

特集：肝臓の発生・再生

肝上皮細胞による組織構造形成

谷 水 直 樹, 三 高 俊 広

肝臓を構成する上皮細胞である肝細胞と胆管上皮細胞は、胎生中期に共通の前駆細胞である肝芽細胞から分化した後、それぞれに特徴的な細胞極性を獲得し、さらに肝細胞索と胆管という組織構造を形成して機能している。肝芽細胞からの分化過程が分子レベルで明らかになりつつあるのに比べて、肝細胞索や胆管の形成過程については不明な点が多く残されている。最近、ES細胞、iPS細胞のみならず皮膚などの体細胞からも、肝細胞を分化誘導することが可能であると報告されている。このような細胞が実際に機能するためには、組織構造を形成する必要があることから、肝臓発生過程での組織形成や維持機構を制御するメカニズムを解明することの重要性が高まっている。

1. はじめに

肝臓、肺、脾臓、腎臓、小腸、胃などの固形臓器は、細胞極性を持った上皮細胞によって構成されている。上皮細胞は、さらに3次元的な組織構造を形成することで、効率の良い物質交換を可能にしている。肝臓の上皮細胞である肝細胞と胆管上皮細胞は、それぞれ肝細胞索と胆管という組織構造を形成することで、肝臓の機能発現に寄与している。また、肝細胞は肝組織内での存在部位によって、異なる遺伝子発現を示し、特異的な機能を持つことが知られている (zonation)。最近、ES細胞、iPS細胞などの万能性幹細胞あるいは皮膚などの体細胞から、心筋・神経・血球・肝細胞など、様々な種類の細胞への分化誘導が可能であると報告されている。ところで、分化誘導して得られた細胞を体内あるいは体外で実際に機能させるためには、生体内の組織に取り込ませる、あるいは *in vitro* で組織を形成させることが必要である。しかしながら、現在のところ、外

来組織の生体内での再構築や *in vitro* での再現は非常に困難である。肝細胞や胆管上皮細胞は、他の臓器を構成する上皮細胞と比較して、①表面抗原の発現を指標に幹・前駆細胞を同定・単離することができる、②幹・前駆細胞から肝細胞および胆管上皮細胞へ分化させる培養系が確立されている、③培養系においても機能的・構造的な分化度を検討することが可能である、などの点で優れている。また生体内においても肝上皮細胞特異的あるいは線維芽細胞特異的に遺伝子を欠失させるシステムが整っているなどの点から、肝上皮細胞の組織構造形成の研究は、肝細胞が機能的な細胞・組織を形成する過程を理解することだけでなく、上皮細胞による組織形成過程を制御する共通の分子メカニズムを理解するためのモデルとしても優れている。

我々は、主に培養系を用いて組織構造形成についての研究を行ってきた。本稿では、生体内での肝組織形成に触れながら、培養系を用いた解析結果を示し、肝臓における組織構築を制御する分子メカニズムについて論じたい。

2. 上皮細胞の構造的な特徴

生体内には、様々な種類の上皮細胞が存在している。分化した上皮細胞は、細胞間に密着結合 (tight junction) や接着結合 (adherence junction) などの接着装置を発達させて、その両側に組成の異なる膜ドメイン、すなわち管腔に面した頂端 (apical) 面と隣接細胞および細胞外マトリックスに面した側底 (basolateral) 面を有する。細胞間接着

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門 (〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目)
Tissue morphogenesis of liver epithelial cells
Naoki Tanimizu and Toshihiro Mitaka (Department of Tissue Development and Regeneration, Research Institute for Frontier Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine, South 1, West 17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556, Japan)

が発達した上皮細胞シートが形成されることによって、体内と体外に通じる環境の間に境界が生じ、細菌やウイルスなどの外部から体内への侵入を防ぎ、様々なトランスポーターやチャンネルを頂端面および側底面の膜上に配置することで、方向性を持った物質輸送を可能にしている。ところで、臓器としての機能を効率良く発揮するためには、細胞極性を形成した上皮細胞がさらに立体的な組織構造を形成する必要がある。生体内では、この組織構造が機能単位となり、臓器の機能が成立している。例えば、小腸の微絨毛では、頂端面から消化された栄養物質を取り込み、それを基底側の毛細血管へ運搬する。腎臓では、尿細管の両側で血液と尿との間とのイオンや水の交換を行っている。肺では、肺胞において血液と空気の間で酸素と二酸化炭素の交換が行われている。

