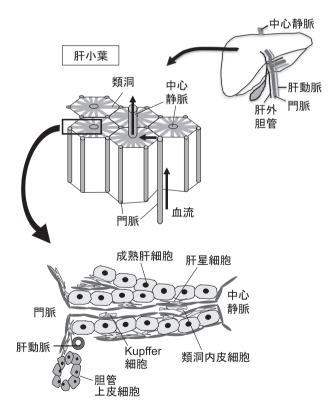


図1 成体肝臓の組織構築

肝臓の構成単位は肝小葉とされる。肝小葉への血流は、肝小葉 周辺部の門脈と肝動脈から入り、類洞を経て、中心静脈に流れ る。この過程で種々の代謝が行われる。門脈は、その周囲にあ る肝内胆管と肝動脈をあわせ門脈トライアッドを形成する。

静岡大学理学部生物科学科(〒422-8529 静岡市駿河区 大谷836)

Cell-cell interaction networks during murine liver development

いなかった.しかし、最近の、種々の遺伝子欠失マウスの開発(コンディショナルノックアウトマウスを含め)や、特異的細胞表面マーカーによる細胞選別(cell sorting)を駆使した in vitro での解析などにより、肝臓の発生・分化の研究は格段の進歩を遂げた.ここでは、我々の研究を中心にマウス胎仔肝臓の発生・組織構築における細胞間あるいは組織間相互作用ネットワークに関して紹介したい.

### 2. 肝臓の発生と組織形成

マウスの場合、肝臓原基は形態的には、胎生9.0日(E9.0)に前腸門腹壁内胚葉がつくる肝憩室として発生するが、この発生には心臓中胚葉や横中隔間充織から2段階の誘導を受けることが不可欠とされるり、E9.5に、肝憩室は頭部・尾部の2部分よりなるようになり、頭部肝憩室を構成する内胚葉細胞が隣接する間充織(横中隔間充織)と臍腸間静脈に肝芽細胞(E12.5までの未熟肝実質細胞をいう、図2と図3)からなる細胞素を侵入させ、ミニ肝臓が発生する1.20、その後、肝臓には造血幹細胞が移入そして増殖し、造血器官となるため(造血細胞は造血最盛期胎仔肝臓の50%以上を占める)、その組織構築は非常に複雑なものとなる(図4)、肝芽細胞はサイトケラチン陽性、肝星細胞はデスミン陽性、内皮細胞は血小板内皮細胞接着分子1(PECAM-1)陽性あるいはLYVE-1 (lymphatic vessel endo-

thelial hyaluronan receptor-1) 陽性細胞として検出できる (図 4)<sup>3)</sup>. E12.5 までの発生の早い時期,肝臓に肝内胆管は発生していない (図 3). 一方,胆嚢や肝外胆管は肝憩室尾部として発生し,E9.5 の時点で既に肝臓本体をつくる部分とは別になっている<sup>1,2)</sup>.

成体肝臓で発達する門脈, 肝動脈, 類洞, 中心静脈(肝

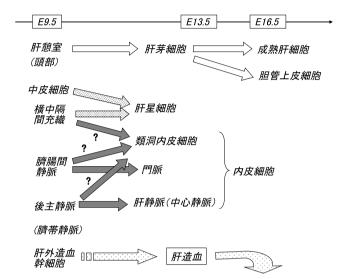
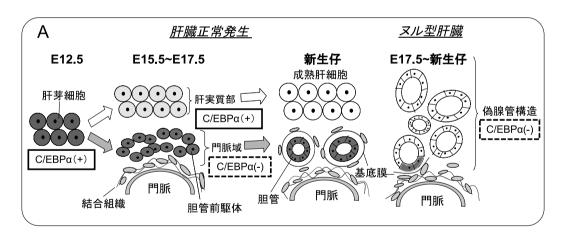


図2 マウス肝発生における細胞系譜 詳細は本文参照.



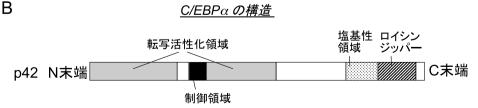


図3 肝臓発生過程における肝芽細胞の分化・成熟化と C/EBPa

(A) 肝発生と C/EBP $\alpha$ . 肝芽細胞は門脈周囲に位置すると、誘導を受け胆管上皮細胞となるが、それ以外の細胞は成熟肝細胞となる。 C/EBP $\alpha$  は胆管上皮細胞の分化過程で発現抑制される。その遺伝子欠失マウス肝臓(ヌル型肝臓)では、肝細胞の成熟化が抑えられるとともに、肝臓本体に偽腺管構造が発生する。 門脈周囲に胆管上皮細胞は分化するが、胆管は形成しない。図の(+)は "発現あり" を、(-)は "発現なし"を示す。 (B) C/EBP $\alpha$  の構造。

