

混ざっているような状況になっていると思います。投与した細胞群も hetero な集団も全骨髄血細胞とりますから hetero なので、いくつかの段階が混ざっているような状況なので、次かその次ぐらいにもっと purify した集団で答えを出したいと思います。

【沖田】他臓器には障害がないと入っていかないということです。

【加藤（東京大・消内）】大変きれいなお仕事で素晴らしいと思います。GFP 陽性の骨髄細胞を入れると、もとのマウスにとっては GFP という蛋白は異種蛋白なわけですよね。当然免疫反応みたいなものが起きてもいいのではないかと思います。GFP 陽性細胞に対して免疫系の攻撃はどうなっているのかということが1点。もう1点は特種な環境で増えてきたということで、免疫のアタック絡みなんです。四塩化炭素をずっと投与し続けているときに apoptosis を調べたら、例えば GFP 陽性のものだけが実は死ににくいとか、もしかしたらそこには炎症の起点があって逆に apoptosis を逃れるようなシグナルが入っているという可能性がないか、炎症を四塩化炭素で起こし続けると GFP 陽性の細胞だけが逆に残ってきてしまうとか、そういう懸念はどうか。肝内に炎症細胞浸潤が出ると思いますが、そういう細胞は GFP 陽性なのかどうか聞いてみたいと思いました。

【寺井】まず、順番なんです。免疫系の方の因子なんです。確かに免疫の因子というのはいくつかマイクロアレイの結果なんかで動いています。肝臓があるていど増殖するときは TNF α とか NF κ B とか確かに必要なんです。少なくとも自分の方の骨髄からとっ

た細胞に対する同種同系、そういう免疫系の resection は少ないと思いますが、逆にこのモデルで上手くいっているときに非常にダイナミックなことが起きていると思います。将来的にはさらにシグナリングを解析して行って、CC14 出なくて、もっと限定したサイトカインを A, B とか、いくつか絡めて入れるか、あるいは adeno か何かを入れてより生かせるということをしたと思います。実際に apoptosis については少しタネルか何かで染めてみましたが、入れている GFP 細胞とタネル染色が一致するということはありませんでした。

【加藤】GFP 陽性細胞は死ににくい…。

【寺井】いえ、その周りに一部起こりますけど、確かに GFP 陽性細胞だけが死ににくいという状況ではないと思います。それは間違いないと思います。炎症細胞の浸潤ですが、ある程度打ちますから炎症細胞浸潤はあると思いますが、これは第一段階のモデルなので、もっと maturation したモデルで1~2年後にはもっといい系でやりたいと思います。とりあえず 25% いったんだということは、ここからいろんな情報をとって、よりいい再生療法ができる系だとは考えています。

【加藤】炎症細胞は GFP 陽性…。

【寺井】炎症細胞はそんなに陽性ではないです。

【加藤】ありがとうございました。

【沖田】部分肝切除の系では肝細胞に分化しませんので、そういう意味でも炎症の存在が重要な意味を持っていると思います。

*

*

*

KAN·TAN·SUI

肝胆葬

2003

3

特集●肝幹細胞研究の現状

〔巻頭言〕Stem cells of the hepatocyte

肝の臓器発生

肝発生の分子メカニズム—C/EBP α の働き—

初期肝形成時のシグナル伝達機構

肝発生と再生時のHGF

胆管細胞の分化増殖

肝幹細胞

肝臓における多能性幹細胞

小型肝細胞

骨髄中肝幹細胞

肝前駆様細胞の探索と単離

—成体肝臓と胎盤付着物である羊膜組織中の肝前駆細胞を中心に—

ES細胞の肝細胞分化

再生医療への応用

骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法

臍帯血細胞を用いた肝臓再生療法

ハイブリッド人工肝臓—可逆性不死化ヒト肝臓細胞株の樹立と

実用化可能なバイオ人工肝臓の開発を目指して—

〔座談会〕肝幹細胞研究の現状

(司会) 沖田極 / 日裏彰人 / 杉山俊博 / 吉川正英

骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法

寺井 崇 二* 山本 直 樹* 大森 薫*
坂井田 功* 沖田 極*

索引用語：骨髄細胞，肝幹細胞，Niche，Trans-differentiation，再生療法

1 はじめに

再生医療は大きく細胞を使った細胞移植療法と，その他の薬剤を用いた再生療法の大きく2つに分けられる。さらには Tissue engineering や人工の devise を使った再生医療技術もあり，これらの技術の発達は臨床現場において多くの利益をもたらすと考えられる。本項においては幹細胞を使った再生医療の臨床応用への基礎研究，臨床応用の可能性について示す。

