

特集：肝臓の発生・再生

肝細胞と胆管上皮の相互可塑性

西川 祐司¹, 永濱 康晴², 曾根 正行²
山本 雅大¹, 榎本 克彦³

肝においては、肝細胞と胆管上皮細胞いずれにも分化できる肝幹細胞の存在が想定されている。肝幹細胞は、肝に傷害が起こると活発に増殖し、組織を修復するとされているが、その実体および肝修復における意義については不明の点が多い。一方、成熟肝細胞は幹細胞に匹敵する増殖能をもっているが、他の細胞に分化することはできないとみなされてきた。しかし、我々は、肝細胞が傷害に伴う炎症や線維化などの微小環境の変化に伴い、胆管上皮細胞に分化転換しうることを *in vitro* および *in vivo* において証明した。また最近、この変化が可逆性であることを見いだした。我々の研究は、肝細胞と胆管上皮細胞の相互可塑性を示唆しており、肝細胞の再生性増殖を促し、その分化方向を制御することが、慢性肝疾患の治療法確立のための基盤となりうると考えられる。

1. はじめに

成熟肝内には肝幹細胞 (liver stem/progenitor cell) が少数存在していると考えられている。肝幹細胞は、少なくとも肝細胞と胆管上皮細胞へ分化しうる両能性 (bipotentiality) をもつ細胞であり、肝傷害時に活性化され、肝修復を促していると推定されている。また、肝外においても肝

構成細胞に分化しうる幹細胞が存在するとされ、これらを肝傷害の治療に応用する試みがなされている。また最近、比較的少数の分化誘導遺伝子を人為的に導入することで非肝細胞を肝細胞に効率的に変換させることも可能となっている。しかし、特に肝内の肝幹細胞の実体やこれらが肝修復において実際にどの程度の役割を担いうるかについては不明な点が多く残されている。一方、肝細胞はその増殖能は幹細胞に匹敵するが、一度成熟した後は、その表現型は不変であるとみなされてきた。しかし、最近、肝細胞表現型の可塑性を示唆するデータが得られつつある。本稿では、はじめに肝幹細胞に関する最新の知見を整理し、肝傷害からの回復には、肝内または肝外のどのタイプの細胞が有効なのか、幹細胞の増殖および分化にはどのような肝内微小環境が必要なのかについて考察した後、我々が現在研究を進めている成熟肝細胞と胆管上皮の相互可塑性に関する知見を紹介する。

2. 肝幹細胞研究の現在

(1) 肝幹細胞とみなされている細胞

一般的に肝幹細胞は発生期の肝芽細胞と類似した性質をもつと考えられている。ここで発生学的な知見を整理しておきたい。肝臓は前腸内胚葉の肝憩室として発生し、その頭側において横中隔結合織内に向かい α -フェトプロテイン

¹ 旭川医科大学医学部病理学講座腫瘍病理分野 (〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1-1)

² 大塚製薬株式会社藤井記念研究所 (〒520-0106 滋賀県大津市唐崎1丁目11-1)

³ 秋田大学大学院医学系研究科分子病態学・腫瘍病態学講座 (〒010-8543 秋田県秋田市本道1丁目1-1)

Mutual phenotypic plasticity between hepatocytes and bile ducts

Yuji Nishikawa¹, Yasuharu Nagahama², Masayuki Sone², Masahiro Yamamoto¹ and Katsuhiko Enomoto³ (¹Division of Tumor Pathology, Department of Pathology, Asahikawa Medical University, Higashi 2-1-1-1 Midorigaoka, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan; ²Fujii Memorial Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Company, Ltd., 1-11-1 Karasaki, Otsu, Shiga 520-0106, Japan; ³Department of Molecular Pathology and Tumor Pathology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita, Akita 010-8543, Japan)

