

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	永濱 康晴
<p>学位論文題目</p> <p>Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injuries.</p> <p>(慢性肝傷害に伴う細胆管反応および胆管構造のリモデリングへの肝細胞と胆管上皮細胞の寄与)</p> <p>共著者名</p> <p>曾根正行, 陳錫, 岡田陽子, 山本雅大, 辛氷, 松尾康博, 小松美貴子, 鈴木聡, 榎本克彦, 西川祐司</p> <p>The American Journal of Pathology</p> <p>平成26年11月号 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>慢性肝傷害においては傷害部に線維化とともに細胆管が増加する現象が認められる。これは細胆管反応と呼ばれており, 慢性肝炎や肝硬変の病態の成立に重要な意義を持っている。しかし, そのメカニズムについては不明の点が多く, 細胞起源(肝幹細胞, 胆管上皮細胞, 肝細胞)についても議論が続いている。最近我々は, 培養ラット肝細胞を用い, 肝細胞が胆管上皮細胞に分化転換しうること, この分化転換は可逆的であることを報告した(1, 2)。本研究では, 細胆管反応において肝細胞の胆管上皮細胞への分化転換がどの程度関与しているかを検討するため, マウスの肝細胞追跡系を用いた実験を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>使用動物</p> <p>C57BL/6マウス, <i>Alb-Cre</i>マウス, <i>Mx1-Cre</i>マウス, ROSA26Rマウス(Creが発現した細胞では遺伝子組換えが起こり, β-galactosidase [β-gal]が恒久的に発現する)を用い, <i>in vivo</i>での肝細胞追跡のために<i>Alb-Cre</i>×ROSA26Rマウス, <i>Mx1-Cre</i>×ROSA26Rマウスを作製した。</p> <p>マウス肝細胞のコラーゲンゲル内三次元培養</p> <p>C57BL/6マウスの門脈からジギトニンを少量注入し, 胆管上皮細胞, 肝幹細胞を含む門脈周囲細胞を死滅させた後, 肝静脈からのコラゲナーゼ灌流を行い, 肝細胞を分離した。プライマリアディッシュ上で肝細胞スフェロイドを形成させ, これらをコラーゲンゲルに包埋し, 10%血清, epidermal growth factor, insulin, dexamethasoneを添加したWilliams' E培地で15日間培養した。また, ラット肝細胞の分化転換を促進するtumor necrosis factor-α (TNF-α)を添加し, その効果を検討した。</p>			

In vivoにおける肝細胞系譜追跡系

1) *Alb-Cre*×*ROSA26R*マウスから分離したβ-gal陽性肝細胞を、肝細胞の増殖を抑制するretrorsine投与および部分肝切除を施したC57BL/6マウスに経脾的に移植すると、生着した肝細胞が次第に増殖する。これらのマウスに3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)や四塩化炭素により肝傷害を誘導した。

2) *Mxl1-Cre*×*ROSA26R*マウスにpoly(I:C)を投与すると、肝細胞が特異的にβ-galで標識される。肝細胞標識後、門脈域周辺の細胆管反応を誘導するDDC, 4,4'-diaminodiphenylmethane (DAPM), 総胆管結紮 (bile duct ligation, BDL), 小葉中心部の細胆管反応を誘導する四塩化炭素, thioacetamide (TAA)による慢性傷害を与えた。

mRNAおよび蛋白発現解析

肝細胞、肝組織から抽出したRNAから逆転写反応によりcDNAを調製し、SYBR Green法またはTaqMan Probe法により定量PCRを行い、肝細胞、胆管上皮細胞、肝幹細胞(肝芽細胞)マーカーの遺伝子のmRNA発現解析を行った。また、コラゲナーゼ灌流法により分離した分離直後の肝細胞、肝細胞スフェロイド、および三次元培養後の肝細胞から蛋白を抽出し、SDS-PAGEを行い、polyvinylidene fluoride膜に転写した後、各種抗体を用いて各種細胞分化マーカーの発現をWestern blottingで検討した。