2 骨髄細胞を使った肝臓再生療法の開発へ

現在肝不全患者に対する究極的な治療法としては生体肝移植法などが開発され実際臨床の現場で施行されているが，ドナー不足や手術侵襲が大きいことが問題になっている。この問題の解決のためには新たな幹細胞を用いた再生医療技術の開発が必要になる。使用する幹細胞としては胚性幹細胞 (ES cell)¹⁾，成人臓器に存在する組織幹細胞 (Adult stem cell)

の2つに大きく分類される²⁻⁴⁾。まず ES 細胞であるが，非常に可塑性に富み高い増殖能を持つが奇形腫の形成などの問題も多く，実際の ES cell を使った再生療法，特に移植医療は臨床応用に至るまでに倫理的問題，安全性に対する慎重な評価・判断が必要となると考えられる。一方，Adult stem cell であるが，肝臓においては以前より肝幹細胞の一つとしてラットの重篤な肝障害に伴い発生する卵円形の核を持つ Oval cell が知られている³⁾。この Oval cell は肝細胞，胆管細胞，小腸細胞，膵臓細胞になるなど分化の可塑性が報告されている。一方で FACS を駆使しての胎児肝よりの肝幹細胞の分離同定も行われている⁵⁾。これらの細胞を用いた移植医療は非常に魅力的な方法になるであろうが，臨床医療の現場では移植する細胞源の確保の簡便さが非常に重要になり，その利用にはより簡便な分離技術の開発が必要になると考えられる。一方最近になり動物 model および人の剖検例において，骨髄由来の細胞が肝細胞に分化することが報告された⁶⁻¹²⁾。これらの報

Shuji TERAI et al : A new cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver

*山口大学医学部先端分子応用医科学講座消化器病態内科学 [〒 755-8505 宇部市南小串 1-1-1]

表1 今後解決すべき問題点

- ・骨髄細胞の肝細胞への分化過程の解析 (分化 monitoring モデルの開発)
- ・骨髄中にどの分画に肝幹細胞が存在しているかの解析
- ・骨髄細胞 (肝幹細胞) の肝細胞への分化制御機構
- ・肝幹細胞の肝細胞への分化を制御する微小環境 “niche” の解明
- ・積極的に肝幹細胞を体外から誘導する方法
- ・投与した細胞の肝臓への遊走, 骨髄中の肝幹細胞誘導分子の同定
- ・骨髄から培養した肝幹細胞を投与するのがいいのか, それとも培養を経ずに投与した方がいいのか

告は骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用への実現の可能性を強く示唆する。また骨髄細胞は肝臓に存在する肝幹細胞に比べ分離が容易であり, 骨髄細胞 (特に自己骨髄細胞) を細胞源とする新たな肝臓再生療法の臨床開発が可能と考える。では, この新たな治療法の臨床応用を実現するにはどのような基礎研究が必要になってくるであろうか? われわれはより効率的な骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発を行うためには表1の問題の解決が重要と考える。これらが解決できれば, 今後骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は臨床応用へ実現可能な治療法になると考えられ, さらに新たな標的分子の発見, 創薬に発展すると期待できる。

3 過去の骨髄細胞から肝細胞への可塑性を評価できるモデル

細胞は特殊な微小環境の “niche” の中で分化するため, 骨髄細胞の肝細胞への分化を評価するためにはやはり *In vivo* model の開発が必要と考える (図1)。過去の血球幹細胞が肝細胞に分化し, その結果肝臓の機能を代償したことについては, チロシン血漿突然変異マウス (FAH 欠損マウス) に対し, β -