2012年 8月] 631

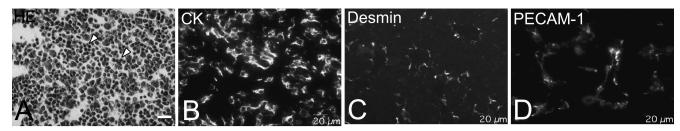


図4 12.5 日胎仔肝臓の組織像

(A) ヘマトキシリン-エオシン (H-E) 染色. (B) サイトケラチン免疫染色. (C) デスミン免疫染色. (D) PECAM-1 免疫染色. 胎 仔肝臓は造血器官で,多数の造血細胞 (矢頭) が観察される (A). 肝芽細胞はサイトケラチン陽性で,造血細胞の間に散在している (B). 胎仔肝臓は複雑な組織像を示すが,成体肝臓同様,類洞構造 (原始類洞) がよく発達している (D). 原始類洞内皮はデスミン陽性の星細胞に裏打ちされている (C). バーは,20 μm.

静脈)の血管系の発生学的起源であるが,我々の組織学的解析からは,門脈は臍腸間静脈由来,中心静脈は後主静脈由来である可能性が高い(図 2)<sup>4)</sup>. 類洞の起源ははっきりしないが,臍腸間静脈の血管新生により発生する可能性が高い(図 2)<sup>5)</sup>. また門脈-原始類洞-中心静脈という血管系構築は発生初期より発達し,またそれぞれのコンパートメントの遺伝子発現も異なるようである.門脈内皮は Jagged1 やコネキシン 37,40 を発現するが,それ以外の静脈内皮はこれらを発現しない<sup>4)</sup>. 血管内皮増殖因子(VEGF)受容体である Flk-1 の発現も異なり,原始類洞内皮で強く発現,門脈内皮で中程度の発現,しかし中心静脈内皮では発現が検出できない<sup>5)</sup>. 肝動脈は胎仔期,肝臓内にあまり発達しないが,生後発達し,その内皮は Jagged1,コネキシン 37,40 などを発現する.

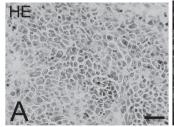
肝星細胞は、肝発生初期より原始類洞に分布するデスミン陽性細胞として検出でき、その起源は横中隔間充織あるいは臍腸間静脈結合組織と考えられる(図 2)<sup>1,2)</sup>. しかし最近の報告では、中皮細胞由来とするものがある<sup>6,7)</sup>.

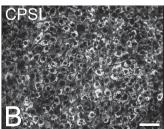
肝内胆管の形成はE13.5 に、門脈周囲に位置した肝芽細胞が門脈の細胞から誘導を受けることで始まり、胆管前駆構造である ductal plate あるいは pearl-like structure が発生する(図 3)<sup>1,2</sup>. E16.5~17.5 に肝内胆管が出現し始める、門脈周囲以外の肝芽細胞は成熟肝細胞へと分化してい

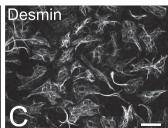
く. 肝内胆管上皮細胞の分化にともない, 肝芽細胞で発現していた AFP (α-フェトプロテイン) やアルブミンの発現抑制が起こり, オステオポンチンを発現するようになる. また基底膜をもつようになる. 肝細胞の成熟は, 段階的に起こり, E16.5 に尿素回路酵素, 新生仔期にチロシンアミノトランスフェラーゼやセリンデヒドラターゼなど, 生後 20 日頃にトリプトファンオキシゲナーゼなどの発現が起こる. 肝特異的転写因子 C/EBPα などの発現の有無が肝芽細胞の成熟肝細胞あるいは胆管上皮細胞への分化に密接に関わっている (後述, 図 3).

# 3. 肝臓構築と肝機能発現に関わる 細胞間相互作用ネットワーク

発生過程における肝臓構築と肝機能発現に関わる細胞間相互作用ネットワークを調べる実験系として、まず E12.5 肝臓を細胞分散し、5 日間の初代培養を行った。その結果、この培養系では、肝芽細胞(肝細胞)、肝星細胞、血管内皮細胞(原始類洞内皮細胞)、造血細胞、Kupffer 細胞等を含む二次元肝オルガノイドが形成された(図 3)<sup>8</sup>. ディッシュ底に肝星細胞が接着し、その上に肝細胞シート、そして血管内皮細胞が位置した。血管内皮細胞は毛細血管網を形成した(図 5). また培養が進むに従い、肝細胞は、尿素回路酵素の一つであるカルバモイルリン酸合成