組織学的・免疫組織化学的解析

分離直後の肝細胞、肝細胞スフェロイドおよび三次元培養後の肝細胞に対し、肝上皮系細胞分化マーカーの免疫細胞化学を行った。*In vivo*肝傷害モデルでは、肝組織を灌流固定し、凍結切片を作製し、X-gal染色を行った後、胆管上皮細胞マーカー(cytokeratin 19 [CK19], Sox9)や増殖マーカー(phospho-histone H3)の発現を免疫組織化学で検討した。

Mxl1-Cre×*ROSA26R*マウスモデルにおいて、各種傷害に伴う肝小葉の構造変化を調べるため、門脈域、中心静脈域に存在するβ-gal陽性、陰性胆管の数を計測した。また、一部の実験では、総胆管や門脈本幹から色素を注入し、SCALEVIEWによる組織透明化処理もしくは連続切片法による三次元解析を行った。

成 績

マウス肝細胞の*in vitro*における胆管上皮細胞への分化転換

コラーゲンゲル内に包埋されたマウス肝細胞スフェロイドは、一部に管腔形成を伴う複雑な樹枝状形態形成を示し、これはTNF-αが存在する場合に著明に促進された。*Alb*, *Ttr*, *Hnf4a*などの肝細胞マーカーの発現低下および*Krt19*, *Sox9*, *Spp1*などの胆管上皮マーカーの発現上昇を伴っていたが、肝芽細胞マーカーである*Dlk1*の発現は認められなかった。

β-Gal陽性肝細胞の肝内移植による肝細胞の胆管上皮細胞への分化転換の証明

Alb-Cre×*ROSA26R*マウスから分離し、C57BL/6マウス肝内に移植した肝細胞は、8週間後にβ-gal陽性の肝細胞コロニーを形成した。コロニーの一部には炎症を背景としてβ-gal陽性かつCK19やSox9が陽性の細胆管構造が観察された。DDCや四塩化炭素による肝傷害により、著明な細胆管反応が誘導され、この中に多数のβ-gal陽性細胞が確認された。以上の結果から、マウス肝細胞は肝傷害による微小環境の変化に応じ、*in vivo*においても胆管上皮細胞の表現型を示しうるということが明らかになった。

***Mx1-Cre*×*ROSA26R*マウスを用いた細胆管反応の細胞由来の検討**

次に、各種肝傷害に伴う細胆管反応に肝細胞がどの程度寄与しているかを、*Mx1-Cre*×*ROSA26R*マウスを用いた肝細胞追跡系で検討した。Poly(I:C)投与後、ほとんどの肝細胞が β -galで標識されたが、胆管上皮細胞・細胆管上皮細胞およびその他の非実質細胞は β -gal陰性であった。

門脈周囲性の細胆管反応 (DDC, DAPM, BDL) では、増加した胆管・細胆管細胞の大部分は β -gal陰性であったが、数%の割合で β -gal陽性細胞が含まれていた。門脈周囲性細胆管反応では、既存の胆管・細胆管の寄与が大きい、その過程で周辺の肝細胞が取り込まれることが示唆された。

正常肝の小葉中心部には胆管構造はまったく存在しないが、四塩化炭素やTAAにより中心静脈周囲に傷害を与えると、小葉中心部の線維化を伴う病変部に β -gal陽性の細胆管構造が出現した。その割合は四塩化炭素では、8週で約20%、11週、20週で約10%、TAAでは約4%であった。これらの結果は、慢性傷害により、小葉中心部に肝細胞に由来する細胆管上皮細胞が出現することを明確に証明すると同時に、グリソン鞘内およびその周囲に存在する既存の胆管・細胆管 (β -gal陰性) が小葉中心性細胆管反応においても寄与していることを示している。実際に、四塩化炭素やTAAによる慢性肝傷害いずれにおいても、小葉間胆管や細胆管がグリソン鞘から離れ、中心静脈域に移動する像が観察された。また、一部の肝動脈もグリソン鞘から離れ、小葉内に移動していた。興味深いことに、総胆管から墨汁を逆行性に注入し、連続切片で検討したところ、小葉中心に移動した既存の胆管・細胆管上皮細胞 (β -gal陰性) と肝細胞由来の細胆管上皮細胞 (β -gal陽性) が交通していることが確認された。さらに、 β -gal陰性胆管・細胆管上皮細胞には増殖性が認められたのに対し、 β -gal陽性細胆管にはほとんど増殖性がみられなかった。