3. 肝臓の組織構造

肝臓は、生体の代謝反応の中心を担う重要な臓器である。肝臓の上皮細胞である肝細胞と胆管上皮細胞は、胎生後期に肝芽細胞と呼ばれる胎生肝幹細胞から分化する。肝細胞は糖・脂質代謝など肝臓の機能を担う実質細胞であり、一方の胆管上皮細胞は肝細胞が分泌する胆汁の流量、イオン濃度、pHなどを調整する役割を担っている。いずれの細胞も、機能的に分化・成熟するとともに、それぞれに特徴的な細胞極性を獲得する。肝細胞は隣接する細胞間に頂端面（毛細胆管）を形成し、側底面には明確な基底膜が観察されない（図1の左）。胆管上皮細胞の頂端面は管腔に面しており、側底面は細胞外マトリックスからなる基底膜に接している（図1の右）。さらに、細胞極性を獲得した肝細胞は一列に並んで肝細胞索を形成する。肝細胞の基底膜側にあたる類洞膜面はDisse腔と呼ばれる空間に面しており、星細胞と近接している。その外側に存在している類洞内皮細胞は類洞を形成し、窓構造を持つことで、肝細胞と血液の物質交換を容易にしている（図2の左）。一方、胆管上皮細胞は管状の胆管を形成し、その周囲を線維芽細胞が取り囲んでいる（図2の右）。肝細胞索の中心にある毛細胆管と胆管は連続しており、十二指腸へ胆汁を排泄するための流路を形成している。肝細胞索や胆管が正常

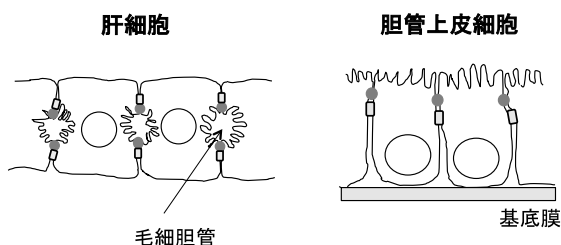


図1 肝細胞と胆管上皮細胞の細胞極性
肝細胞と胆管上皮細胞間に形成される密着結合(●)と接着結合(□)を模式的に表した。

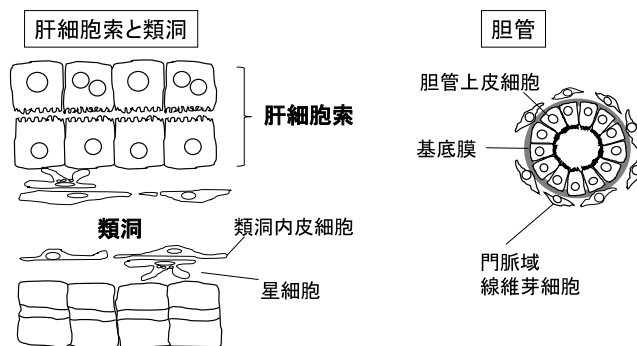


図2 肝臓の組織構造

肝細胞は肝細胞索を形成し、さらに類洞内皮細胞および星細胞とともに肝臓に特徴的な血管構造である類洞を形成する。胆管上皮細胞が形成する胆管は線維芽細胞に裏打ちされている。

に形成されて機能するためには、様々な細胞との相互作用も重要であると考えられる。

4. 肝臓の組織構造を研究するための手法

組織は立体的な構造を持っていることが特徴であるため、組織構造の形成過程を研究するためには、本来、平面的な解析でなく、立体的な解析を行う必要がある。近年、様々な機器・手法が開発され、組織・臓器の切片から3次元構造を再構築したり、組織・臓器のまま3次元的に観察・解析したりすることが可能になってきている。臓器発生の研究では、マウスなどの実験動物を用いることが多いが、ノックアウトマウスなどにおいて組織・臓器に異常が見られた場合にも、このような3次元的な構造解析手法を用いることで、組織・臓器形成における特定の分子の機能をより詳細に解析することが可能である。細胞種特異的にCreリコンビナーゼあるいはタモキシフェン存在下で活性化するCre-ERT2を発現するマウスを用いて、時間・空間特異的にノックアウトマウスを作製することで、特定の遺伝子の組織形成における機能を経時的に解析することも可能になっている。

しかしながら、マウス個体を使って、組織の構造形成の過程をリアルタイムで解析することは難しい。ゼブラフィッシュやメダカでは、個体を使って臓器発生を可視化することは可能であるが、魚類と哺乳類では組織構造が異なるなどの問題点がある。一方で、細胞を平面的に培養しても、立体的な組織構造を再現することはほぼ不可能である。そこで、*in vitro*において細胞を立体的に培養する方法が注目される。細胞外マトリックスタンパク質を主成分とするゲルに埋め込んで上皮細胞を培養する（3次元培養）、あるいは、複数の細胞種を膜の両面で培養するなどの方法により、組織構造の一部を再現することが可能である。このような培養系の長所は、分子レベルでの解析を比較的容易・迅速に行うことができる点と構造形成の過程を

リアルタイムで追跡できる点である。

5. 肝細胞による組織構造の形成

肝細胞は胎仔期には造血機能を担っているが、出生を境に急速に代謝機能を獲得する。それに伴って、細胞極性を獲得し、胆汁を排泄する毛細胆管構造を発達させる。肝細胞が形成する組織構造である肝細胞索は、一層から二層の細胞層である。門脈から中心静脈にかけてこの細胞索が続いているが、その部位によって代謝酵素などの発現が異なり (zonation), 細胞が存在している部位の環境に適応して効率良く代謝反応が進む仕組みになっている。