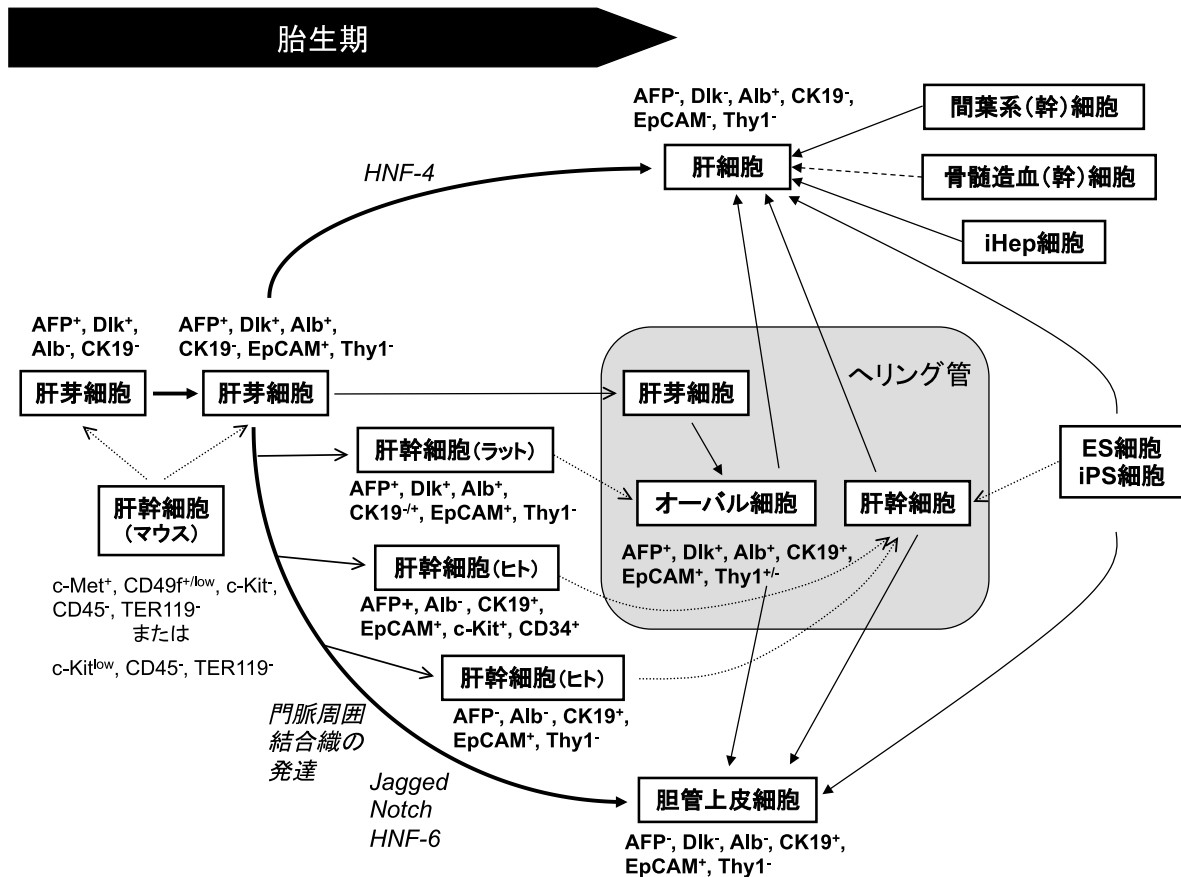


図1 肝上皮系細胞の発生からみた肝幹細胞の位置づけ

肝細胞と胆管上皮細胞（肝内胆管）はいずれも肝芽細胞に由来する。肝芽細胞は胆管上皮細胞に分化する時点で、すでにアルブミンを発現する。これまで肝幹細胞の候補が多数あげられてきたが、これらの分化状態は肝芽細胞から胆管上皮細胞に至る種々の段階に相当すると考えられる。肝芽細胞または肝幹細胞は成熟肝においても少数存在しており、肝傷害に伴い活性化され、肝修復に重要な意義をもつとされている。図には示していないが、中内胚葉起源が疑われる幼若な幹細胞がヒト胎児肝に存在することも示唆されている。また、肝細胞に分化しうる肝外（幹）細胞が多数見いだされている。さらに iPS 由来の肝細胞や iHep など自己細胞に由来する肝細胞の治療への応用が今後期待される。

ン（ α -fetoprotein, AFP）陽性の肝芽細胞が進入する。これらはその後増殖し、肝実質を構成するとともに、アルブミンを産生するようになる。門脈周囲結合組織の発達に伴い、これに接するアルブミン陽性肝芽細胞が ductal plate と呼ばれる幼若な管腔構造を経て、サイトケラチン 19（cytokeratin 19, CK19）や EpCAM 陽性の小葉間胆管を形成する（図1）¹⁾。このように肝細胞だけでなく、肝内胆管の上皮細胞もアルブミンを産生する段階にまで分化した肝芽細胞に由来することは、後述する肝細胞の表現型の可塑性を考える上で重要である。また、肝芽細胞は初期から細胞表面に delta-like（Dlk）を発現し²⁾、肝幹細胞のマーカーとして用いられている。

これまで肝幹細胞の性質を示すと考えられる細胞がラット、マウスをはじめとする実験動物およびヒトにおいて多数同定されてきた（図1）。以下に代表的なものについて述べる。

オーバル細胞

肝幹細胞のプロトタイプとして、オーバル細胞（oval cell）があげられる³⁾。本来、これはラットにおいて、2-アセチルアミノフルオレン（2-acetylaminofluorene, 2-AAF）により肝細胞の増殖を抑制した状態で部分肝切除または四塩化炭素投与を行った場合に門脈域周囲に出現する、核/細胞質比の高い卵円形細胞として記載されたものである。この細胞は肝細胞と胆管上皮細胞の両方の表現型をあわせもち（アルブミン、CK19 陽性）、AFP 陽性であり、一部に Dlk の発現がみられることから^{4,5)}、肝芽細胞に類似した性格をもつと考えられている。類似した形態を示す細胞は、ポルフィリン代謝を障害する 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine（DDC）を含有する食餌を与えることでマウスでも誘導できる。また、ヒト肝組織でも、まれにグリソン鞘周囲にオーバル細胞が観察されることがある。また、オーバル細胞に類似し、肝細胞と細胆管の中間的な形

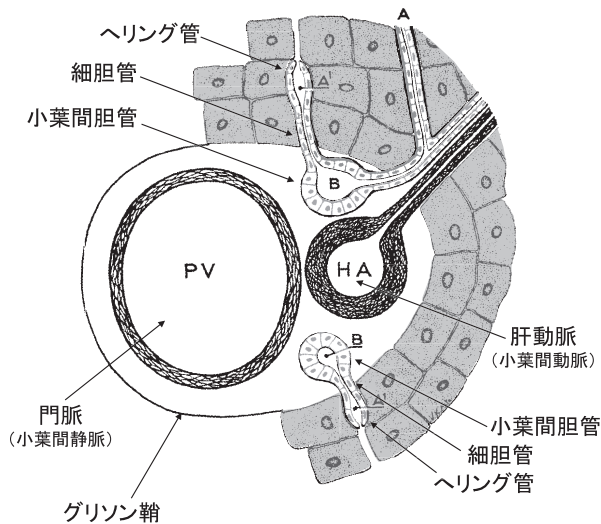


図2 グリソン鞘とその周囲の解剖学的構造

グリソン鞘内の小葉間胆管(B)は細胆管を介して肝細胞と連絡するが、その境界部(A1)には管腔が胆管上皮および肝細胞両方からなるヘリング管(Hering duct)と呼ばれる構造が存在する。肝幹細胞は成熟肝においては、これらのヘリング管付近に局在していると想定されている。PVは門脈、HAは肝動脈を示す。McLean, M.R. & Rees, K.R. (1958) *J. Pathol. Bacteriol.*, 76, 175-188を改変。

態やマーカー発現を示す細胞は intermediate hepatobiliary cell と呼ばれている⁶⁾。以上より、成熟肝において、肝芽細胞に近い幹細胞が、肝細胞と小葉間胆管の接点(ヘリング管, Hering duct)付近に存在し、これらが肝傷害時に活性化されてオーバル細胞となり、肝再生を行うとの仮説が立てられている(図2)³⁾。しかし、マウスのオーバル細胞ではAFPやDlkの発現は乏しいなど、動物種間で大きい違い(heterogeneity)が存在することも指摘されており⁷⁾、病態生理学的な意義について不明の点が多く残されている。