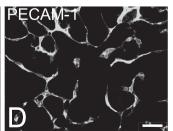


図5 E12.5 肝臓細胞の初代培養

(A) HE 染色. (B) サイトケラチン免疫染色. (C) デスミン免疫染色. (D) PECAM-1 免疫染色. E12.5 肝臓細胞をスライドガラス上で5日間初代培養すると, 肝芽細胞は成熟し (尿素回路酵素を発現) 肝細胞シートを形成するが (A, B), その下にデスミン陽性の星細胞 (C) や Kupffer 細胞が位置する. 内皮細胞も索状構造をとる (D). 大半の造血細胞は培地交換時に除かれる. バーは,50 μm.

酵素 I (CPSI) などをはじめとして肝機能を発現した.

次に、この培養系を利用して、抗 E-カドへリン抗体を用いた免疫磁気ビーズ法により、E-カドへリンを発現する肝芽細胞と、E-カドへリンを発現しない、それ以外の細胞(非実質細胞)を分離し、肝芽細胞の単独培養を行った。その結果、肝芽細胞は、非実質細胞がないと、その生存・増殖・成熟は極度に低下した。これより、肝芽細胞の生存・増殖・成熟に非実質細胞の存在が必要不可欠であることがわかる。肝芽細胞の生存・増殖は E12.5 肝臓細胞の培養上清(CM)を培地に添加することでレスキューされると同時に、肝芽細胞は尿素回路酵素を発現する肝細胞となった。CM 中の活性因子は肝細胞増殖因子(HGF)などの、液性の増殖因子が担うと考えられるが、これまでのところ各細胞増殖因子の単独添加では、CM の効果を完全に代替できてはいない。

また、非実質細胞のうちどの細胞が肝芽細胞の遺伝子発現を制御しうるか調べるため、血管内皮細胞に注目した. in vitro の二次元肝オルガノイド形成系から、PECAM-1 を発現する内皮細胞を免疫磁気ビーズ法により除去して、培養を行ったところ、肝芽細胞、肝星細胞、Kupffer 細胞等の増殖・遺伝子発現が著しく減少した(図 6)(Sugiyama et al.,投稿中).この結果は肝臓の組織構築・機能発現に血管内皮細胞が必須であることを示している。またこの内皮

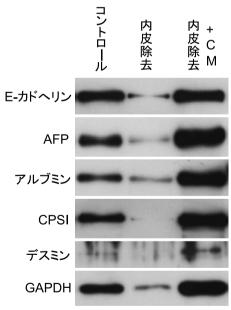


図6 E12.5 肝臓細胞の初代培養における内皮細胞除去の影響 E12.5 肝臓細胞から免疫磁気ビーズ法により PECAM-1 陽性内皮細胞を除去して5日間初代培養した後、各タンパク質の発現を免疫ブロット法で調べた。内皮除去培養系では、肝細胞の発現する E-カドヘリン、AFP、アルブミン、CPSI の発現減少、星細胞の発現するデスミンの低下が認められる。細胞増殖も低下する。CM 添加でこれらの発現の減少はレスキューされる。AFP:α-フェトプロテイン、CPSI:カルバモイルリン酸合成酵素 I、GAPDH:グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素。

細胞除去の効果は、内皮細胞を除かない E12.5 肝臓細胞 培養の CM 添加で完全にレスキューされたので、内皮細胞からの因子が液性のものであると推察された。その本体の解明も今後極めて重要である。

一方, 非実質細胞の生存・増殖・形態形成等にも肝芽細 胞が必要である. 免疫磁気ビーズ法で肝芽細胞を除いた非 実質細胞画分を単独で培養すると, 血管内皮細胞, 肝星細 胞、Kupffer細胞など全ての非実質細胞の生存・増殖が低 下した<sup>9</sup>. 血管内皮細胞は通常の, 全ての細胞種がそろう 培養では毛細血管網を形成するが、肝芽細胞非存在下で は、肝星細胞があっても毛細血管形態形成(生体肝臓の類 洞に相当する可能性が高い)は全く起こらない100.これは、 内皮細胞の増殖が低いことが原因である可能性があるた め、非実質細胞の濃度を上げてみたが、結果は同様で、毛 細血管形態形成が起こることはなかった.したがって、毛 細血管形態形成には肝芽細胞の存在が必須であると考える ことができる. 肝芽細胞は VEGF を産生すると考えられ るため、VEGFを種々の濃度で培地に加えたが、血管内皮 細胞の増殖は促進されるものの、毛細血管形態形成は起こ らなかった. これらの結果より、毛細血管形態形成には、 血管内皮細胞と肝芽細胞との接触が重要である可能性が高 いと考えられる. また肝芽細胞がない場合, 毛細血管形態 形成は起こらないが、同時に肝星細胞の増殖も著しく低下 しており、これも毛細血管形態形成に関係する可能性が高 い、いずれにせよ、内皮細胞除去培養の結果は肝芽細胞と 非実質細胞間の相互作用ネットワークが肝臓構築・機能発 現に必須であることを示している.