1) 毛細胆管の構造形成を制御する分子

密着結合の裏打ちタンパク質である ERM (ezrin-radixin-moesin) ファミリーに属する radixin のノックアウトマウスは、高ビリルビン血症となる。ノックアウトマウスの肝臓では、野生型の場合と同様に、肝細胞間に毛細胆管が形成される。ところが、通常、毛細胆管膜上に局在する MRP2 (multidrug resistance protein 2, abcc2) の発現が消失しており、微絨毛も形成されないために、胆汁排泄が異常になると考えられている¹⁾。

LKB1 は、細胞極性を制御する因子として知られている。肝細胞特異的に Cre リコンビナーゼが発現する Alb-Cre マウスと LKB1^{flox/flox} マウスの交配によって LKB1 を肝細胞特異的にノックアウトすると、肝細胞間に管腔構造が形成されない²⁾。ノックアウトマウスでは、本来、毛細胆管膜面に局在している BSEP (bile salt export pump, abcb11) が細胞内にとどまっているために、胆汁酸が毛細胆管に排出されない。そのために、細胞質における胆汁酸の濃度が上昇し、肝細胞の壊死が起こる。LKB1 ノックアウトマウスの肝臓では、上述した radixin の発現にも異常が見られ、管腔形成異常は radixin の発現消失が原因である可能性も考えられる。

Wnt/ β -カテニンシグナルは、肝細胞の毛細胆管膜の微絨毛の形成や管腔のサイズ調節に関わっていることが報告されている³⁾。また、新生児魚鱗癬および硬化性胆管炎 (Neonatal ichthyosis and sclerosing cholangitis (NISCH)) の原因遺伝子である Claudin1 (Cldn1) は、肝細胞間の密着結合の成熟化に必要であり、胆管系からの胆汁の漏出を防いでいると考えられている⁴⁾。

2) 毛細胆管の形成プロセス

上述したように、遺伝病やノックアウトマウスの解析から、毛細胆管形成に関わる遺伝子が明らかになってきている。肝臓の組織を密着結合構成分子である ZO1 や occludin で染色すると、肝細胞間に 2 本の筋状のシグナルが検出される。これは、細胞間に毛細胆管構造が形成されているか

らである (図 3 の 1)。このようなシグナルの検出様式は、胎生後期の肝細胞間にも部分的に観察される。したがって、肝細胞の細胞極性は出生前にある程度形成され、次第に毛細胆管のネットワークが形成されるのではないかと考えられる。しかしながら、発生過程で毛細胆管の構造がどのようなプロセスを経て形成されていくのかは、いまだに不明な点が多い。

肝芽細胞を *in vitro* で培養し、デキサメタゾンとオンコスタチン M (OSM) を添加すると肝細胞への分化を誘導することができる。この時、OSM によって活性化される K-Ras 依存的に接着結合が形成される (図 3 の 2A①)⁵⁾。さらに Matrigel を重層して分化を促進すると、毛細胆管様の構造が形成される (図 3 の 2A②)。

ヒトの肝がん細胞株 HepG2 細胞を培養すると、一部の細胞で頭頂部付近と底面付近の二か所に密着結合が観察される (図 3 の 2A④)、細胞間には両細胞の膜が入り組んだような構造が観察される (図 3 の 2A⑤)。さらに、SMP30 (senescence marker protein-30) を導入すると、細胞間に微絨毛を伴った間隙 (管腔) が形成される (図 3 の 2A⑥) ことが報告されている⁶⁾。

ラット肝がん細胞株とヒト線維芽細胞株を融合して作成された WIFB9 細胞は、培養を行うと、自発的に毛細胆管様の構造を形成する。WIFB9 細胞では、Par1b/MARK2 (microtubule association related kinase 2)/EMK1 が強く活性化されている。さらに、イヌ腎臓由来の上皮細胞株 MDCK 細胞に Par1b を過剰に発現させると、微小管に沿ったタンパク質輸送が、縦方向から横方向に変化し、上皮細胞極性が肝細胞型へ変化することが報告されている (図 3 の 2A②)⁷⁾。

毛細胆管の形成が起こった後に、さらにネットワークが形成される過程については、胆汁酸の関与が報告されている。ラット肝細胞のコラーゲンサンドウィッチ培養を行うと、毛細胆管様の構造が誘導される。さらに、胆汁酸の一つであるタウロコール酸 [Taurocholate (TC)] を添加することで、毛細胆管構造のネットワーク形成が促進されることが報告されている。TC は、cAMP $\rightarrow$ EPAC $\rightarrow$ LKB1 $\rightarrow$ AMPK のシグナルを活性化し、毛細胆管形成を促進する (図 3 の 2B)⁸⁾。我々がやっているマウス新生仔期や成体の肝前駆細胞の培養においても、Matrigel を重層することで毛細胆管様の構造が観察される。さらに、TC を添加すると、毛細胆管様の構造が発達し、FDA (fluorescent diacetate, 二酢酸フルオロセイン) を培地中に添加すると、代謝産物であるフルオロセインが毛細胆管様の構造に蓄積する様子を観察することができる (図 3 の 3)。

