

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 肝臓における造血・免疫機構の解明と肝疾患治療への応用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

宮島 篤 (東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

主たる共同研究者

中村康司 (神奈川科学技術アカデミー 研究員 平成16年度まで)

3. 研究内容および成果

肝臓は生体における代謝の中心であり生命活動の維持に必須の臓器である。ウイルス、アルコール、薬物、自己免疫など様々な原因による肝疾患は肝硬変や肝臓の発症につながる。一方、肝臓は胎生期においては最も主要な造血組織として機能し、造血幹細胞が生涯で最も活発に増殖する組織でもある。しかし、こうした肝臓機能の形成、維持、および恒常性破綻の分子基盤の理解は必ずしも十分ではなく、肝臓における分子細胞生物学的研究は血液・免疫学などに比べかなり遅れている。その要因として細胞の同定・分離が不十分であることがあげられる。そこで、本研究では、まず肝臓の構成細胞の厳密な同定・分離法と培養系を確立することにより肝臓細胞の分子レベルでの解析を可能とした。これにより肝臓の発生・分化・再生および胎児肝臓の造血機能の分子基盤を理解するとともに、肝疾患治療法開発の基盤を作ること目指して研究を展開した。

(1) 肝臓構成細胞の細胞膜抗原の同定と抗体による細胞分離法の確立

肝臓研究においては、未だに実質細胞と非実質細胞という表現が頻繁に使われていることから明らかのように、肝臓構成細胞の研究は組織学的なものが中心であり、肝臓から厳密に細胞を同定・分離してその性状を分子レベルで調べるといった研究はほとんどなく、これが肝臓の分子細胞生物学的研究における大きな欠陥であった。そこで、本研究では、まず各種肝臓構成細胞の細胞膜タンパク質の同定とそれらに対するモノクローナル抗体の作製を行い、肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、星細胞の細胞膜タンパク質の発現に基づく同定・分離を可能とした。

(2) 肝臓の発生分化の解析

肝臓は胎生中期に前腸から発生する。発生直後の肝芽細胞は高い増殖能と肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を備えた肝臓の幹細胞とみなされていたが、実態は不明であった。本研究では、この肝芽細胞に発現する分子としてDlkとEpCAMを同定し、EpCAM+Dlk++細胞が最も未熟な肝幹細胞であること、それがDlk+の肝芽細胞を経てDlk-の成熟肝細胞となることを示した。さらに、胆管上皮細胞も肝芽細胞に由来し、肝芽細胞は門脈周囲で胆管上皮細胞へと分化するが、Dlk+肝芽細胞は、Notch2を発現しており、門脈域に存在する Jagged1 を発現する p75 NTR 陽性の線維芽細胞により胆管への分化が誘導される様子が明らかにされた。

肝芽細胞から分化した肝細胞はさらに何段階かの分化過程を経て成熟肝細胞となるが、本研究によりこのプロセスに関与する複数の分子が同定された。例えば、A型肝炎ウイルスの受容体として知られているTim1のマウスのカウンターパートTim2は未分化肝細胞に発現しており肝分化を負に制御していることが示された。また、肝臓機能は出生前後で劇的に変化し、転写因子 C/EBP

がこの過程に必須であることが知られていたが、その活性を制御する因子として Foxo1 が同定され、これが出生前後におけるインスリンの劇的な変化を感受し肝細胞の糖新生を制御している様子などが明らかとなった。

(3) 肝臓の障害・再生

成体肝臓はウイルス感染、アルコール、薬物、自己免疫などより肝炎を発症する。さらに、慢性肝炎は線維化・肝硬変を経てしばしば肝がんを発症する。肝細胞は強い再生能をもつものの、再生と障害の繰り返しは肝がん発症の誘因となる。本研究では、四塩化炭素による急性肝炎モデルにて、クッパー細胞などから産生される Oncostatin M (OSM) が、肝細胞に作用して細胞死を抑制するとともに、TIMP1 の発現を介してマトロプロテアーゼ MMP の活性を抑制して組織の破壊を抑制している様子を明らかにした。また、四塩化炭素のみならず OSM 受容体欠損マウスが様々な肝障害に対して高感受性を示すことから、このマウスは肝炎モデルマウスとしても有用である。