最近、マウスのオーバル細胞は、フローサイトメトリーによりCD45⁻CD11b⁻, CD31⁻, MIC1-1C3⁺CD133⁺CD26⁻の画分として、DDC食を与えたマウスの肝のみならず正常肝からも分離できることが報告されている⁸⁾。これらの細胞は*in vitro*で肝細胞および胆管上皮両方へ分化する能力をもち、Sry-related HMG box transcription factor 9 (Sox9)を発現している。Sox9は成熟肝における肝幹細胞のマーカーとして注目されているが⁹⁾、必ずしも幹細胞特異的ではなく、胎生期のductal plateや成熟肝での小葉間胆管や細胆管にも発現していること¹⁰⁾に留意しておく必要がある。

胎仔(児)肝に存在する幹細胞

フローサイトメトリーを用いた研究で、肝幹細胞がマウス胎仔肝内に存在することが示されている。マウス胎仔肝の非造血細胞画分の中に、増殖能が高く、肝細胞、胆管上

皮細胞だけでなく膵細胞や腸粘膜上皮細胞に分化しうる幹細胞(H-CFU-C)が、c-Met, $\alpha 6$ -インテグリン(CD49f)陽性、c-Kit陰性を指標として分離されている(c-Met⁺CD49f^{+/low}c-Kit⁻CD45⁻TER119⁻)¹¹⁾。しかし、肝幹細胞はc-Kitを表面マーカーとして用いても分離することが可能であり(c-Kit^{low}CD45⁻TER119⁻)¹²⁾、マウス胎仔由来肝幹細胞が単一の細胞集団ではないことが示唆される。また、マウス胎仔肝幹細胞の新たな表面マーカーとしてNope(neighbor of Punc E11)が同定されている¹³⁾。これらのマウス胎仔肝幹細胞と肝芽細胞やオーバル細胞との関連性は明瞭ではないが、H-CFU-Cの少なくとも一部は*in vitro*でオーバル細胞に類似した細胞に分化することが示されている¹¹⁾。

ラット胎仔肝内の幹細胞は、肝芽細胞の表面マーカーであるDelta-like(Dlk)に対する抗体を用いた磁気ビーズ法により分離されている(fetal liver stem/progenitor cell, FLSPC)¹⁴⁾。これらはCK19陽性、陰性いずれでもありうるが、AFP陽性であり、肝芽細胞またはオーバル細胞に近縁の細胞と考えられる。

ヒト胎児肝からは、HEA-125抗体を用いた磁気ビーズ法によりEpCAM陽性細胞として幹細胞が分離されている¹⁵⁾。これらはAFP陰性、アルブミン陰性、CK19陽性であり、胆管上皮細胞方向に分化した表現型を示しているが、*in vitro*, *in vivo*で肝細胞、胆管上皮細胞の両方に分化誘導することが可能とされている。また、肝細胞、胆管上皮細胞だけでなく、脂肪、骨、軟骨、内皮細胞へと分化する能力をもつ単クローン細胞(human fetal liver multipotent progenitor cell, hFLMPC)も分離されており(CD34⁺CD90⁺Thy1⁺c-Kit⁺EpCAM⁺cMet⁺, SSEA-4⁺CK18⁺CK19⁺Alb⁻ALP⁻CD44h⁺ビメンチン⁺)、おそらく肝芽細胞に分化する前の中内胚葉由来の幼若な細胞であると推定されている¹⁶⁾。さらに、磁気ビーズ法によりc-Kit⁺CD34⁺Lin⁻の肝幹細胞も分離されている¹⁷⁾。

肝細胞、小型肝細胞

肝細胞は一旦成熟した後も、ES細胞と同等レベルの増殖能力、自己複製能力を保持していることが証明されている¹⁸⁾。この意味で肝細胞は以前より“単能性幹細胞(unipotent stem cell)”であると認められてきたが、後述するように肝細胞は胆管上皮細胞へ分化する能力もあわせもつことが次第に明らかとなっており^{19,20)}、事実上、肝幹細胞の基準を満たしている可能性がある²¹⁾。また、ラットでは成熟肝細胞より増殖性が高い小型肝細胞が存在することが知られており²²⁾、これらが門脈周囲に局在すること²³⁾、CD44を特異的に発現することが明らかにされている²⁴⁾。

肝外性肝幹細胞

肝外にも肝幹細胞の性格を示す、もしくは肝細胞に分化することが可能な細胞が存在する。マウス ES 細胞は *in vivo* で成熟肝細胞に分化するとともに、FGF（線維芽細胞増殖因子）1, FGF4, HGF（肝細胞増殖因子）、OSM（オンコスタチン M）などのサイトカインを組み合わせた単層培養系において直接的に肝細胞に分化しうる²⁵⁾。同様に、iPS 細胞から効率良く肝細胞を分化誘導する方法が報告されている^{26, 27)}。また、ヒト脂肪細胞由来間葉系幹細胞²⁸⁾、ラット骨髄間葉系（幹）細胞^{29, 30)}、ヒト臍帯間質細胞³¹⁾などを成熟肝細胞に分化させることも可能である。

最近、少数の遺伝子を導入することで、マウス線維芽細胞を肝細胞様に転換させることが可能であることが報告され、注目されている^{32, 33)}。これらの iHep 細胞は、*HNF-4α*（肝細胞核因子 4α）、*Foxa1*, *Foxa2*（または *Foxa3*）を強制的に発現させるか、*Gata4*, *HNF-1α*, *Foxa3* の強制発現と *p19^{Arf}* の不活性化の組み合わせで誘導され、傷害肝を置換する能力をもっている。

オーバル細胞は Thy1, CD34 などの骨髄造血幹細胞のマーカーを発現し、オーバル細胞が骨髄細胞に由来することを示唆するデータが報告されたが³⁴⁾、その後の追試で細胞癒合が起こっていることが明らかになり、現在は骨髄造血幹細胞から肝細胞への分化はほとんど起こらないとみなされている^{35, 36)}。しかし、ヒト臍帯血からの肝細胞分化が *in vivo* で証明されており³⁷⁾、幼若な造血細胞は肝細胞のソースとして有用である可能性がある。

以上の細胞のうち、いずれが真の幹細胞なのか、複数の細胞タイプが肝幹細胞の性質を示しうるのかは、興味深い問題であるが、現時点ではまだ結論は出ていない。幹細胞を同定する手法の一つである label-retaining cell (LRC) assay を用いた研究では、LRC は①ヘリング管、②小葉間胆管、③胆管周囲の未分化細胞、④ヘリング管に連続する肝細胞のいずれにも認められ、肝幹細胞ニッチが複数存在することが示唆されている³⁸⁾。しかし、これらのニッチの細胞がどのような幹細胞マーカーを発現しているのか、実際に肝幹細胞としての機能を担っているのかについては不明である。