考 案

肝上皮系細胞である肝細胞と胆管上皮細胞はいずれも胎生期の肝芽細胞に由来するが、これらの分化形質は一旦成熟すると固定されると考えられてきた。しかし、我々はラット肝細胞をコラーゲンゲル内で三次元培養することにより、胆管上皮様細胞に分化転換させうることを見出し、肝細胞表現型の可塑性を示唆している (3)。本研究により、マウス肝細胞も、ラット肝細胞と同様に、コラーゲンゲル内で胆管上皮様細胞へと変化することが明らかになった。また、この過程では肝細胞は肝芽細胞マーカーの発現を示さず、脱分化よりは分化転換が起こっているものと推察された。

成熟肝細胞が*in vivo*において胆管上皮細胞に変化しうるかについては、現在も議論が続いている (4-6)。しかし、我々の β -gal標識マウス肝細胞の肝内移植実験の結果は、成熟肝細胞が胆管上皮細胞に変化しうることを明確に示している。*In vivo*における胆管上皮細胞への分化転換は慢性肝傷害により著明に促進され、炎症に伴う微小環境の変化 (細胞外マトリックスの変化、炎症細胞からの各種サイトカインの産生など) が関与していると考えられる。TNF- α は培養肝細胞の胆管上皮細胞への分化転換を強く促進したが、傷害肝においてもTNF- α が上昇することが知られており、これが肝細胞の分化異常に関連している可能性がある。

Mx1-Cre×*ROSA26R*マウスを用いた肝細胞追跡系での検討により、門脈周囲性、小葉中心性いずれにおいても細胆管反応に胆管上皮細胞と肝細胞の両者が種々の程度で寄与することが判明した。また、細胆管反応に伴い、既存の胆管系がこれまで想定されていたよりもはるかに高度のリモデ

リングを示しうることが明らかになった。小葉中心性細胆管反応では、傷害部に出現した肝細胞由来の細胆管とグリソン鞘周囲から小葉中心部へ移動した胆管・細胆管が連続している像が確認され、胆汁流路が保たれていることが示唆された。小葉中心性細胆管反応はこれまで注目されることは少なかったが (7), 慢性うっ血肝, アルコール性肝疾患, 非アルコール性脂肪肝炎を始めとして種々のヒト肝疾患でも出現する重要な病態であり, 我々の実験結果はこれを理解する上で有益な情報を提供するものと考えられる。

結 論

慢性肝傷害に伴う細胆管反応には肝細胞と胆管上皮細胞の両者が関与しており, 肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換や既存胆管上皮細胞の増殖および移動により肝小葉構造がダイナミックに変化することが明らかになった。今後, 慢性肝傷害の病態病理をより深く理解し, 有効な治療法を開発するためには, 胆管系のリモデリングの意義とメカニズムを, 肝微小環境に応じた肝細胞と胆管上皮細胞の相互可塑性の可能性をも念頭に置きながら, 詳細に検討していく必要があると思われる。