以上のことから、肝細胞は分化に伴い最初に典型的な上皮型細胞極性を形成した後、肝細胞型の細胞極性に変化する (①~③の経路) か、あるいは、肝細胞型の細胞極性を

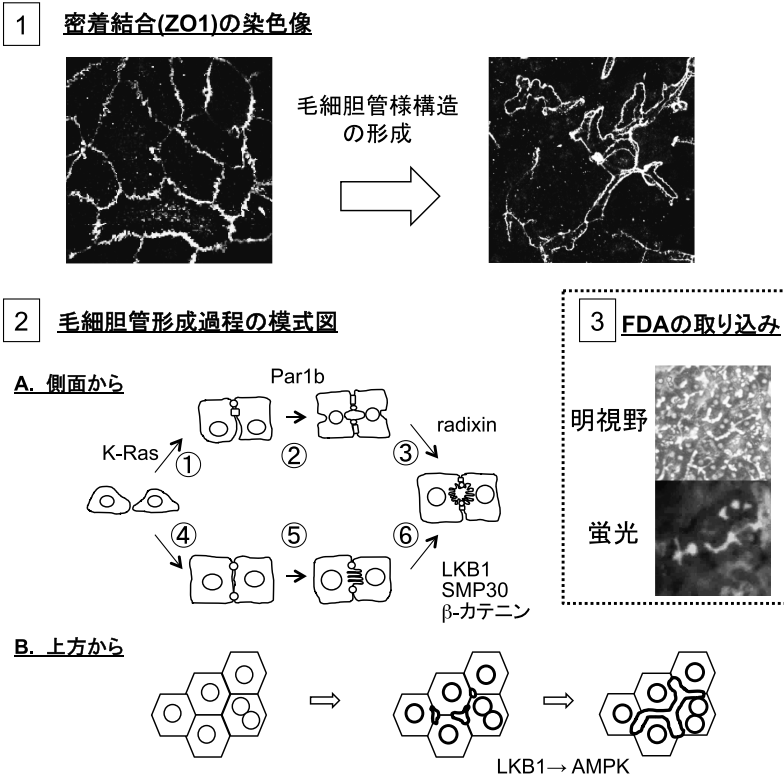


図3 肝細胞の毛細胆管構造の形成

毛細胆管構造が肝細胞間に形成されると、ZO1は2本の筋状に染色される(1)。肝細胞間に形成された毛細胆管は、肝組織形成の過程で、さらにネットワークを形成する(2)。毛細胆管様構造のネットワークが形成されると、FDA (fluorescein diacetate) の代謝産物であるフルオレセインが管腔構造内に蓄積する様子を観察することができる(3)。

直接形成し、その後毛細胆管構造が発達する(④～⑥の経路)か、いずれかの過程を経て毛細胆管を形成し、その後、胆汁酸などの作用により毛細胆管のネットワークを発達させるのではないかと考えられる。

3) 肝細胞索形成における他の細胞との相互作用

ラットの成体肝前駆細胞である小型肝細胞は、Matrigel重層によって毛細胆管構造を形成するが、非実質細胞との相互作用によって、より発達した毛細胆管構造を形成する⁹⁾。したがって、生体内においては、肝細胞と非実質細胞の相互作用が肝細胞の索状構造形成に寄与していることが予想される。最近、肝前駆細胞、内皮細胞、星細胞の三者を共培養すると、類洞構造の形成が促進されることがわかった¹⁰⁾。肝細胞転写因子の一つHNF4αの肝臓特異的ノックアウトマウスでは、密着結合関連分子やEカドヘリンの発現が低下して肝細胞間の接着が異常となるが、その結果、類洞構造も正常に形成されない¹¹⁾。ゼブラフィッシュを用いた研究では、血管のネットワークが正常に形成されない変異体において、肝細胞の極性が異常になることが報告されている¹²⁾。以上のことから、生体内において

は、肝細胞索の形成と類洞の形成が、肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞の細胞間相互作用によって制御されていると考えられる。

4) 肝臓の小葉構造の zonation の形成

肝細胞は、門脈から中心静脈にかけての小葉内の位置によって、異なる遺伝子発現パターンおよび代謝機能を持っている(zonation)。例えば、尿素合成に関わるカルバモイルリン酸シンターゼI (Carbamoylphosphate synthetase I, CPSI)、糖新生に関わるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)などの酵素群は門脈周囲に強く発現しているし、グリコーゲン分解や脂肪合成に関わる酵素群は中心静脈周囲に強く発現し、アンモニア代謝に関わるグルタミンシンターゼ (Glutamine synthetase, GS) は中心静脈周囲の一、二層の細胞にのみ限局して発現している。肝臓では、血液は門脈および肝動脈から流入し、中心静脈へ流れ込む。したがって門脈から中心静脈にかけて酸素の濃度勾配が形成されることになる。上記の遺伝子発現・代謝機能の違いは、門脈域で好気性代謝、中心静脈域では嫌気性代謝が盛んである