(2) 肝幹細胞の肝実質置換能力と肝傷害治療効果

上記の肝幹細胞もしくは誘導肝細胞は、肝傷害の治療に有効な細胞であると期待されており、さまざまな応用が試みられている。治療効果を発揮するためには、肝に生着した後にこれらの細胞が増殖し、肝実質の相当部分を置換するとともに肝細胞や胆管上皮細胞に分化することが必要である。しかし、現実的には、オーバル細胞を含めた肝幹細胞の移植による肝実質置換は、宿主肝に強い肝傷害が常に

加わっている条件でなければ効率良く起こらない。遺伝子改変マウス（フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ欠損）を用いた持続的肝傷害では、移植されたオーバル細胞の肝実質置換能力は成熟肝細胞とほぼ同程度であると報告されている³⁵⁾。宿主肝細胞の増殖をアルカロイドの一種であるレトロロシン（retrorsine）で持続的に抑制した状態で、成熟肝細胞、小型肝細胞、Thy1 陽性オーバル細胞を肝内移植したラットの実験では、移植細胞の長期的な置換効率は成熟肝細胞で最も高いと報告されている³⁹⁾。これは予想に反する結果であり、小型肝細胞やオーバル細胞では細胞老化が急速に進むことが一つの要因としてあげられている。

マウス ES 細胞もしくはこれらから誘導した肝細胞の傷害肝内への移植では、導入した細胞の約 5 分の 1 程度（10⁶ 個）が生着すると、四塩化炭素やジメチルニトロソアミン（dimethylnitrosamine）による肝傷害を有意に軽減する²⁵⁾。宿主肝内の微小環境も、幹細胞の生着、増殖、分化に影響を与える重要な因子である。四塩化炭素傷害肝において ES 細胞が効率的に肝細胞へ分化する現象は、傷害肝における FGF1, FGF4, HGF などのサイトカインの上昇と密接な関係があると考えられている²⁸⁾。

胎児肝幹細胞の一部（FLSPC）は、正常肝の実質を置換する能力が高く、移植 6 カ月で約 15% を置換しうると報告されている¹⁴⁾。そのメカニズムとして、移植幹細胞の高い増殖能力と低いアポトーシス頻度とともに隣接する宿主肝細胞に対するアポトーシスの誘導が推定されている〔細胞競合（cell competition）〕⁴⁰⁾。また、FLSPC は増殖抑制性に働くアクチビン A に対する感受性が成熟肝細胞よりも低いことが示されている⁴¹⁾。このような胎児肝幹細胞そのものを肝傷害の治療に適用することは難しいが、その高い実質置換能力の細胞機構を解明することは今後の細胞治療にとり重要であると考えられる。

(3) 肝傷害に伴う肝幹細胞の活性化および傷害の修復

種々の肝疾患や肝傷害において、胆管構造の異常な増加が起こる。この現象は、グリソン鞘周囲（ゾーン 1）にみられることが多く、小葉間胆管と肝細胞の間を結ぶ細い管腔構造である細胆管に類似した胆管の増生であることから、細胆管反応（ductular reaction）と呼ばれている。細胆管反応はオーバル細胞増殖、定型的細胆管反応、非定型的細胆管反応に分類されている⁴²⁾。定型的細胆管反応（type I）は、明瞭な管腔をもつ比較的形状のそろった細胆管の増加で、通常は急激な胆道閉鎖に伴って生ずる。一方、非定型的細胆管反応は不規則な形態を示す細胆管増生であり、炎症と線維化を伴い、ウイルス性肝炎、アルコール性肝傷害、原発性胆汁性肝硬変、通常の肝硬変などさまざまな慢性肝疾患で見られるが（type II）、特に劇症肝炎では肝細胞の変性・壊死に伴い広範囲に出現することが知られ

ている (type III)。

上記の通り、細胆管反応はほとんど常に肝線維化を合併している。非アルコール性脂肪(性)肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)において、細胆管増生が線維化を誘導する可能性が示唆されている⁴³⁾。増生する細胆管は Sox9 を発現しているが、興味深いことに、この転写因子には細胞外マトリックスの産生を促進する働きがあることが報告されている⁴⁴⁾。しかし、発生過程とのアナロジーからは、肝傷害に伴う線維化が細胆管形成反応を誘導していると解釈することも可能である。線維化が細胆管反応の原因か結果か、もしくは両者であるのかを明らかにすることは今後の重要な課題である。

定型的細胆管反応は既存の胆管上皮細胞の増生によるとのコンセンサスが得られているが、非定型的細胆管反応の成因に関してはいまだに議論が続いている。多くの研究者はこれをオーバル細胞増生と同様、傷害により活性化した肝幹細胞の再生性増殖と考えている。しかし、実験的に細胆管反応を起こさせた場合、これらのほとんどは胆管上皮への分化を示し、肝細胞に分化するものはごく少数に限られており^{10, 45)}、これらが条件的幹細胞 (facultative stem cell) として肝再生に実際上どの程度寄与しているかは必ずしも明確になっていない⁴⁶⁾。

一方、*in vivo* における明確な実験的証明は乏しいものの、病理学的な観察から、成熟肝細胞の細胆管上皮への化生 (細胆管化生) の結果である可能性も以前から指摘されてきた⁴⁷⁾。実際に、肝うっ血が長期間持続すると、中心静脈周囲に線維化が生じ、本来胆管や肝幹細胞の存在しないゾーン 3 において胆管特異的サイトケラチンを発現する intermediate hepatobiliary cell や細胆管が認められるようになる⁴⁸⁾。これは肝細胞が線維化とともに細胆管上皮に変化しうることを強く示唆している。