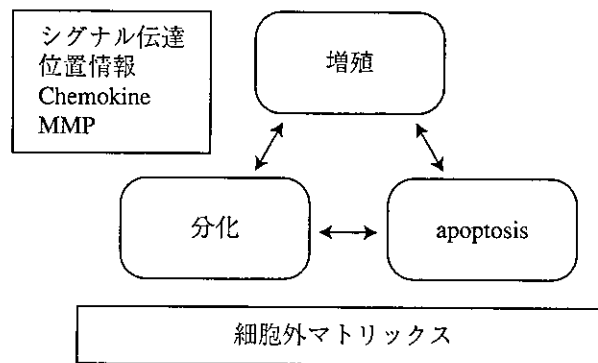


図1 臓器形成を決定する微小環境 (niche)

galactosidase (β gal) 陽性の血球幹細胞の投与により, 移植した β gal 陽性細胞が肝臓に cluster を作り定着し, 肝臓の機能がうまく代償されることで報告されている⁹⁾。過去のこのモデルを使った肝細胞移植のモデルにおいてもやはり同様の島状の cluster を作っている¹³⁾。このような移植細胞の cluster をわれわれは実際の臨床の現場においてはほとんどみることはないが, これらのモデルは移植細胞の肝臓への repopulation 率の評価においては非常に有用と考える。しかし, このモデルはやはり非常に特殊なモデルであり, 実際の移植モデルにおいては, より臨床に近い病態の recipient の条件を作った新たなモデルの開発が必要と考えられる。新たなモデルには β gal あるいは Green fluorescent protein (GFP) などの標識蛋白のトランスジェニックマウスを使うかあるいはレトロウイルスなどを用いて標識蛋白を発現するように操作を加えた細胞群を入れることで, 標識した骨髄細胞がどのような recipient の条件にて分化するかを評価するシステムの開発が必要と考える^{14,15)}。現在われわれは GFP transgenic mice と CCl₄ 投与により肝障害を起こしたマウスを用いたモデルの開発に成功しさらに解析を行っている (特許出願, 論文投稿中)。

4

骨髓中の肝幹細胞の問題 (骨髓細胞の可塑性の機序の問題)

過去の解析により肝臓に分化する可能性があると考えられる骨髓中の細胞は大きく3つ、血球幹細胞 (hematopoietic stem cell ; HSC)、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell ; MSC) また最近幹細胞として注目されている SP 細胞 (Side population cell) があげられる (図2)¹⁶⁾。実際に骨髓中のどの分画に肝幹細胞が存在しているかについては非常に混乱している状況である。最近になり、血球幹細胞が他の細胞系譜へ分化転換 (Trans-differentiation) することは少ないのではないかという反論がでてきている¹⁷⁾。この報告は骨髓細胞を用いて肝臓再生療法を考えることに対する否定的な報告であった。一方で骨髓間葉細胞に HGF, FGF を加え培養することにより、非常に可塑性に富む骨髓間葉系細胞由来の MAPC (Multipotent adult progenitor cells) の樹立に成功したとする報告もある^{18,19)}。この結果より、やはり骨髓中のある分画には肝細胞に分化し得る幹細胞群が存在すると考えられる。今後は、血球幹細胞あるいは間葉系幹細胞というのではなく、骨髓細胞中のどの分画が肝細胞に分化するかを新しいシステムを使い評価していく必要がある。臨床応用を考える上で何より大きいのは人の剖検例の結果である。Y 染色体陽性の細胞は実際に男性の donor からの骨髓移植を受けた女性 recipient の肝臓、腸管に確認されている^{11,12,20)}。この結果は骨髓細胞には肝細胞へ分化する可塑性が存在することを強く示唆し、将来再生療法に使えることを示すが、では実際にどのようなシステムで骨髓細胞が肝細胞へと Trans-differentiation するかについては全くわかっていない状況である。臓器形成は図1