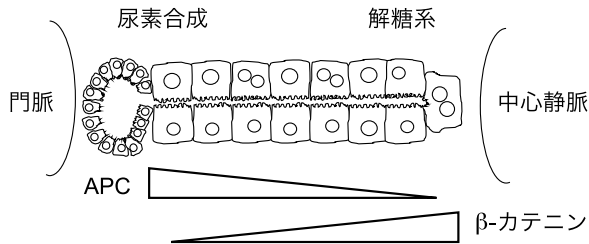


図4 肝臓の zonation

Wnt/ β -カテニンシグナルの正の制御因子 β -カテニンと負の制御因子 APC が、それぞれ中心静脈付近と門脈付近で発現しているため、小葉内の位置によって Wnt/ β -カテニンシグナルの強度に違いが生じる。

ことを示しており、zonation は酸素の濃度勾配によって形成されるものであるとも考えられる。一方で、最近、肝細胞の zonation が Wnt/ β -カテニンシグナルによって制御されていることが相次いで報告されている。 β -カテニンのノックアウトマウスでは、本来中心静脈域に発現している GS やグルコーストランスポーター 1 (Glut-1) などの発現が消失する¹³⁾。一方、Wnt シグナル伝達系の抑制因子である adenomatous polyposis coli (APC) のノックアウトマウスでは、門脈域の CPSI の発現が消失する一方、GS が小葉全体で発現するようになる¹⁴⁾。以上の結果は、Wnt/ β -カテニンのシグナルの強度によって肝細胞の遺伝子発現パターンが決定され、その結果、門脈から中心静脈にかけての zonation が形成されることを示している (図4)。現在までに、どの細胞種がどの Wnt リガンドを発現しているのかはわかっていないので、今後の研究が待たれる。

6. 胆管の構造形成

肝臓の胆管は、門脈の周囲に特異的に形成される。胆管上皮細胞は胎生中期に肝芽細胞から分化するが、その過程は主に Notch シグナル^{15,16)}と TGF β シグナルに制御されていることがわかっている (図5と図6)。これに対して、胎生後期から新生仔期にかけて進行する胆管の構造形成については、まだ不明な点が多い。

1) 肝発生における胆管構造の形成過程

胆管は、膵臓の膵管、腎臓の集合管、精巣の精細管、唾液腺などと同様に樹枝状の構造を持つ組織構造である。これらの樹枝状構造の形成 (tubulogenesis) の過程は様々である。集合管や唾液腺などは、先端が次々に分岐を作りながら樹枝状の管腔構造を形成する (branching morphogenesis)。これに対して、胆管の形態形成は運命決定された胆管上皮細胞が門脈の周囲に形成する一層の細胞層 (ductal plate) から始まり、管腔構造が形成されて、最終的に樹枝状の構造が完成する (図5の1~4)。胎仔期および新生仔期の肝臓切片を解析することで提示された胆管の形成過程

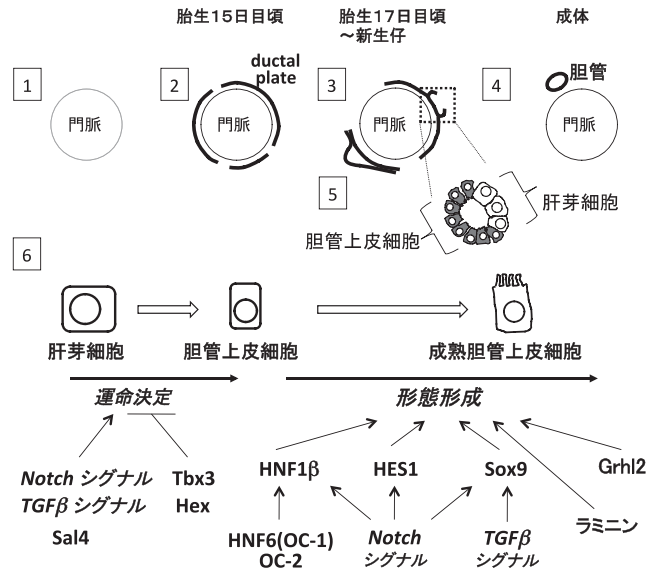


図5 胆管形成のプロセスおよび制御メカニズム

胆管の発生過程を模式的 (1~4) で示した。胆管形成の過程で観察される非対称な構造は別途示した (5)。胆管上皮細胞の運命決定、形態形成には様々な分子が関わっていることがわかっている (6)。

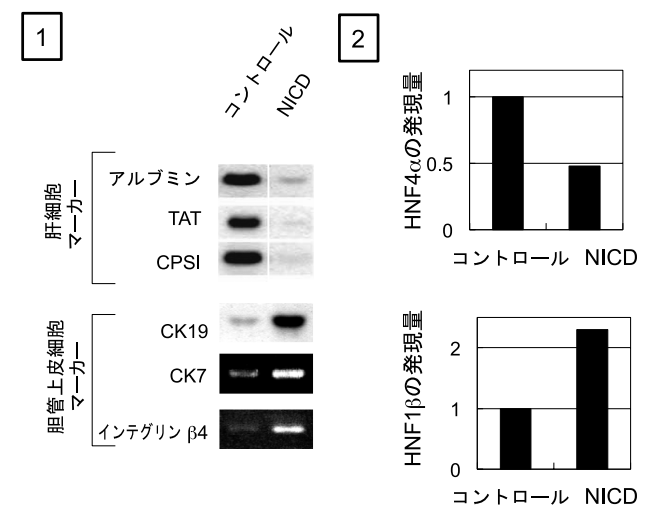


図6 Notch シグナルによる胆管上皮細胞への分化促進

肝芽細胞に NICD (Notch の細胞内ドメイン) を導入することで Notch シグナルを活性化すると、肝細胞マーカーの発現が抑制され、胆管上皮細胞マーカーの発現が誘導される (1)。この時、Notch シグナルの活性化により、肝芽細胞において、肝細胞特異的な転写因子である HNF4 α の発現が抑制され、胆管上皮細胞特異的な転写因子である HNF1 β の発現が誘導される (文献 16 の図を改変)。