3. 成熟肝細胞と胆管上皮の間の相互可塑性

肝細胞は最終分化すると、その分化形質は固定され、胆管上皮細胞を含めた他の細胞に分化することはないとみなされてきた⁴⁹⁾。しかし我々は、細網線維からなる疎な間質に支えられ、細胞外マトリックスに乏しい特殊な環境で分化形質を維持している肝細胞が、線維化に伴ってコラーゲンの豊富な環境に置かれた場合に、分化異常が起こりうる考えた。この作業仮説を検証するために、我々はラット肝細胞凝集塊 (スフェロイド) を I 型コラーゲンゲル内に包埋する三次元培養系を用い、実験を行った⁵⁰⁾ (図 3)。肝細胞凝集塊は EGF (上皮増殖因子) とインスリンが存在する場合、ゲル内で樹枝状の細胞突起を伸ばし、長期間培養すると、基底膜を伴う管腔構造を形成する (図 3)¹⁹⁾。これらの細胞は、アルブミンや HNF4 α などの肝細胞の分化マーカーの発現を次第に失うとともに CK19 やオステオポ

ンチンなどの胆管上皮の分化マーカーを新規に発現する。また、この表現型の変化は腫瘍壊死因子 (TNF)- α により著明に促進される (図 3)⁵¹⁾。TNF- α は種々の肝疾患において上昇するサイトカインであり、病態の成立に深く関与していると考えられている⁵²⁾。TNF- α による樹枝状、管腔状の形態形成の促進の細胞内メカニズムとして、JNK-c-Jun 経路が重要であることを示唆するデータを得ている (Nishikawa ら、改訂中)。さらに我々は、マウス成熟肝細胞をコラーゲンゲル内で培養することにより、ラットとほぼ同様に、細胆管上皮もしくは胆管上皮へ分化転換させることが可能であることを確認している (Nagahama ら、投稿準備中)。

上記の培養系では、肝細胞は胆管上皮マーカーを発現するが、肝芽細胞もしくは肝幹細胞マーカーの Dlk を発現しないことから、脱分化というよりは分化転換 (細胆管化生) が起こっていると推定される¹⁹⁾。なお、ラット、マウスいずれにおいても正常肝細胞には Sox9 発現はほとんど認められないが、培養後すみやかに発現が亢進する (Sone ら、投稿中; Nagahama ら、投稿準備中)。このように Sox9 は必ずしも厳密な肝幹細胞マーカーではないと考えられ、これを肝幹細胞の指標として用いる場合、実験結果を解釈する上で十分に注意する必要がある。また我々は、発生期の幼若な胆管やオーバル細胞で特異的に発現する細胞間接着分子 SgIGSF (Nect-2) が、分化転換した肝細胞で発現することを見いだしている⁵³⁾。なお、我々のラット、マウスの実験系では使用した肝細胞分画内の胆管上皮や肝幹細胞の混入は事実上ほとんどなく、小葉中心部の肝細胞を選択的に採取した実験でも同様の結果が得られている。これらの培養実験は、肝細胞表現型は固定したものではなく、特にコラーゲン基質の増加や TNF- α などのサイトカインなどの微小環境の変化に応じ、可塑的であることを示している。

さらに我々は、肝細胞分化転換の可逆性を検討した。コラーゲンゲル内で分化転換したラット肝細胞を回収し、肝細胞の分化を促進することが知られている基底膜物質 (マトリゲル) 上に移し、無血清培養を行ったところ、デキサメサゾンとインターロイキン (IL)-6 もしくは OSM が培地に存在する場合、HNF-4 α をはじめとする肝細胞分化マーカー、形態、および mRNA 発現パターンが回復することが明らかになった (図 3) (Sone ら、投稿中)。マトリゲル上で培養されたマウス肝芽細胞が肝細胞に成熟するためには、デキサメサゾンと OSM が必要であることが報告されており⁵⁴⁾、胎生肝と成熟肝における肝細胞分化誘導の共通性が示唆される。以上の培養実験から肝細胞と胆管上皮細胞の間には微小環境の変化に応じた相互可塑性があることが明らかになった。

肝組織内で成熟肝細胞による胆管上皮様の分化転換が実

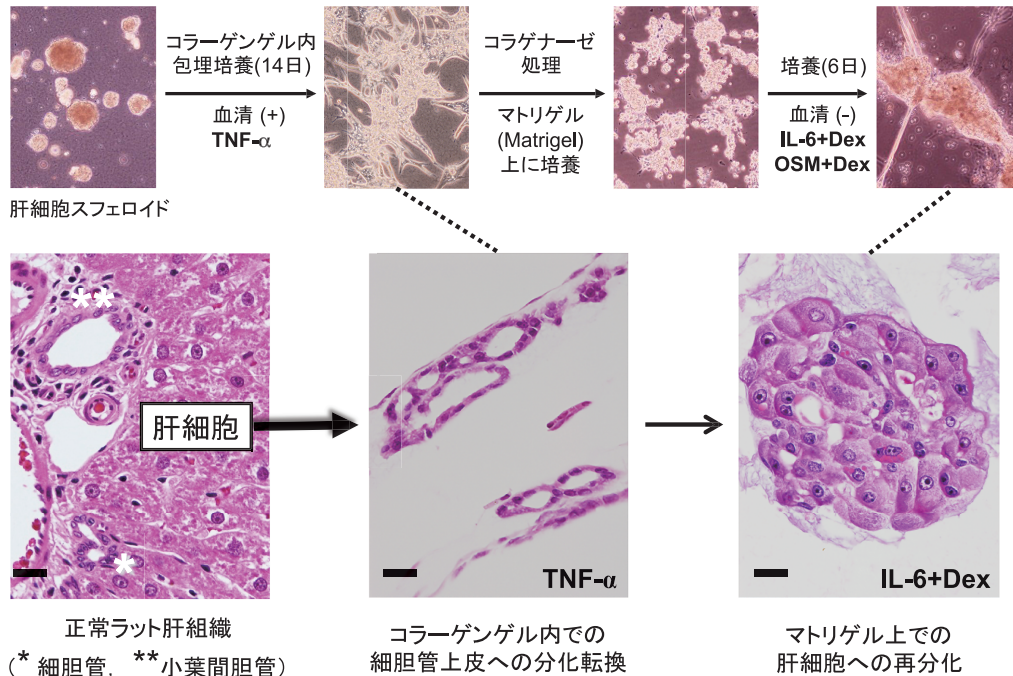


図3 肝細胞から胆管上皮への分化転換および肝細胞への再分化 (ラット肝細胞三次元培養モデル) ラット肝細胞を分離し、プライマリアディッシュ上でスフェロイドを形成させ、これらをコラーゲンゲルに包埋し、TNF- α 存在下で培養すると、小型細胞からなる細胆管様の管腔構造が誘導される。これらをゲルから回収し、マトリゲル上に移し、IL-6 (または OSM) と Dex とともに培養すると成熟肝細胞の形態が回復する。下段の写真 (HE 染色) は同一倍率で、スケールはいずれも 20 μ m である。