肝臓構築・機能発現が起こるためには、ここに述べた以外に、図7に示すような細胞間相互作用ネットワークがさらに働いていると推察される.

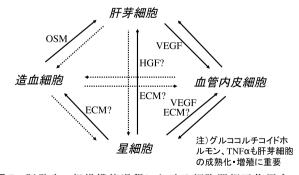


図7 肝発生・組織構築過程における細胞間相互作用ネット ワーク

肝発生・組織構築過程で、肝芽細胞、星細胞、造血細胞、血管内皮細胞などの間で細胞間ならびに組織間相互作用ネットワークが働いている(中皮細胞、Kupffer 細胞も関与するが、図では省略してある)。作用分子群の全貌はまだ十分にわかっていない。ECM:細胞外マトリックス、HGF:肝細胞増殖因子、OSM:オンコスタチン M、VEGF:血管内皮細胞増殖因子。

2012年 8月] 633

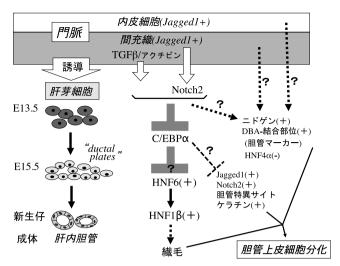


図8 胆管形成誘導メカニズム

胆管上皮細胞が分化する過程で、C/EBPαが発現抑制されることが必要である。その下流に、胆管形成遺伝子 HNF6、HNF1βの発現上昇が位置する可能性が高い、門脈組織からの因子は C/EBPα の発現を抑制するカスケードだけで胆管上皮細胞への分化を誘導するのではない。さらに C/EBPα 抑制以外のカスケードもあるようである。

### 4. 胆管発生における細胞間ならびに組織間相互作用

C/EBPαは、N末端に転写活性化領域、C末端に塩基性 領域とロイシンジッパー領域をもつ肝特異的転写因子の一 つである (図3)11. 糖代謝や尿素回路酵素などの遺伝子の 転写を制御する.また C/EBPαは、肝芽細胞の肝細胞へ の成熟に必須であり、胆管上皮細胞の分化過程では発現抑 制される12、その遺伝子欠失マウスの肝臓では、肝細胞の 成熟に関わる肝特異的転写因子 HNF4α や HNF1α が発現 されるものの, 肝細胞の, 完全な成熟は起こらず, 肝臓全 体に, 胆管形成遺伝子 Hnf6 や Hnf1b, Jagged1, Notch2 を高発現する偽腺管構造が発生する(図3)13. さらに、胆 管形成遺伝子である Sox9 タンパク質や胆管上皮マー カー・オステオポンチンの発現も著しく上昇する. そして Sox9 タンパク質やオステオポンチンの、肝臓本体の偽腺 管構造における発現パターンは、陽性細胞と陰性細胞が入 り混じるモザイク状となった. HNF4αや HNF1αの発現 も, 肝臓本体の偽腺管構造の細胞の多くで認められるが, 陰性細胞も散在した. これらの結果は、C/EBPαの発現が 肝細胞の成熟に必須であるとともに、C/EBPαが欠失する と他の肝特異的転写因子の発現が不安定になったり、胆管 形成遺伝子が発現し始めることを示している. また一方 で、C/EBPα が発現抑制されることが、胆管上皮細胞の分 化に重要であることも示している.

肝臓本体の偽腺管構造の多くは胆管前駆構造に似てはいるが、完全な胆管ではない(上述したように偽腺管構造の細胞の多くは  $HNF4\alpha$  や  $HNF1\alpha$  を発現する)。 そしてこの

遺伝子欠失マウス肝臓では、胆管上皮細胞はやはり門脈域だけに分化するので、これより胆管分化には  $C/EBP\alpha$  の発現抑制に加え、門脈域からの誘導が重要であることがわかる.この誘導には門脈組織のうちその内皮細胞ではなく間充織が重要とされており $^{1.140}$ 、具体的な誘導因子として、 $TGF\beta/P$ クチビンや Notch シグナルなどが想定されている(図 8)  $^{15\sim17}$ .