のモデルでは、一層の細胞層であった ductal plate が二層となり、細胞層の間に管腔が形成され、それが最終的に管状の構造が形成される。しかしながら、最近の研究によって、新たな胆管形成過程のモデルが提唱されている。Antoniou ら¹⁷⁾は、Sox9 の肝臓特異的なノックアウトマウスで胆管形成が遅延していることを見いだした。このマウスの解

析の過程で、非対称な構造を持った未熟な胆管構造が存在することがわかった。非対称な胆管構造では、一つの管腔構造の門脈側にはサイトケラチン 19(+)/Sox9(+)/HNF4 α (-)の胆管上皮細胞が存在し、その対面にはサイトケラチン 19(-)/Sox9(-)/HNF4 α (+)の肝芽細胞が存在している(図5の5および図7の2)。Zongら¹⁵⁾は Notch シグナル関連分子のノックアウトマウスを用いた解析を行い、Antoniouらと同様に胆管の形成途上には非対称な構造が存在することを報告している。彼らは電子顕微鏡による解析も行い、非対称な管腔構造が胆管上皮細胞と肝芽細胞から形成されていることを確認している。彼らが提唱している胆管形成のモデルは、まず非対称な構造が形成され、その後実質側の肝芽細胞が TGF β や Notch シグナルの作用を受けて、順次、胆管上皮細胞へと分化することによって、対称な胆管構造が形成されるというものである。

最近、lineage tracing の手法を用いて胎仔期の ductal plate をラベルし、その後の運命をたどると、ductal plate の細胞は、①胆管、②ヘリング管、③門脈周囲の肝細胞、の3種類の細胞へと分化していた¹⁸⁾。一方、非対称な構造からの胆管形成が起こるとした場合、胆管の中に Sox9 でラベルされた細胞(胎仔期にすでに胆管上皮細胞に運命決定していた細胞)とラベルされない細胞(構造形成の過程で胆管上皮細胞に分化した細胞)で構成される胆管が見られるはずであるが、実際このような胆管構造が見られるのかどうか、現在のところは不明である。

我々は、肝前駆細胞 HPPL の3次元培養系を用いて、管腔形成についての研究を行っている。肝前駆細胞株 HPPL は、肝芽細胞から樹立した細胞株で、培養条件を変えることで肝細胞および胆管上皮細胞に分化する性質を持っている¹⁹⁾。HPPL が単層を形成した後に I 型コラーゲンと Matrigel を混合したゲルを重層すると、管腔構造が形成される²⁰⁾。サンドウィッチ培養における管腔形成には、Akt シグナルや生体の胆管上皮細胞に強く発現している転写因子 HNF1 β が関与している。

2) 胆管の管腔形成を制御するメカニズム

胆管の管腔が形成されない胆管は閉塞し、管腔が異常に拡張すると多嚢胞症となり、いずれの場合も重篤な肝疾患に至る。したがって、胆管形成過程では、管腔サイズが正確に制御される必要がある。

HPPL を、Matrigel を含むゲル中で培養すると、中央に管腔構造を持った cyst を形成する²¹⁾。cyst を形成する HPPL は、胆管上皮細胞のマーカーを発現し、管腔への低分子化合物の分泌能を持つなど、胆管上皮細胞としての性質を備えている。Matrigel の主成分の一つであるラミニン 111 ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$) は管腔形成に必須であり、HPPL は $\beta 1$ インテグリンを介してラミニンと相互作用している(図7の