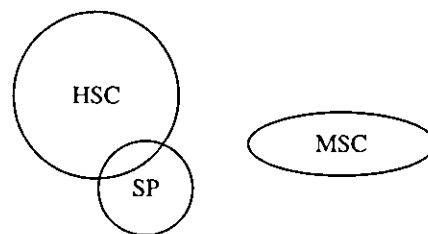


図2 骨髓中の肝幹細胞の候補

のように特殊な微小環境の niche において、分化、増殖、Apoptosis を繰り返しながら進んでいくと考えられ、今後肝発生研究を基盤とした詳細なメカニズムの開発が必要と考える。一方で Adult stem cell の他の細胞系譜への Trans-differentiation は細胞融合の結果により生じるという報告が相次いでなされた。この実験は薬剤耐性の GFP 陽性骨髓細胞と ES 細胞をある条件下にて培養することにより細胞融合を起こした 4N の GFP 陽性細胞が生じた実験結果から、成人幹細胞の存在について疑問を投げかけた報告である^{21,22)}。過去の骨髓移植医療において細胞融合が臨床問題になったことはほとんどない。この細胞融合については今後さらに解析が必要になるが、幹細胞の分化制御機構の解明が今後の再生医療を考える上で最も重要と考える。興味深いことに、過去のノックアウトマウス解析に伴う肝形成不全は、炎症性シグナル欠損の KO マウスで認められている。今後さらに詳細な解析が必要になってくるが、炎症性シグナルと幹細胞分化は今後詳細に解析しなければならない課題と考えられる²³⁻²⁵⁾。

5 Niche, 分化した細胞の運命の問題

最後に細胞の分化過程に伴う微小環境 niche の問題であるが、細胞の分化には Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) などの制御に伴うシグナルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された²⁶⁾。MMP は細胞外マ

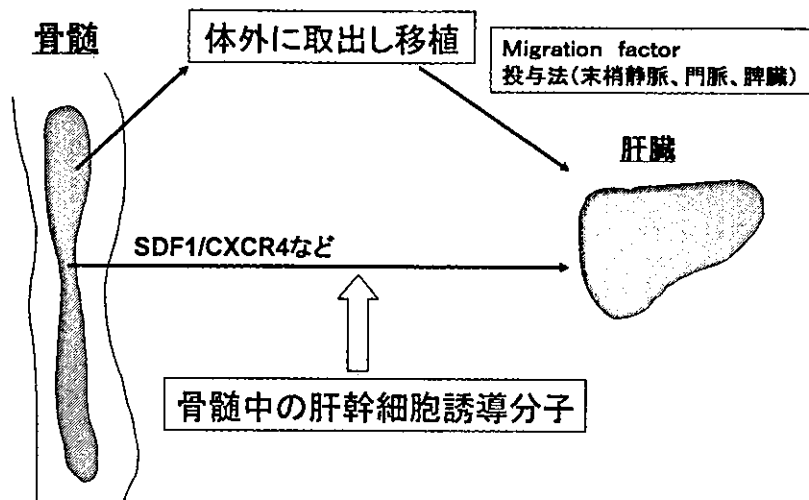


図3 実際に骨髄細胞を使った再生療法

トリックスのそのものを制御し、発生、再生段階においても細胞外マトリックスが非常に重要な役割を果たすと考えられる。今後このような視点での解析が必要になると考えられる。また実際に骨髄から肝細胞に分化した細胞のその後の運命が不明である。いったん骨髄から肝臓に定着した骨髄細胞と、もともと肝臓に存在する肝細胞との関連はどのようになっているのであろうか？これらについても現在全くわかっていない状況である。これらの問題を踏まえ、今後研究を展開する必要がある。

6 骨髄中に内在する幹細胞の肝臓への誘導の可能性

最後に実際に医療の現場を考えた場合の骨髄細胞の投与方法の問題である(図3)。自己骨髄細胞を使った場合の投与方法には、末梢静脈からの投与、脾臓注入、門脈注入が考えられる。末梢から投与した場合には、肝臓への遊走を積極的に促進するケモカインなどの因子の同定が非常に重要と考えられる²⁷⁾。また採取した自己骨髄細胞の単純投与と、何らかの培養を行い体外で骨髄細胞から肝幹細胞を誘導する方法がどちらがいいかについて

