

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)

旭川医科大学 病理学講座 腫瘍病理分野

永濱 康晴

研究目的

慢性肝傷害においては傷害部に線維化とともに胆管・細胆管構造の異常な増加が認められる。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。細胆管反応は肝幹細胞の再生性増殖および分化に由来すると考えられてきましたが、肝細胞の細胆管化生の結果である可能性も指摘されている。しかし、そのメカニズムについては未だ不明な点が多く、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。

材料・方法

使用動物

C57BL/6 マウス, *Alb-Cre* マウス, *Mx1-Cre* 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マウス)を用い, *in vivo*での肝細胞追跡のためにそれぞれを掛け合わせ, *Alb-Cre*×ROSA26R マウス, *Mx1-Cre*×ROSA26R マウスを作製した。

マウス肝細胞のコラーゲンゲル内三次元培養

C57BL/6 マウスの門脈から界面活性剤である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, 肝静脈からのコラーゲナーゼ灌流を行い, 小葉間胆管や肝幹細胞が存在しない中心静脈周囲の肝細胞を選択的に分離した。プライマリアディッシュ上で培養すること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。

*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70%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し, β -gal 陽性肝細胞のコロニーを形成する。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, 肝傷害に伴う細胆管反応への肝細胞の寄与を検証した。

2) *Mx1-Cre*×ROSA26R マウスに poly(I:C)を投与すると, IFN- α , β の産生を介し *Mx1* の発現

が誘導され、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、各肝傷害モデルにおける細胆管反応への肝細胞の寄与を検証した。

遺伝子および蛋白質発現解析

肝細胞および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、コラーゲン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、およびコラーゲンゼ三次元培養後の肝細胞からそれぞれ蛋白質を抽出し、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 [pHH3]) の発現を免疫組織化学で検討した。

Mx1-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。

結果

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

コラーゲンゼ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 が存在する場合により著明に促進された。分離直後の肝細胞、肝細胞スフェロイド、コラーゲンゼ三次元培養後の細胞を用いた遺伝子発現解析の結果、Alb, Ttr, Hnf4a などの肝細胞マーカーの発現低下および Krt19, Sox9, Spp1 (Opn) 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。また、Western blotting や免疫細胞染色の結果から、培養の過程で Albumin, HNF-4 α の発現が減少する一方、CK19 や Sox9 の発現上昇が認められ、肝分化マーカーの発現変化は遺伝子と蛋白質で共通していることが明らかになった。

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* マウス肝内に経脾移植した肝細胞は、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* が陽性の移植した β -gal 陽性肝細胞に由来する細胆管構造が観察された。さらに *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（肝星細胞、クッパー細胞、肝類洞内皮細胞）は β -gal 陰性であり、肝細胞特異的な β -gal 標識が確認できた。

そこで、まず門脈周囲性の細胆管反応を誘導するため、*DDC* および *DAPM* の投与、または *BDL* を施した。各傷害誘導後に増加した胆管・細胆管細胞の大部分は β -gal 陰性であったが、数%の割合（*DDC*: 2%, *DAPM*: 5%）で β -gal 陽性細胞が含まれていた。また、肝細胞標識後、通常飼育で15か月飼育したマウスにおいても4%程度の β -gal 陽性細胞が存在した。

これらの結果から、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、さらには正常な胆管の恒常性の維持にも肝細胞が一部寄与している可能性も示唆された。

次に、中心静脈周囲性細胆管反応について検証を行った。正常肝の小葉中心部には胆管構造はまったく存在せず、肝幹細胞も存在しないが、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。このような現象が観察された肝組織を用いて、組織のリモデリングに関連する遺伝子の発現解析を行ったところ、*S100a4* や *TIMP1*, *MMP2* の発現が有意に上昇していた。

これらの現象をさらに詳細に解析するため、組織構造の変化に着目し検証を行った。まず、門脈から朱墨を注入した上で、さらに総胆管から墨汁を注入した後、*SCALEVIEW* 処

理により組織を透明化し、三次元構造を解析した結果、正常肝では門脈に沿って墨汁塊が小葉間胆管と思われる場所に沈着していたが、四塩化炭素による傷害誘導後においては、墨汁が門脈から離れた中心静脈周囲と思われる場所に散見された。非常に興味深いことに、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、X-gal と CK19, pHH3 の三重染色の結果、 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。

考察

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 \times *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