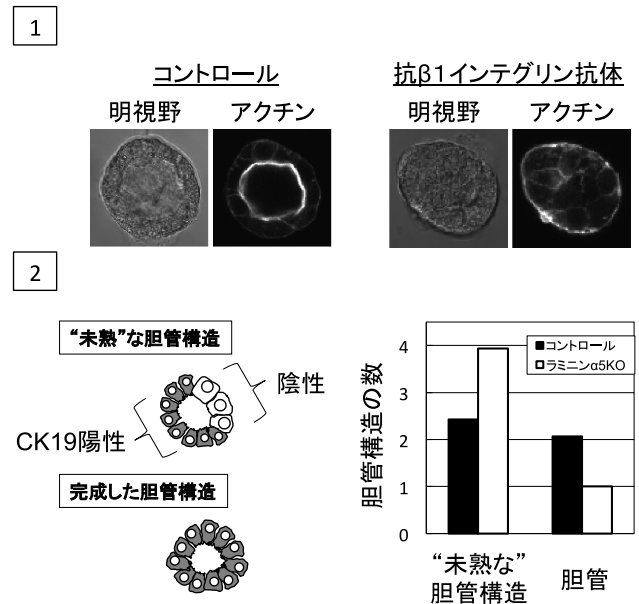


図7 胆管構造形成におけるラミニンの役割

肝前駆細胞株の3次元培養では、ラミニン依存的に管腔が形成される(1の左)。インテグリンの中和抗体を添加することにより細胞とラミニンの相互作用を阻害すると、Fアクチンに裏打ちされた管腔構造が形成されない(1の右)。ラミニン $\alpha 5$ のノックアウトマウスでは、胆管の形成遅延が認められる。未熟な胆管構造の数が増加し、CK19(サイトケラチン 19)陽性細胞(灰色で示した細胞)に囲まれた胆管の数が減少している。

1)。また、ラミニン $\alpha 5$ 鎖のノックアウトマウスの肝臓では、残存する $\alpha 1$ 鎖を含むラミニン(ラミニン 111)の存在によって肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化に異常は認められないが、胆管構造形成が遅延している(図7の2、文献22))。以上のように、胆管上皮細胞とラミニンの相互作用は、胆管の構造形成において重要な役割を担っている。

ところで、HPPL が形成する cyst 構造は成体の胆管上皮細胞が形成するものと比べると管腔が小さく未発達である。我々は、肝芽細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、管腔サイズを調節する因子の同定を試みた(図8の1)。胆管上皮細胞特異的な発現パターンを示す遺伝子を HPPL に導入し、管腔構造の変化を調べた。その結果、転写因子 Grhl2 (grainyhead-like 2) が、管腔構造を大きく発達させることがわかった(図8の2)。Grhl2 のターゲット遺伝子として同定した Cldn3, Cldn4 および Rab25 は、管腔構造の発達に関わっており、また、Rab25 は Cldn4 の密着結合への局在を促進していることも明らかになった。我々は、Grhl2 が Cldn 分子の発現および局在を制御することで胆管上皮細胞の密着結合を機能化し、管腔構造形成を促進していると考えている²³⁾。

最近、ゼブラフィッシュにおいて、Cldn15-like b (Cldn15lb) の変異体では胆管上皮細胞がクラスターを形成した状態のままとどまり、胆管のネットワークが正常に

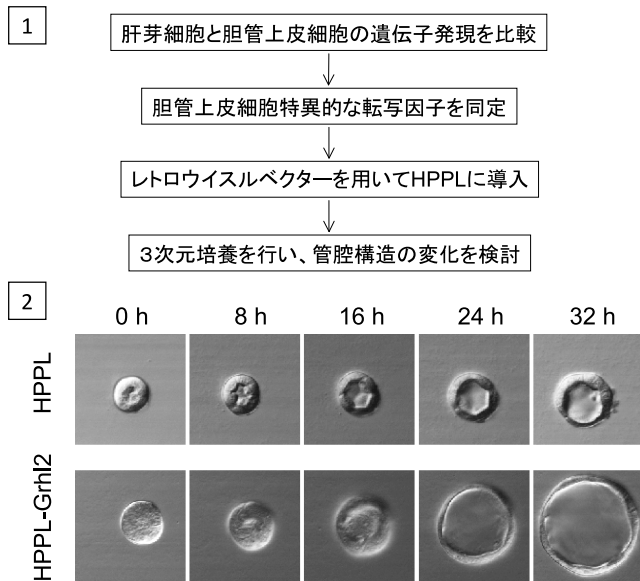


図8 転写因子 Grh12 による管腔サイズの調節

管腔構造形成に関わる転写因子の同定に用いた方法を簡単に示した(1)。胆管上皮細胞特異的な転写因子 Grh12 (grainyhead like 2) を HPPL に導入し、培養開始後 2.5 日目から、顕微鏡下で形態の変化を観察した。コントロールの細胞に比較して、Grh12 を発現する細胞は大きく発達した管腔構造を形成する(2)。

形成されないことが報告された²⁴⁾。したがって、胆管上皮細胞が密着結合を発達させることは、管腔形成を促進するだけでなく、胆管の樹枝状構造の形成にも必要であると考えられる。

7. 肝臓の組織構造形成研究の今後

ノックアウトマウスを中心に *in vivo* の動物モデルを用いた解析が組織形成研究の主流となりつつある。一方で、*in vitro* の解析も工夫が重ねられ、より生体内での環境を模倣したような培養系、すなわち 3 次元培養系や様々なデバイスを用いた培養系が開発されている。今後は、*in vivo* および *in vitro* の実験系を目的別に使い分けることも必要になるであろう。最近、組織幹細胞、iPS 細胞、ES 細胞から各種の細胞が誘導されるだけでなく、他の細胞との相互作用無しに、生体内の組織構造に類似した構造体を形成することが報告されている²⁵⁾。肝臓の肝幹・前駆細胞の研究が進んできていること、また、体細胞からの肝細胞の誘導も可能になっている²⁶⁾ことから、肝臓の系においてもミニ肝組織の誘導が可能になることが期待される。しかしながら、肝臓の組織形成については、いまだ不明な点も多く残されている。例えば、胆管と肝細胞の結合はどのように形成されるのだろうか。肝幹細胞が、肝細胞と胆管上皮細胞を供給するのであれば、幹細胞の存在部位を中心に胆管と肝細胞の連結が保たれたまま、両細胞が新たに分化・供給されていくのだろうか。あるいは、別々に形成さ