は現在のところ全くわからない状況である。最終的には内在の骨髄中の肝幹細胞を血球幹細胞における G-CSF などのような、骨髄細胞を新たに肝細胞に分化させ、さらに障害を受けた肝臓に積極的に遊走させるような因子の同定による効率のよい再生療法の開発を目指した基礎研究は今後重要と考えられる。

7 さいごに

現在、われわれのグループは平成14年より始まった厚生労働省の(基礎研究成果の臨床応用推進事業)の一つとして(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)の基礎研究、臨床研究を行っている。効率的な細胞療法(再生療法)の開発のためには以上の問題点の解明と、肝発生、肝再生の統合的な知識の集約が必要であり、今後さらなる解析を進めていく。

文献

- 1) Thomson JA, Odorico JS : Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. Trends Biotechnol 18 : 53-57, 2000
- 2) Potten CS : Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353 : 821-830, 1998
- 3) Grisham JW, Thorgeirsson SS : Liver stem cells.

- Potten CS (ed.), ACADEMIC PRESS INC, Manchester, 1997
- 4) Gage FH : Mammalian neural stem cells. *Science* 287 : 1433-1438, 2000
 - 5) Suzuki A, Zheng Y, Kondo R et al : Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32 : 1230-1239, 2000
 - 6) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999
 - 7) Alison MR, Poulsom R, Jeffery R et al : Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406 : 257, 2000
 - 8) Theise ND, Badve S, Saxena R et al : Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31 : 235-240, 2000
 - 9) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 6 : 1229-1234, 2000
 - 10) Krause DS, Theise ND, Collector MI et al : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105 : 369-377, 2001
 - 11) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M et al : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8 : 1011-1017, 2002
 - 12) Korbling M, Katz RL, Khanna A et al : Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 346 : 738-746, 2002
 - 13) Gupta S, Rajvanshi P, Aragona E et al : Transplanted hepatocytes proliferate differently after CCl₄ treatment and hepatocyte growth factor infusion. *Am J Physiol* 276 : G629-638, 1999
 - 14) Okabe M, Ikawa M, Kominami K et al : 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407 : 313-319, 1997
 - 15) Terai S, Yamaoto N, Omori K et al : A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J Gastroenterology* 37 (Suppl XIV) : 162-163, 2002
 - 16) Poulsom R, Alison MR, Forbes S et al : Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 197 : 441-456, 2002
 - 17) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL et al : Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297 : 2256-2259, 2002
 - 18) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L et al : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109 : 1291-1302, 2002
 - 19) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002
 - 20) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32 : 11-16, 2000
 - 21) Ying QL, Nichols J, Evans EP et al : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416 : 545-548, 2002
 - 22) Terada N, Hamazaki T, Oka M et al : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 : 542-545, 2002
 - 23) Beg AA, Sha WC, Bronson RT et al : Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376 : 167-170, 1995
 - 24) Li J, Ning G, Duncan SA : Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 14 : 464-474, 2000
 - 25) Nishina H, Vaz C, Billia P et al : Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 126 : 505-516, 1999
 - 26) Heissig B, Hattori K, Dias S et al : Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires mmp-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109 : 625-637, 2002
 - 27) Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A et al : G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3 : 687-694, 2002

Annual Review 消化器 2004

2004年1月30日発行

中外医学社

6. 肝細胞癌の病態と診断

山口大学医学部消化器病態内科学 高見太郎

同 消化器病態内科学 寺井崇二

同 消化器病態内科学教授 沖田 極

key words hepatocellular carcinoma (HCC), carcinogenesis, comparative genomic hybridization (CGH), DNA-chip, proteomics, transgenic mice model, choline deficient L-amino acid defined diet (CDAA) rat model, tumor marker, AFP (L3)

