

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成14年度採択研究代表者

宮島 篤

(東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

「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」

1. 研究実施の概要

肝臓は、成体における主要な代謝器官であるとともに造血・免疫組織でもある。特に、胎生期においては、肝臓は最も主要な造血組織である。一方、成体の肝細胞はほとんど増殖しないが、成体肝臓は再生能力を備えた臓器であり、肝炎ウイルス等による持続的な肝傷害と再生は肝癌発生の要因となる。本研究では、胎生肝臓細胞の初代培養系などを用いて胎生肝臓における造血的を *in vitro* で再現することにより肝造血機構の解明を目指している。特に、造血幹細胞増幅因子の同定は主要な目標である。また、肝芽細胞／肝幹細胞は肝臓の細胞治療や肝炎治療薬開発の基礎となる重要な細胞であるが、その性状は不明である。また、重篤な肝障害において成体の肝幹細胞と考えられているオーバル細胞が出現するが、このオーバル細胞の性状も不明である。そこで、胎生期の肝芽細胞およびオーバル細胞の分離とその性状の解析を行ってきた。また、成体肝臓は主要な炎症の場であるが、従来の肝臓での免疫研究においては、肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞などの免疫反応における機能は十分に解析されていない。その要因に従来の非実質細胞分画は不十分であることが考えられる。そこで、肝非実質細胞を厳密に分画する方法の開発を行なった。

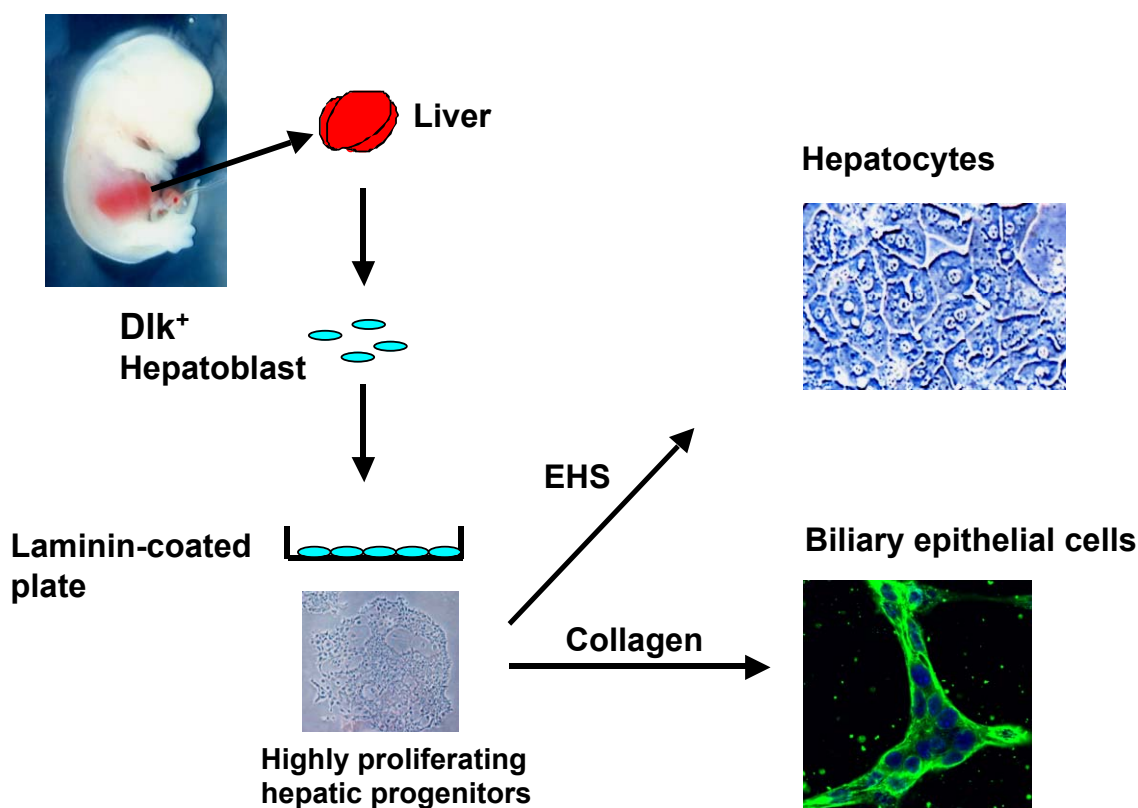
2. 研究実施内容

肝臓の研究においては、造血・免疫系の研究で日常的に行われている細胞膜抗原による細胞分画法が確立されておらず、それが肝臓の分子細胞生物学研究の遅れの要因となっている。そこで、我々は肝臓の分子細胞生物学的研究を展開するに当たり、まず細胞の分画に利用可能な抗原の同定をSAGEやシグナルトラップ法などにより行い、それらに対するモノクローナル抗体の作製を精力的に行ってきた。また、マウス胎児肝臓の非血球画分を免疫源として得た多数のモノクローナル抗体を肝臓切片の染色パターンにより分類し、それら抗体の認識する抗原分子を発現クローニングおよびタンパク質の精製構造決定により同定した。こうして、類洞内皮細胞、星細胞、異なる分化段階の肝細胞に発現する抗原を同定し、それらに対する抗体を利用した細胞分離法を確立した。

我々はすでに膜タンパク質Dlkが肝臓原基に発現し、Dlk⁺細胞がalbumin⁺細胞（肝細胞）およびCK-19⁺細胞（胆管上皮細胞）に分化することから、Dlk⁺細胞が肝芽細胞（肝

