

「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が、胎生期においては、最も主要な造血組織である。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、造血幹細胞が生涯において最も活発に増殖する胎児肝臓の造血機構の解析を行うことを一つの柱としている。もう一つの柱は、成体肝臓における肝障害から肝硬変・肝癌へと移行するメカニズムの解析を行い、新たな肝疾患治療法開発の基礎をつくることである。従来の肝臓研究は組織化学的な解析が中心であり、肝細胞、類洞内皮細胞、星細胞を厳密に同定分離する方法が確立されておらず、分子細胞レベルでの研究が十分に行われていなかった。そこで、こうした細胞をセルソーターにて分離するためのモノクローナル抗体を多数作製し、各細胞種の分離ならびに初代培養系の確立を行ってきた。また、肝炎、脂肪肝、線維化など様々なマウスの病態モデル系を検討し、正常状態および病態下での各種肝臓構成細胞を分離し、それらの培養法を組み合わせる肝疾患の分子基盤の解析を行う。

2. 研究実施内容

肝臓の研究では組織化学的な解析が中心であり、造血・免疫系の研究で日常的に行われている細胞膜抗原を指標にセルソーターによる細胞分画法が確立されていない。我々は、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と考え、まず肝臓構成細胞の分離に利用可能なモノクローナル抗体の作製とその抗原の同定を精力的に行ってきた。その結果、未分化肝細胞あるいは成熟肝細胞に特異的に発現する抗原や、肝類洞内皮細胞、星細胞に発現する抗原など多数の細胞膜抗原を同定し、それらに対する抗体を作製した。こうした抗体を使って、セルソーターによる細胞分離が可能となってきた。

胎児肝臓造血

成体型の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。我々はすでに 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ことを移植により明らかにした。さらに、肝芽細胞である Dlk 陽性細胞に造血幹細胞の増殖支持活性があることも明らかにした。

胎児肝造血が最も盛んな胎生 14.5 日のマウス肝臓細胞を PCLP1 抗原の発現により分画し、造血活性を持つ細胞を解析したところ、*in vitro* でのコロニー形成能を示さないが成体マウスに移植すると造血システムを再構築する能力をもった細胞集団の存在を認めた。すなわち、この細胞は造血幹細胞の前駆細胞である可能性が示唆された。さらに、この細胞はストロマ細胞の存在下で増幅した。そこで、この細胞の *in vitro* での増幅の詳細な検討ならびに他の造血組織における存在についても検討を行っている。

成体マウスの肝障害モデルの検討

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線維化、肝硬変さらに肝癌発生の要因ともなる。こうした病変の分子基盤の理解のために、抗体を利用した細胞分離技術は有用なツールとなる。そこで、まず様々な肝障害モデルを検討した。すでに Oncostatin M (OSM) 受容体欠損マウスを用いた CC14 による急性肝炎モデルにて、OSM が肝細胞の細胞死抑制と増殖促進効果のみならず、肝非実質細胞に作用して protease の阻害因子 Timp の発現誘導を介して組織再生に寄与することを見いだしている。肝障害の原因は、CC14 のように肝細胞の障害により炎症細胞の浸潤を引き起こす場合もあれば、免疫系の刺激に起因するもの、その他食餌による脂肪肝に起因するものなど様々である。そこで、この変異マウス使って種々の刺激による肝障害を検討したところ、Lps や ConA など免疫系を活性化すると、急激な肝障害が惹起された。また、コリン欠乏食を与えると、OSMR 欠損マウスは野生型に比べて急速に脂肪が蓄積し肝線維化へと進行した。こうした結果は、OSM が正常肝臓の機能維持に重要な働きがあることを示している。このマウス肝障害モデルに上記の細胞分離法を適用して、肝障害時の肝構成細胞、とりわけ、肝非実質細胞の変化を検討している。

肝細胞分化

肝臓構成細胞の分離目的で種々の細胞膜タンパク質を多数同定したが、これらは細胞の増殖や分化にも機能している可能性がある。我々は以前に未分化肝細胞を *in vitro* で分化誘導するシステムを確立しており、未分化肝細胞に発現する抗原についてはそれらの機能を *in vitro* 培養系にて評価した。その結果、Tim2, Lu などに肝細胞分化に対する作用が示された。現在、これら分子の肝細胞分化における機能解析を行っている。

3. 研究実施体制

「東大分生研」宮島研究グループ

①研究分担グループ長：宮島 篤（東大分生研、教授）

②研究項目：胎児肝臓造血、成体マウスの肝障害モデルの検討、肝細胞分化

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

- Takayoshi Bando, Keisuke Sekine, Shizuka Kobayashi, Ayako M. Watabe, Armin Rump, Minoru Tanaka, Yoshikuni Suda, Shigeaki Kato, Yoshihiro Morikawa, Toshiya Manabe and Atsushi Miyajima Neuronal leucine-rich repeat protein 4 is required for hippocampus-dependent long-lasting memory. *Molecular and Cellular Biology (MCB)* Volume 25, Issue 10, p.4166-4175, 2005
- 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.
- 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.
- Kato Y., Iwama A., Tadokoro Y., Shimoda K., Minoguchi M., Akira S., Tanaka M., Miyajima A., Kitamura T., and Nakauchi H. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 202: 169-179, 2005.
- Doyonnas R., Nielsen J.S., Chelliah S., Drew E., Hara T., Miyajima A., and McNagny K.M. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170-4178, 2005.
- Inukai T., Inaba T., Dang J., Kuribara R., Ozawa K., Miyajima A., Wu W., Look A.T., Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K., Kagami K., Goi K., Sugita K., and Nakazawa S. TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common chain of cytokine receptors. *Blood* 105, 4437-4444, 2005.
- Kojima N., Shiojiri N., Sakai Y., and Miyajima A. Expression of neuritin during liver maturation and regeneration. *FEBS Letters*. 579, 4562-4566, 2005
- Noguchi T., Fujimoto H., Sano H., Miyajima A., Miyachi H., and Hashimoto Y. Inhibitors of angiogenesis derived from Thalidomide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 5509-5513, 2005

- Ito T., Arimatsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Nagata M., Saso K., Akimitsu N., Hashimoto H., Natori S., Miyajima A. and Sekimizu K. Transcription elongation factor SII is required for definitive hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* ,26, 3194-3203, 2006
- 竹内 眞樹、宮島 篤
肝臓における造血ニッチ-胎生期造血
分子細胞治療, Vol.5 No.2, p.11-17, 先端医学社, 2006

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：4 件）