動 向

肝細胞癌 hepatocellular carcinoma (HCC) は全世界の癌の約5.5%を占め、日本では2002年の人口動態統計年計概数(厚生労働省)によると肝癌(肝および肝内胆管由来の悪性新生物)による死亡者は34,615人で、癌の部位別では、男性では4位、女性では3位を占めている。また、肝癌の94.92%が肝細胞癌で、16.8%がHBs抗原陽性、72.3%がHCV抗体陽性であった¹⁾。このように、肝炎ウイルスの持続感染により惹起される持続炎症および肝線維化と肝発癌とは密接な関係があることは疑う余地がない^{2,3)}。しかし、同じ持続炎症でもアルコール性肝炎や自己免疫性肝炎の発癌率は、ウイルス性より低いことからウイルス自体の直接的な発癌作用の存在が示唆される。本稿では、最近まで報告された知見を中心に、肝発癌のメカニズムおよび肝細胞癌診断の進歩について概説する。

A. 肝細胞癌の病態、肝発癌のメカニズム

1. これまでに報告された遺伝子異常

まずは大きく染色体異常をみる方法である

comparative genomic hybridization (CGH) 法を用いた変化について述べる。

LOH (loss of heterozygosity) はヘテロ接合性の消失といわれ、2倍体染色体の相同染色体において、一方が欠失や点変異によりホモ結合体となった状態である。そのためLOHがあると、残った相同染色体の遺伝子異常が容易に発現型として現れることになり、肝細胞癌で認められるLOHは癌抑制遺伝子の欠失を反映していると考えられる。肝細胞癌の全染色体遺伝子異常の解析をCGH法により行った結果、肝硬変から早期肝細胞癌(直径2cm以下、高分化型肝細胞癌)の過程では、4q, 8p, 10q, 16q, 17pの欠失と1q, 8q24の増幅が認められ、これらは発癌早期に関与すると考えられた。さらに進行肝細胞癌に進展する過程で、13q13-14の欠失や11q13の増幅が相加されることが明らかになった⁴⁾。このうち13qにはRb遺伝子が、17q領域にはp53遺伝子があり、これら癌抑制遺伝子の関与が示唆される。

一方、個々の遺伝子レベルの異常としては、CDH1, TP53, IGF2R (M6P), RB1, CDKN2A (p16^{INK4A}), PTEN, DLC1, TP73, EXT1, MLH1, THRB, THRA, E2F4, CTNNB1がそ

それぞれ独立した研究により報告されている⁵⁾。さらには近年、DNA-chipを用いた肝細胞癌の遺伝子プロファイリングにより遺伝子レベルの異常を網羅的に捉える研究が行われている。金沢大学のShirota, KanekoらによるDNA-chipを用いた肝細胞癌の遺伝子異常の解析では、cytoplasmic dynein light chain (hdlc1), hepatoma-derived growth factor, ribosomal protein L6, human glutathione S-transferase, ras homolog gene family, member B (rhoB), c-myc transcription factor (puf)などの発現増強が、plasminogen, cytochrome P450, subfamily IIC, human intercrine- α (hIRH), GRO2 oncogeneなどの発現低下が認められた⁶⁾。さらに金沢大学のYamashitaらによるserial analysis of gene expression (SAGE)による解析では、IFN- γ やextracellular matrix proteinのGlypican3などの発現増加が報告されている⁷⁾。しかし肝発癌に関与する決定的な遺伝子はいまだ明らかにはなっていないのが現状である。

またポストゲノムといわれる今日、新たなアプローチとして肝細胞癌に発現する蛋白質の網羅的解析から肝発癌に関与する因子を同定しようとするプロテオミクス研究が本格化しており、その成果が期待される。

2. 動物モデルによる肝発癌機構の解析

肝発癌機構研究の多くはこれまでトランスジェニックモデルや化学発癌モデルの解析を通し行われてきた。ここではトランスジェニックモデルや化学発癌モデルからみた肝発癌機構について概説する。

a. トランスジェニックマウスモデル

主なものには、HBs抗原, HBV X (HBx), α -1-anti-trypsin, urokinase-type plasminogen activator (uPA), SV40 Tag, c-Harvey-ras, Cyclin D1, Transforming growth factor- α

(TGF- α), hepatocyte growth factor (HGF), c-myc/TGF- α , Bcl-2/TGF- α , HCV core 蛋白などを遺伝子導入した動物モデルが報告されている。