臓の幹細胞)であることを示してきた。オーバル細胞は成体の肝幹細胞であると考えられているので、胎児肝芽細胞抗原Dlkがオーバル細胞で発現する可能性をラットの障害肝モデルにて検証した。その結果、Dlkは比較的増殖能が低いオーバル細胞に発現していた。この結果は、オーバル細胞は均一な細胞ではないことおよび胎児肝芽細胞との違いを示している。また、オーバル細胞で発現する分子の同定をシグナルトラップ法にて検索中である。

Highly proliferating hepatic progenitors



成体型造血幹細胞は胎生中期のAGM領域で発生し、胎児肝臓で増幅する。我々はずでにAGM領域の細胞と胎生肝臓細胞との共培養により造血系の再構築活性を増幅するシステムを確立している。このシステムにおいて長期に渡る骨髓再構築能を備えた真の造血幹細胞が増幅しうるかどうかが移植により証明した。この胎児肝臓の造血支持活性にはOSMが必要であること、さらに、肝芽細胞であるDlk陽性細胞は細胞接触を介して造血支持活性を示すことを見いだした。

3. 研究実施体制

東大分生研グループ

① 研究分担グループ長：宮島 篤（東京大学分子細胞生物学研究所、教授）

② 研究項目：

研究項目1：造血幹細胞の発生と増幅機構の解析

研究項目2：肝臓の幹細胞および未分化肝細胞の遺伝子と機能の解析

研究項目3：サイトカイン等によるシグナル伝達機構の解析

研究項目4：肝傷害と肝再生の分子機構の解析

KASTグループ（ h1411～H16. 3終了済み ）

① 研究分担グループ長：中村 康司（神奈川科学技術アカデミー、研究員）

② 研究項目：

研究項目1：肝障害と肝再生の機構の解析

研究項目2：再生過程の肝幹細胞の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Eiji Esashi^{* ‡}, Hiroaki Ito^{*}, Harumi Suzuki[†], Shigeo Koyasu^{†, ‡}, and Atsushi Miyajima^{* ‡}

^{*}Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan [†]Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016, Japan [‡]CREST, Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation

Development of CD4⁺ macrophages from intrathymic T cell progenitors is induced by thymic epithelial cells.

Journal of Immunology (173:4360-4367, 2004. 4)

- Naoki Tanimizu¹ and Atsushi Miyajima^{1, 2, 3}

¹Stem Cell Regulation, Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST), Teikyo University Biotechnology Research Center, 907 Nogawa, Kawasaki, Kanagawa 216-0001, Japan ²Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan ³Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Japan.

Notch signalling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors.

Journal of Cell Science (117:3165-3174, 2004. 7)

- Hidenori Nonaka^{1,2}, Sumio Sugano³, Atsushi Miyajima^{1,2,4}
¹Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-0032, Japan;
²Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency
³Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Sirokanedai, Minato-ku, Tokyo 118-8639, Japan
Serial analysis of gene expression in sinusoidal endothelial cells from normal and injured mouse liver.
Biochemical and Biophysical Research Communications (324:1:15-24, 2004.9)
- Naoki Tanimizu^{1,2}, Hiroki Saito^{3,4}, Keith Mostov² and Atsushi Miyajima^{1,3,4}
¹Stem Cell Regulation, Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST), Teikyo University Biotechnology Research Center, 907 Nogawa, Kawasaki, Kanagawa 216-0001, Japan
²Department of Anatomy, Department of Biochemistry and Biophysics, University of California San Francisco, 600 16th street, San Francisco, CA 94143
³Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan
⁴Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Japan.
Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk⁺ hepatoblasts.
Journal of Cell Science (117:6425-6434, 2004.11)
- Naoki Tanimizu^{1,2,5}, Tohru Tsujimura³, Kohro Takahide⁴, Tatsuhiko Kodama⁴, Koji Nakamura^{1,2,5}, and Atsushi Miyajima^{1,2,5}
¹Stem Cell Regulation, Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST)
²Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo
³First Department of Pathology, Hyogo College of Medicine
⁴Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo
⁵Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation
Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the rat oval cell compartment.
Mechanism of Development Gene Expression Pattern (5;2:209-218, 2004.12)
- Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K.,

Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A., and Tsujimura T.

Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am. J. Pathology* 166, 709-719, 2005.

- Jiang J., N. Kojima, T. Kinoshita, A. Miyajima, W. Yan, and Y. Sakai
Cultivation and induction of fetal liver cells in a poly-L-lactic acid scaffold.

Mat. Eng. C. 24, 361-363, 2004

- Shimizu A., Sasaki H., Aoya K., Yoshida M., Kato K., Heike Y., Ikarashi Y., Shirakawa K., Takaue Y., Miyajima A., Terada M., Nagai H., and Wakasugi H.

The mouse natural killer T cell-associated antigen recognized by U5A2-13 monoclonal antibody is intercellular adhesion molecule-1. *Immunol. Letters* 92, 227-235, 2004.

- Matsunaga T, Inaba T, Matsui H, Okuya M, Miyajima A, Inukai T, Funabiki T, Endo M, Look AT, Kurosawa H.

Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. *Blood.* 103(8): 3185-3191, 2004.

- Iwatsuki K., Tanaka K., Kaneko T., Kazama R., Okamoto S., Nakayama Y., Ito Y., Satake M., Takahashi S., Miyajima A., Watanabe T., and Hara T.
Runx1 promotes angiogenesis by down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3. *Oncogene* 23, 1129-1137, 2005.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：3件）