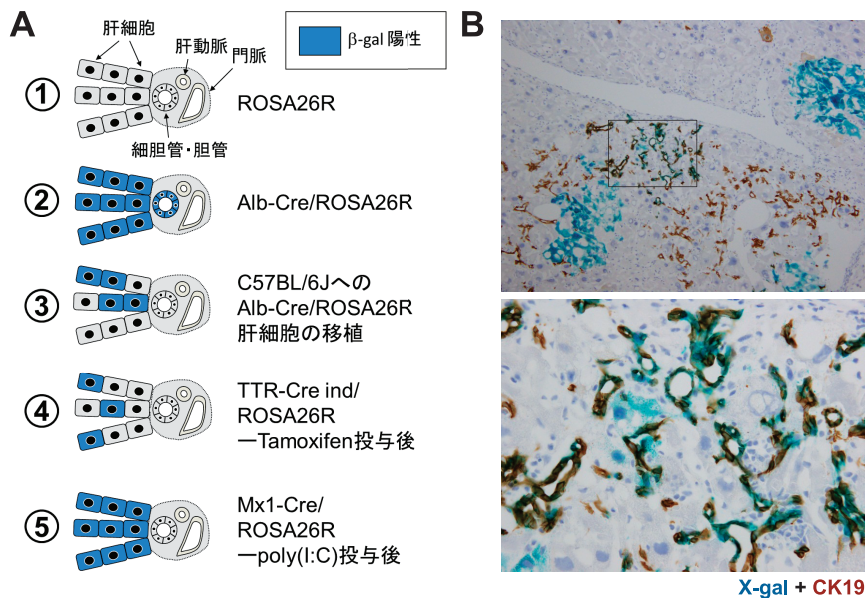


図4 遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 肝細胞追跡系

(A) ①Cre レポーターマウス ROSA26R: すべての細胞が β -gal 陰性. ②Alb-Cre/ROSA26R: 肝細胞と肝内胆管が β -gal 陽性. ③Alb-Cre/ROSA26R マウス肝細胞の C57BL/6J 肝への移植系: 生着肝細胞のみが β -gal 陽性. ④TTR-Cre ind: transthyretin (TTR) プロモーター依存性に Cre が発現するが, tamoxifen を投与後に初めて遺伝子組換えが起こり, 肝細胞の一部と細胆管の一部がラベルされる. ⑤Mx1-Cre/ROSA26R: poly(I:C) 投与後に Mx1 プロモーターが働き, 遺伝子組換えが起こり, ほとんど (>90%) の肝細胞がラベルされる (細胆管, 胆管はラベルされない). (B) Alb-Cre/ROSA26R マウス肝細胞の C57BL/6J 肝への移植実験. 四塩化炭素投与後 8 週間. X-gal 陽性の移植肝細胞のコロニーが多数形成されているが, 少なくとも一部に X-gal 陽性, CK19 陽性の肝細胞由来の細胆管反応 (type II) が認められる. 下パネルは上パネル内の枠で囲んだ部分の拡大像である.

際に起こりうるかについては議論が続いている⁵⁵⁾。マウス肝細胞の肝内移植を用いた実験では、DDCで誘導されるオールバル細胞は肝細胞由来ではないと結論されている³⁵⁾。一方、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) 陽性ラット肝細胞を DPPIV 陰性ラット肝に移植する実験系で、総胆管結紮後による肝傷害において、特に 4-4'-diaminodiphenylmethane (DAPM) による胆管傷害を加えた場合に、肝細胞由来の細胆管が出現することが示されている²⁰⁾。しかし、この系で移植肝細胞のマーカースとして用いられている DPPIV は胆管上皮に分化すると発現が低下するという難点がある。また、定型的細胆管反応の実験であり、しかも薬物により既存胆管上皮を傷害する特殊な条件での結果であることから、非定型的細胆管反応 (type II もしくは type III) における分化転換の証明にはなっていない。

分化転換の厳密な証明のためには、遺伝子組換えを利用した細胞系譜追跡系が有効である。マウスにおいては、Cre リコンビナーゼが発現した細胞が、遺伝子組換えにより β -ガラクトシダーゼ (β -gal) もしくは EYFP で標識される ROSA26R マウス⁵⁶⁾が開発されており、特定の種類の細胞を *in vivo* で追跡することが可能である。

我々はまず、アルブミン発現とともに Cre が発現する Alb-Cre マウスと ROSA26R マウスを掛け合わせた F1 マウスを検討した。この系では、一度でもアルブミンを発現した細胞はその後アルブミン発現を失っても β -gal を発現し続け、これらは X-gal 染色により明確に検出することができる。Alb-Cre/ROSA26R マウスの成熟肝では、肝細胞のみならず、すべての肝内胆管が X-gal 陽性であった (図 4 A)。これは肝内胆管がアルブミンを発現する段階まで肝細胞方向に分化した肝芽細胞 (すでに肝芽細胞のマーカースも消失しており、むしろ幼若な肝細胞と言った方が適切である) から発生し、胎生期の胆管上皮の形成も分化転換に近いことを示唆している。次に、我々は、Alb-Cre/ROSA26R マウス肝細胞を野生型 (C57BL/6J) マウス肝に移植する実験を進めた。肝細胞の増殖をレトロルシンにより抑制し、さらに 70% 部分肝切除を行った野生型マウスに対して β -gal 陽性肝細胞を移植すると、肝内に生着した肝細胞は数カ月後に大小のコロニーを形成する (図 4A)。このようなマウスに慢性四塩化炭素傷害を与えると、線維化が強く起こっている部位 (ゾーン 3) では CK19 陽性の細胆管反応の一部に X-gal 陽性所見が観察される (図 4B) (Nagahama ら、投稿準備中)。一般的にオールバル細胞の増生が起こると考えられている DDC モデルにおいても、一部に CK19 陽性、X-gal 陽性の細胆管が確認されている。また、肝細胞特異的な標識が可能な transthyretin (TTR)-Cre ind/ROSA26R⁵⁷⁾, Mx1-Cre/ROSA26R⁵⁸⁾を用いた実験でも同様の所見が得られている (図 4B) (Nagahama ら、投稿