れた胆管と肝細胞索が、後に結合するのだろうか。このような肝臓の組織構造の形成様式には、肝幹細胞の存在する場所や、幹細胞からの肝細胞および胆管上皮細胞の供給様式も深く関わっていると考えられる。発生過程のプロセスやそれを制御するメカニズムの研究や肝幹細胞についての研究が進むことで、*in vitro* で肝組織を再現する道も開けるだろう。

文 献

- 1) Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., & Tsukita, S. (2002) *Nat. Genet.*, **31**, 320–325.
- 2) Woods, A., Heslegrave, A.J., Muckett, P.J., Levene, A.P., Clements, M., Mobberley, M., Ryder, T.A., Abu-Hayyeh, S., Williamson, C., Goldin, R.D., Ashworth, A., Withers, D.J., & Carling, D. (2011) *Biochem. J.*, **434**, 49–60.
- 3) Yeh, T.H., Krauland, L., Singh, V., Zou, B., Devaraj, P., Stolz, D.B., Franks, J., Monga, S.P., Sasatomi, E., & Behari, J. (2010) *Hepatology*, **52**, 1410–1419.
- 4) Grosse, B., Cassio, D., Yousef, N., Bernardo, C., Jacquemin, E., & Gonzales, E. (2012) *Hepatology*, **55**, 1249–1259.
- 5) Matsui, T., Kinoshita, T., Morikawa, Y., Tohya, K., Katsuki, M., Ito, Y., Kamiya, A., & Miyajima, A. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1021–1030.
- 6) Ishigami, A., Fujita, T., Inoue, H., Handa, S., Kubo, S., Kondo, Y., & Maruyama, N. (2005) *Cell Tissue Res.*, **320**, 243–249.
- 7) Cohen, D., Brennwald, P.J., Rodriguez-Boulan, E., & Musch, A. (2004) *J. Cell Biol.*, **164**, 717–727.
- 8) Fu, D., Wakabayashi, Y., Lippincott-Schwartz, J., & Arias, I. M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1403–1408.
- 9) Mitaka, T., Sato, F., Mizuguchi, T., Yokono, T., & Mochizuki, Y. (1999) *Hepatology*, **29**, 111–125.
- 10) Kasuya, J., Sudo, R., Mitaka, T., Ikeda, M., & Tanishita, K. (2011) *Tissue Eng. Part A*, **17**, 361–370.
- 11) Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K.H., Rossi, J.M., Zaret, K.S., & Duncan, S.A. (2003) *Nat. Genet.*, **34**, 292–296.
- 12) Sakaguchi, T.F., Sadler, K.C., Crosnier, C., & Stainier, D.Y. (2008) *Curr. Biol.*, **18**, 1565–1571.
- 13) Sekine, S., Lan, B.Y., Bedolli, M., Feng, S., & Hebrok, M. (2006) *Hepatology*, **43**, 817–825.
- 14) Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., & Colnot, S. (2006) *Dev. Cell*, **10**, 759–770.
- 15) Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., & Stanger, B.Z. (2009) *Development*, **136**, 1727–1739.
- 16) Tanimizu, N. & Miyajima, A. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 3165–3174.
- 17) Antoniou, A., Raynaud, P., Cordi, S., Zong, Y., Tronche, F., Stanger, B.Z., Jacquemin, P., Pierreux, C.E., Clotman, F., & Lemaigre, F.P. (2009) *Gastroenterology*, **136**, 2325–2333.
- 18) 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.
- 19) Tanimizu, N., Saito, H., Mostov, K., & Miyajima, A. (2004) *J.*

- Cell Sci.*, **117**, 6425–6434.
- 20) Tanimizu, N., Miyajima, A., & Mostov, K.E. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2486–2494.
- 21) Tanimizu, N., Miyajima, A., & Mostov, K.E. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1472–1479.
- 22) Tanimizu, N., Kikkawa, Y., Mitaka, T., & Miyajima, A. (2012) *J. Biol. Chem.*, in press.
- 23) Senga, K., Mostov, K.E., Mitaka, T., Miyajima, A., & Tanimizu, N. (2012) *Mol. Biol. Cell*, in press.
- 24) Cheung, I.D., Bagnat, M., Ma, T.P., Datta, A., Evason, K., Moore, J.C., Lawson, N.D., Mostov, K.E., Moens, C.B., & Stainier, D.Y. (2011) *Dev. Biol.*, **361**, 68–78.
- 25) Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., & Sasai, Y. (2011) *Nature*, **472**, 51–56.
- 26) Sekiya, S. & Suzuki, A. (2011) *Nature*, **475**, 390–393.
-