また、重篤な慢性肝炎では門脈周辺にしばしば偽胆管が形成され、オーバル細胞と呼ばれる増殖性の細胞が出現する。オーバル細胞は肝細胞と胆管上皮細胞へと分化する成体肝臓の幹細胞とみなされており、この増殖性細胞と発がんとの関連も指摘されている。しかし、その実態は不明であった。本研究では、オーバル細胞に発現する細胞膜抗原として EpCAM を同定し、ポルフィリン合成を阻害して肝障害を誘導する薬剤 DDC の投与により出現するオーバル細胞を分離しその性状解析を行った。また、EpCAM は正常肝臓の胆管にも発現することから、正常肝臓からも EpCAM 陽性細胞を分離して解析した。その結果、いずれの肝臓由来の EpCAM 細胞にも増殖性で胆管上皮細胞と肝細胞への分化能を備えた細胞が存在していたことから、オーバル細胞は正常肝臓の胆管に存在する EpCAM 陽性細胞集団に由来することが強く示唆された。

(4) 胎児肝造血機構

肝臓は胎児期において最も中心的な造血器官として機能する。造血幹細胞 (HSC) が胎児肝臓で劇的に増幅することから、本研究では胎生肝臓における HSC 増幅機構の理解が、*ex vivo* での HSC 増幅技術の開発につながることを期待し、胎児肝造血を *in vitro* で再現することを試みた。胎生 14 日目のマウス肝臓の初代培養系に HSC が発生する AGM 領域の HSC 画分を加えて共培養することで HSC が著しく増幅することを見出した。さらに、胎児肝臓から DIK 陽性の未分化肝細胞を分離しこれをフィーダーとしても造血が盛んに起こることから、未分化肝芽胞が胎児肝臓における造血ニッチであることが強く示唆された。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

従来、理解が十分でなかった肝臓の発生、分化機構、肝疾患の発症機構に関して新知見を得たことは評価できる。特に、肝芽細胞、オーバル細胞における DIK, EpCAM の発現、DIK の肝癌細胞での発現を見出したことは、重要な成果の一つと考える。

これらの研究成果は、国際誌への発表(原著論文 38 件、総説 4 件)、学会発表(国際 50 件、国内 81 件)として発表されている。特許出願は 7 件である。抗体を利用した肝臓構成細胞の同定分離法による研究成果などは、現在投稿中あるいは準備中である。

下記は其中でも特筆すべきものである。

- 1) 肝臓を構成する細胞の膜抗原を同定し、そのモノクローナル抗体の作製により肝臓構成細胞を分離し培養するシステムを開発した。

- 2) このシステムを用いて、肝臓の幹 / 前駆細胞はじめ肝臓構成細胞の発生・分化および肝障害・再生のメカニズムを明らかにした。
- 3) 肝臓の幹 / 前駆細胞に発現する細胞膜抗原が、肝臓の診断・治療用抗体開発の標的となる可能性を示した。特に、Dlkを標的とした癌治療抗体は開発が進行中である。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

肝臓という解析困難なものより多くの分子を解析し、分化機構に関する研究に貢献した。Dlkの肝臓マーカーとしての重要性と抗 Dlk 抗体を用いたヒト肝がん治療の可能性が示された。抗体療法への一歩を進めるための基盤研究としてまとまりが出来、肝臓の分子生物学的研究の進展に貢献するものと評価した。

本研究で同定された分子は、細胞膜抗原であることから、これらを標的とした癌治療抗体の開発に発展する可能性がある。特に、Dlk を標的とした癌治療抗体の開発が進行中であり、今後の進展が期待される。

4 3 . その他の特記事項

肝臓の幹細胞の研究方法を膵臓の発生にも応用し、膵臓幹細胞 / 前駆細胞をマウス胎児より分離する方法を開発し、in vitro にて膵島を形成することに成功した。この技術は JST シーズイノベーション事業にも採択され、実用化に向けた研究に発展している。