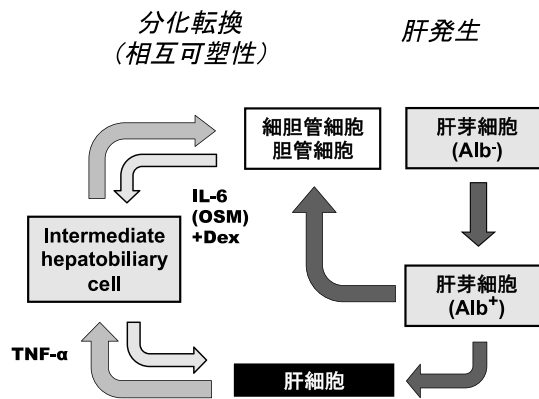


図 5 成熟肝における肝細胞と細胆管上皮の相互可塑性に関する我々の仮説

肝細胞は細胞外基質の変化 (線維化) やサイトカイン (特に TNF- α) の影響により細胆管上皮へと分化転換する。この変化はアルブミン (Alb) 陽性肝芽細胞から肝内胆管が発生するという発生学的知見とも矛盾しない。また、細胞外マトリックスの正常化や液性因子 (IL-6, OSM や Dex など) により、細胆管上皮を肝細胞へと再分化させることが可能である。

準備中)。これらの結果は、肝細胞が実際に傷害肝において細胆管に変化することを明確に証明している。最近、ROSA26R-EYFP マウスに TTR-Cre をアデノ随伴ウイルスにより発現させる実験系を用い、肝細胞は細胆管反応に関与しないとする論文が発表された⁴⁵⁾。慢性四塩化炭素傷害も用いられているが、提示されたデータから判断すると、ゾーン 3 の線維化の強い部分が十分に観察されていないように思われる。

4. お わ り に

我々は現在、肝細胞、胆管上皮細胞、肝幹細胞の相互関連を図 5 のようにとらえ、これらの分化調節メカニズムの検討を進めている。これまで、肝傷害を治療する上で、増殖能力が高い肝幹細胞を肝内で活性化させたり、肝外から導入するアプローチが注目されてきた。しかし、通常の幹細胞に匹敵する肝細胞の増殖性とその表現型の可塑性を念頭に置いた場合、肝細胞の分化状態を維持しながら増殖を誘導する、もしくは胆管上皮方向に分化転換した肝細胞に再分化させるための方策も重要であると考えられる。このためには、今後、肝細胞の増殖、分化状態を規定する分子メカニズムおよび肝微小環境 (細胞外マトリックス、クッパー細胞や星細胞などの非実質細胞) との相互作用などを解明していく必要がある。

文 献

- 1) Shiojiri, N. (1997) *Microsc. Res. Tech.*, 39, 328-335.
- 2) Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T., & Miyajima, A. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 1775-1786.

