

「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障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つつ、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。胎生肝臓の未分化肝細胞は造血支持能を示すとの結果が得られていること、さらに重篤な肝炎により成体肝臓に出現するオーバル細胞は成体における肝臓の幹／前駆細胞であり肝癌との関連が示唆されていることから、これら肝臓の幹／前駆細胞の性状を重点的に解析してきた。従来の肝臓研究は組織化学的な解析が中心であり、これら肝臓の幹／前駆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、胎生肝臓および障害肝臓からこれらの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作製し、純化した細胞の性状を初代培養系にて検討した。

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髄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、未分化肝細胞である D1k 陽性細胞に造血幹細胞の増殖支持活性があることを明らかにした。

肝臓の幹／前駆細胞の分離

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障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。重篤な肝障害により門脈域に出現するオーバル細胞とも呼ばれる小型の細胞は増殖性でしかも肝細胞と胆管上皮細胞に分化する成体肝臓の幹／前駆細胞であると考えられている。さらにこの細胞が肝癌の元になっている可能性が指摘されている。しかし、その細胞の分離同定は必ずしも厳密でなく性状は十分に解明されていない。従来のオーバル細胞の解析は、ラットに 2-acetylaminofluoren (2AAF) を投与して肝細胞の分裂を抑制した状態で部分肝切除を施すことでオーバル細胞を誘導するという実験系が一般的であるが、同様の方法はマウスには適応できない。我々はヘムの合成を阻害して肝炎を引き起こす 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) をマウスに投与してオーバル細胞を誘導するモデル系を試み、再現性よくマウスでオーバル細胞を誘導することができた。そこで、この系にてオーバル細胞を分離するための細胞膜抗原の同定を試みた。

オーバル細胞の性状はマウスとラットあるいは誘導方法により異なる可能性があり、我々は 2AAF 部分肝切除ラットおよび DDC 投与マウスのオーバル細胞に共通の膜抗原の探索を行い、EpCAM をはじめ複数の膜タンパク質を同定した。DDC 投与マウス肝臓より分離した EpCAM 陽性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もつことを培養系にて示した。

我々はすでに発生過程の肝臓の肝芽細胞膜抗原として D1k を同定しているが、D1k 陽性で EpCAM 陽性細胞が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最も初期の hepatoblast であることを示した。

EpCAM 以外の分子についての発現および機能の解析は進行中である。

肝細胞膜分子の機能

すでに我々は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、免疫系での機能が

報告されている Tim2 が肝細胞分化を負に制御しているとの結果を得た。

肝類洞内皮細胞

肝臓の毛細血管である類洞は腸管から大量の異物が流入することから、活発な免疫応答が行われる組織でもあり、肝炎の発症において類洞内皮細胞は重要な役割を果たす可能性が考えられる。上記の肝臓構成細胞の細胞膜抗原の同定と抗体作製により、類洞内皮細胞を分離することが可能となった。その結果、類洞内皮細胞の培養液には免疫系を抑制する活性が存在することが示された。肝臓が免疫学的に寛容であることを考えると大変興味深い結果であり、この分子の同定を試みている。

3. 研究実施体制

(1)「東大分生研グループ」グループ

①研究者名

宮島 篤(東京大学・分子細胞生物学研究所 教授)

②研究項目

- ・造血幹細胞の発生と増幅機構の解析
- ・肝非実質細胞の性状解析
- ・肝オーバル細胞の性状解析

(2)「KAST (神奈川科学技術アカデミー)」グループ：平成16年3月終了

①研究者名

中村 康司(神奈川科学技術アカデミー 研究員)

②研究項目

- ・肝障害と肝再生の機構の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Takahiro Ito, Nagisa Arimitsu, Masaki Takeuchi, Nobuyuki Kawamura, Mariko Nagata, Kayoko Saso, Nobuyoshi Akimitsu, Hiroshi Hamamoto, Shunji Natori, Atsushi Miyajima and Kazuhisa Sekimizu. Transcription Elongation Factor S-II Is Required for Definitive Hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology* vol.26,no.8:p.3194-3203, 2006.4
- Hiroaki Ito, Eiji Esashi, Taishin Akiyama, Jun-ichiro Inoue and Atsushi Miyajima. IL-18 produced by thymic epithelial cells induces development of dendritic cells with CD11b in the fetal thymus. *International Immunology* vol.18,no.8:p.1253-1263, 2006.6

- Ken-ichi Minehata, Masaki Takeuchi, Yoko Hirabayashi, Tohru Inoue, Peter J. Donovan, Minoru Tanaka and Atsushi Miyajima. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *International Journal of Hematology* vol.84,no.4: p.319-327, 2006.11
- Yuichiro Miyaoka, Minoru Tanaka, Takahiro Naiki and Atsushi Miyajima: Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* vol.281,no.49: p.37913-37920, 2006.12
- Tanimizu N., Miyajima A., and Mostov K.E. Liver Progenitor Cells Develop Cholangiocyte-Type Epithelial Polarity in Three-dimensional Culture. *Mol. Biol. Cell.* 18:1472-1479, 2007.
- Natsumi Watanabe, Minoru Tanaka, Kaori Suzuki, Atsushi Kumanogoh, Hitoshi Kikutani and Atsushi Miyajima Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation *Hepatology* in press

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0件(CREST 研究期間累積件数:5件)