また、C/EBPα は胆管上皮細胞では発現抑制されるので、胆管形成に不要とも考えうる。そのため遺伝子欠失マウスでは門脈周囲に正常な胆管が形成されてもいいはずであるが、実際には胆管上皮細胞の分化は起こるものの、形態的に胆管といえる正常な導管は形成されない<sup>13)</sup>.この結果は、肝実質部の成熟が門脈域組織の秩序だった組織構築に必要不可欠であることを示唆している。遺伝子欠失マウスでは、実際に、門脈の結合組織、平滑筋組織の肥厚も認められている。これらが胆管構築の異常を誘起した可能性がある。

## 5. まとめと今後に向けて

肝発生において組織構築や細胞分化が進んでいく過程では、非常に精巧な細胞間ならびに組織間相互作用ネットワークが働くと推察されるが、まだ我々はその氷山の一角を知ったにすぎない。さらに、新しい解析技術を駆使した研究が精力的に展開され、肝臓発生・分化・組織構築の裏に潜む謎が解き明かされることが切に望まれる。肝障害や肝再生過程でも、発生期と同様の細胞間・組織間相互作用やメカニズムが作動する可能性は非常に高く、発生研究だけにとどまらない、発生から再生そして肝疾患までを俯瞰する、広い視点の研究も必要となる。ES細胞やiPS細胞などから臨床に応用できる肝臓構築を行う上でも、また胎仔期の幹細胞をいかに臨床に使えるか考えていく上でも、この小文で紹介した、肝発生過程で起こる細胞間ならびに組織間相互作用をどう保証していくかがキーポイントの一つとなると思われる。

### 謝辞

この総説を書く機会を与えていただきました東京大学・ 分子細胞生物学研究所教授 宮島篤先生に、この場を借り て厚くお礼申し上げます.ここで紹介した研究成果は、私 の研究室を育った学生諸氏との共同研究で行われたもので す.

#### 文 献

- 1) 塩尻信義 (2002) 生化学, 74, 285-296.
- 2) Shiojiri, N. (1997) Microsc. Res. Tech., 39, 328-335.
- 3) Nonaka, H., Tanaka, M., Suzuki, K., & Miyajima, A. (2007)

634 〔生化学 第 84 卷 第 8 号

- Dev. Dyn., 236, 2258-2267.
- 4) Shiojiri, N., Niwa, T., Sugiyama, Y., & Koike, T. (2006) Cell Tissue Res., 324, 547–552.
- Sugiyama, Y., Takabe, Y., Nakakura, T., Tanaka, S., Koike, T., & Shiojiri, N. (2010) Dev. Dyn., 239, 386–397.
- Asahina, K., Tsai, S. Y., Li, P., Ishii, M., Maxson, R. E., Jr., Sucov, H. M., & Tsukamoto, H. (2009) Hepatology, 49, 998– 1011
- Asahina, K., Zhou, B., Pu, W. T., & Tsukamoto, H. (2011) *Hepatology*, 53, 983–995.
- Sugiyama, Y., Koike, T., & Shiojiri, N. (2007) Histochem. Cell Biol., 128, 521–531.
- Nitou, M., Sugiyama, Y., Ishikawa, K., & Shiojiri, N. (2002) *Exp. Cell Res.*, 279, 330–343.
- 10) Takabe, Y., Yagi, S., Koike, T., & Shiojiri, N. (2012) J. Anat., in press.
- 11) Wethman, K., Smink, J.J., & Leutz, A. (2010) Bioessays, 32,

885-893.

- 12) Shiojiri, N., Takeshita, K., Yamasaki, H., & Iwata, T. (2004) *J. Hepatol.*, 41, 790–798.
- Yamasaki, H., Sada, A., Iwata, T., Niwa, T., Tomizawa, M., Xanthopoulos, K.G., Koike, T., & Shiojiri, N. (2006) Development, 133, 4233–4243.
- 14) Hofmann, J.J., Zovein, A.C., Koh, H., Radtke, F., Weinmaster, G., & Iruela-Arispe, M.L. (2010) Development, 137, 4061– 4072.
- McCright, B., Lozier, J., & Gridley, T. (2002) Development, 129, 1075–1082.
- Tanimizu, N. & Miyajima, A. (2004) J. Cell Sci., 117, 3165–3174.
- 17) Clotman, F., Jacquemin, P., Plumb-Rudewiez, N., Pierreux, C. E., Van der Smissen, P., Dietz, H.C., Courtoy, P.J., Rousseau, G.G., & Lemaigre, F.P. (2005) Genes Dev., 19, 1849–1854.