- 3) Fausto, N. & Campbell, J.S. (2003) *Mech. Dev.*, **120**, 117–130.
- 4) Jensen, C.H., Jauho, E.I., Santoni-Rugiu, E., Holmskov, U., Teisner, B., Tygstrup, N., & Bisgaard, H.C. (2004) *Am. J. Pathol.*, **164**, 1347–1359.
- 5) Tanimizu, N., Tsujimura, T., Takahide, K., Kodama, T., Nakamura, K., & Miyajima, A. (2004) *Gene Expr. Patterns*, **5**, 209–218.
- 6) Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V., Finegold, M.J., Geller, S.A., Gouw, A.S., Hytiroglou, P., Knisely, A.S., Kojiro, M., Lefkowitz, J. H., Nakanuma, Y., Olynyk, J.K., Park, Y.N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P.J., Strain, A.J., Thung, S.N., Wanless, I. R., & West, A.B. (2004) *Hepatology*, **39**, 1739–1745.
- 7) Jelnes, P., Santoni-Rugiu, E., Rasmussen, M., Friis, S.L., Nielsen, J.H., Tygstrup, N., & Bisgaard, H.C. (2007) *Hepatology*, **45**, 1462–1470.
- 8) Dorrell, C., Erker, L., Schug, J., Kopp, J.L., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Duncan, A.W., Finegold, M.J., Sander, M., Kaestner, K.H., & Grompe, M. (2011) *Genes Dev.*, **25**, 1193–1203.
- 9) Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T., & Uemoto, S. (2011) *Nat. Genet.*, **43**, 34–41.
- 10) Carpentier, R., Suner, R.E., van Hul, N., Kopp, J.L., Beaudry, J.B., Cordi, S., Antoniou, A., Raynaud, P., Lepreux, S., Jacquemin, P., Leclercq, I.A., Sander, M., & Lemaigre, F.P. (2011) *Gastroenterology*, **141**, 1432–1438.
- 11) Suzuki, A., Zheng, Y.W., Kaneko, S., Onodera, M., Fukao, K., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2002) *J. Cell Biol.*, **156**, 173–184.
- 12) Minguet, S., Cortegano, I., Gonzalo, P., Martinez-Marin, J.A., de Andres, B., Salas, C., Melero, D., Gaspar, M.L., & Marcos, M.A. (2003) *J. Clin. Invest.*, **112**, 1152–1163.
- 13) Nierhoff, D., Levoci, L., Schulte, S., Goeser, T., Rogler, L.E., & Shafritz, D.A. (2007) *Hepatology*, **46**, 535–547.
- 14) Oertel, M., Menthen, A., Chen, Y.Q., Teisner, B., Jensen, C. H., & Shafritz, D.A. (2008) *Gastroenterology*, **134**, 823–832.
- 15) Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., Kulik, M., Sherwood, S., Tallheden, T., Cheng, N., Furth, M. E., & Reid, L.M. (2007) *J. Exp. Med.*, **204**, 1973–1987.
- 16) Dan, Y.Y., Riehle, K.J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J., Campbell, J.S., & Fausto, N. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9912–9917.
- 17) Nowak, G., Ericzon, B.G., Nava, S., Jaksch, M., Westgren, M., & Sumitran-Holgersson, S. (2005) *Gut*, **54**, 972–979.
- 18) Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., & Grompe, M. (1997) *Am. J. Pathol.*, **151**, 1273–1280.
- 19) Nishikawa, Y., Doi, Y., Watanabe, H., Tokairin, T., Omori, Y., Su, M., Yoshioka, T., & Enomoto, K. (2005) *Am. J. Pathol.*, **166**, 1077–1088.
- 20) Michalopoulos, G.K., Barua, L., & Bowen, W.C. (2005) *Hepatology*, **41**, 535–544.
- 21) Oertel, M. & Shafritz, D.A. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 61–74.
- 22) Mitaka, T., Sato, F., Mizuguchi, T., Yokono, T., & Mochizuki, Y. (1999) *Hepatology*, **29**, 111–125.
- 23) Asahina, K., Shiokawa, M., Ueki, T., Yamasaki, C., Aratani, A., Taten, C., & Yoshizato, K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 1160–1167.
- 24) Kon, J., Ooe, H., Oshima, H., Kikkawa, Y., & Mitaka, T. (2006) *J. Hepatol.*, **45**, 90–98.
- 25) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Terada, M., & Ochiya, T. (2005) *Hepatology*, **41**, 836–846.
- 26) Gai, H., Nguyen, D.M., Moon, Y.J., Aguila, J.R., Fink, L.M., Ward, D.C., & Ma, Y. (2010) *Differentiation*, **79**, 171–181.
- 27) Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., & Duncan, S.A. (2010) *Hepatology*, **51**, 297–305.
- 28) Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Take-shita, F., Quinn, G., Okochi, H., & Ochiya, T. (2007) *Hepatology*, **46**, 219–228.
- 29) Oyagi, S., Hirose, M., Kojima, M., Okuyama, M., Kawase, M., Nakamura, T., Ohgushi, H., & Yagi, K. (2006) *J. Hepatol.*, **44**, 742–748.
- 30) Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsu-ura, A., Hamada, H., & Niitsu, Y. (2005) *Blood*, **106**, 756–763.
- 31) Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M., & Sokal, E.M. (2008) *Gastroenterology*, **134**, 833–848.
- 32) Sekiya, S. & Suzuki, A. (2011) *Nature*, **475**, 390–393.
- 33) Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X., & Hui, L. (2011) *Nature*, **475**, 386–389.
- 34) Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sul-livan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., & Goff, J.P. (1999) *Science*, **284**, 1168–1170.
- 35) Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., & Grompe, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (Suppl. 1), 11881–11888.
- 36) Thorgeirsson, S.S. & Grisham, J.W. (2006) *Hepatology*, **43**, 2–8.
- 37) Kakinuma, S., Asahina, K., Okamura, K., Teramoto, K., Taten, C., Yoshizato, K., Tanaka, Y., Yasumizu, T., Sakamoto, N., Watanabe, M., & Teraoka, H. (2007) *Transplant. Proc.*, **39**, 240–243.
- 38) Kuwahara, R., Kofman, A.V., Landis, C.S., Swenson, E.S., Barendswaard, E., & Theise, N.D. (2008) *Hepatology*, **47**, 1994–2002.
- 39) Ichinohe, N., Kon, J., Sasaki, K., Nakamura, Y., Ooe, H., Tani-mizu, N., & Mitaka, T. (2012) *Cell Transplant.*, **21**, 11–22.
- 40) Oertel, M., Menthen, A., Dabeva, M.D., & Shafritz, D.A. (2006) *Gastroenterology*, **130**, 507–520.
- 41) Menthen, A., Koehler, C.I., Sandhu, J.S., Yovchev, M.I., Hurston, E., Shafritz, D.A., & Oertel, M. (2011) *Gastroen-terology*, **140**, 1009–1020.
- 42) Alvaro, D., Mancino, M.G., Glaser, S., Gaudio, E., Marzoni, M., Francis, H., & Alpini, G. (2007) *Gastroenterology*, **132**, 415–431.
- 43) Richardson, M.M., Jonsson, J.R., Powell, E.E., Brunt, E.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Bhathal, P.S., Dixon, J.B., Welt-man, M.D., Tilg, H., Moschen, A.R., Purdie, D.M., Demetris, A.J., & Clouston, A.D. (2007) *Gastroenterology*, **133**, 80–90.
- 44) Hanley, K.P., Oakley, F., Sugden, S., Wilson, D.I., Mann, D. A., & Hanley, N.A. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 14063–14071.
- 45) Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D., & Willenbring, H. (2011) *J. Clin. Invest.*, **121**, 4850–4860.

- 46) Yanger, K. & Stanger, B.Z. (2011) *Dev. Dyn.*, **240**, 521–529.
 - 47) Desmet, V., Roskams, T., & Van Eyken, P. (1995) *Pathol. Res. Pract.*, **191**, 513–524.
 - 48) Desmet, V.J. (2011) *Virchows Arch.*, **458**, 261–270.
 - 49) Duncan, A.W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009) *Gastroenterology*, **137**, 466–481.
 - 50) Nishikawa, Y., Tokusashi, Y., Kadohama, T., Nishimori, H., & Ogawa, K. (1996) *Exp. Cell Res.*, **223**, 357–371.
 - 51) Nishikawa, Y. (2012) *Methods Mol. Biol.*, **826**, 153–160.
 - 52) Bradham, C.A., Plumpe, J., Manns, M.P., Brenner, D.A., & Trautwein, C. (1998) *Am. J. Physiol.*, **275**, G387–392.
 - 53) Ito, A., Nishikawa, Y., Ohnuma, K., Ohnuma, I., Koma, Y., Sato, A., Enomoto, K., Tsujimura, T., & Yokozaki, H. (2007) *Hepatology*, **45**, 684–694.
 - 54) Kinoshita, T., Sekiguchi, T., Xu, M.J., Ito, Y., Kamiya, A., Tsuji, K., Nakahata, T., & Miyajima, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7265–7270.
 - 55) Michalopoulos, G.K. (2011) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 173–179.
 - 56) Soriano, P. (1999) *Nat. Genet.*, **21**, 70–71.
 - 57) Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A., & Vasseur-Cognet, M. (2002) *Hepatology*, **35**, 1072–1081.
 - 58) Kuhn, R., Schwenk, F., Aguët, M., & Rajewsky, K. (1995) *Science*, **269**, 1427–1429.
-