引 用 文 献

1. Nishikawa Y, Sone M, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Yamamoto Y, Ito A, Sugiyama T, Enomoto K: Tumor necrosis factor- α promotes bile ductular transdifferentiation of mature rat hepatocytes *in vitro*, *J Cell Biochem* 2013, 114:831-843
2. Sone M, Nishikawa Y, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Sugiyama T, Enomoto K: Recovery of mature hepatocytic phenotype following bile ductular transdifferentiation of rat hepatocytes *in vitro*, *Am J Pathol* 2012, 181:2094-2104
3. Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H, Tokairin T, Omori Y, Su M, Yoshioka T, Enomoto K: Transdifferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells *in vitro*, *Am J Pathol* 2005, 166:1077-1088
4. Malato Y, Naqvi S, Schurmann N, Ng R, Wang B, Zape J, Kay MA, Grimm D, Willenbring H: Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration, *J Clin Invest* 2011, 121:4850-4860
5. Yanger K, Zong Y, Maggs LR, Shapira SN, Maddipati R, Aiello NM, Thung SN, Wells RG, Greenbaum LE, Stanger BZ: Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration, *Genes Dev* 2013, 27:719-724
6. Sekiya S, Suzuki A: Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes, *J Clin Invest* 2012, 122:3914-3918
7. Desmet VJ: Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered, *Virchows Arch* 2011, 458:251-259

(1, 2は参考文献)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	永濱 康晴
<p>審査委員長 奥村利勝 </p> <p>審査委員 古川博之 </p> <p>審査委員 吉田成孝 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injuries. (慢性肝傷害に伴う細胆管反応および胆管構造のリモデリングへの肝細胞と胆管上皮細胞の寄与)</p>			

慢性肝傷害においては傷害部に細胆管が増加する現象があるが、この細胆管反応のメカニズムについては不明の点が多い。最近著者らは、培養ラット肝細胞を用い、肝細胞が胆管上皮細胞に可逆的に分化転換しうることを報告した。本研究では、この分化転換につき *in vivo* の実験系で検討した。

Alb-Cre×*ROSA26R* マウスから分離し、*C57BL/6* マウス肝内に移植した肝細胞は、 β -gal 陽性の肝細胞コロニーを形成した。一部には β -gal 陽性かつ *CK19* や *Sox9* が陽性の細胆管構造が観察された。四塩化炭素による肝傷害により、著明な細胆管反応が誘導され、この中に多数の β -gal 陽性細胞が確認された。以上の結果から、マウス肝細胞は肝傷害により、*in vivo* においても胆管上皮細胞の表現型を示しうるということが明らかになった。

門脈周囲の細胆管反応では、増加した胆管・細胆管細胞の大部分は β -gal 陰性であったが、数%の割合で β -gal 陽性細胞が含まれていた。門脈周囲性細胆管反応では、既存の胆管・細胆管に加えて、周辺の肝細胞が取り込まれることが示唆された。

正常肝の小葉中心部には胆管構造はまったく存在しないが、四塩化炭素などにより中心静脈周囲に傷害を与えると、小葉中心部の部分的に β -gal 陽性の細胆管構造が出現した。これは、小葉中心部に肝細胞に由来する細胆管上皮細胞が出現することを証明すると同時に、グリソン鞘内およびその周囲に存在する既存の胆管・細胆管が小葉中心性細胆管反応においても寄与していることを示している。

総胆管から墨汁を逆行性に注入した検討では、小葉中心に移動した既存の胆管・細胆管上皮細胞 (β -gal 陰性) と肝細胞由来の細胆管上皮細胞 (β -gal 陽性) が交通していることが確認された。

以上の成績から、慢性肝傷害に伴う細胆管反応には肝細胞と胆管上皮細胞の両者が関与しており、肝細胞から胆管上皮細胞への分化転換や既存胆管上皮細胞の増殖および移動により肝小葉構造がダイナミックに変化することが明らかになった。以上の成績は様々な慢性肝疾患の病態を理解する上で極めて意義深い。

得られた内容は明快で、その医学的意義も高く、本論文は既に *Am J Pathol* 誌に公表されている。申請者の関連領域の知識も十分で、十分に学位論文にふさわしいと判断した。