(1) c-myc/TGF- α トランスジェニックマウスモデル: ヒト肝細胞癌症例では、c-mycおよびTGF- α 両者の発現亢進が報告されており、c-mycおよびTGF- α 両者を遺伝子導入したマウスでは、c-myc単独に比べ肝細胞癌の発生率が高い^{8,9)}。c-mycにより誘導されるアポトーシスはTGF- α により抑制され細胞増殖は亢進し、DNA障害の蓄積やTGF- β の誘導により肝細胞癌の発生が認められる。

(2) HBxトランスジェニックマウスモデル: HBVにより各種蛋白が産生されるが、なかでもHBx蛋白と肝発癌との関与が注目されている¹⁰⁻¹²⁾。HBx蛋白は宿主細胞のさまざまな蛋白と結合することが報告されている。なかでも、HBx蛋白はp53遺伝子と結合しこれを不活化させるだけではなく、HBx蛋白自体のトランス活性化作用¹³⁾による転写亢進や、HIV-Long terminal repeat (LTR)のNF κ B様配列¹⁴⁾、SV40エンハンサーのAP-1, AP-2配列¹⁶⁾への作用や、カスパーゼ3活性を抑制しアポトーシスを抑えるなど¹⁵⁾、HBxトランスジェニックマウスでは80%以上の発癌率が報告されている¹⁰⁾。このようにHBVウイルス自体が直接肝発癌に関与する可能性が示唆される。

(3) HCV core 遺伝子導入トランスジェニックマウスモデル: HCV core 蛋白質は転写調節能をもち、insulin-like growth factor-2 (IGF-2)やc-mycのプロモーターを活性化し、p53やp21のプロモーターを抑制するなどの報告がある。さらにはNF κ BやAP-1を活性化することも報告されている¹⁶⁾。MoriyaらはHCV core 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおいて、肝炎という炎症なしに20~30%の肝発癌が認められることを報告した¹⁷⁾。一方でこのモデルではヒトC型慢

性肝炎の組織学的特徴の一つである脂肪化 (steatosis) が認められ、肝炎という炎症なしに活性酸素 reactive oxygen species (ROS) の産生が増加している。現在この部分については活性酸素、ラジカル産生などに関する研究が進められている。

b. 化学発癌モデル

我々が長年解析してきたコリン欠乏アミノ酸置換食 choline deficient L-amino acid defined diet (CDAA) モデルは、peri-ductal にラットの肝幹細胞と考えられている卵円型細胞 oval cell が出現し、これが増殖し前癌性病変をつくり、肝細胞癌へと進展する、肝壊死～再生～発癌過程を評価しうる動物実験モデルである。この実験モデルでは、酸化ストレスすなわちラジカルによる DNA 障害の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の増加が認められている¹⁸⁾。同様にヒト慢性肝炎や肝硬変の肝組織中でも 8-OH-dG の増加が認められ¹⁹⁾、酸化ストレスの肝発癌への関与が示唆されるなど、このモデルの知見はヒト肝発癌メカニズムの解明において非常に有用と考えられる。さらに我々は、この実験系において肝線維化を抑制することで肝発癌過程を遅延させることを報告してきたが²⁰⁾、最近、茵陳蒿湯に抗線維化作用があり、発癌抑制作用があることが示唆された²¹⁾。また我々は、L-システインにも DMN による肝線維化を抑制する作用があることを報告した²²⁾。

B. 肝細胞癌診断の進歩

肝細胞癌の診断は血液診断と画像診断の両輪からなる。肝細胞癌治療後の再発は、年率 15～20% 程度、実に 5 年間で 80% の患者に再発が認められるため、早期診断は大変重要である。

肝細胞癌の腫瘍マーカーには、AFP、PIVKA-II, novel γ -GTP, variant ALP がある。AFP 陽

性率はステージの進行に伴って上昇するものの、高分化型肝細胞癌では 30～40% の陽性率²³⁾ (AFP20ng/ml 以上) にすぎず、良性肝疾患でもその上昇を認めることがある。肝細胞癌が産生する AFP には、良性肝疾患由来の AFP とは異なり、結合糖鎖に α 1-6 フコースが結合している (フコシル化) ことが明らかとなり、肝細胞癌の鑑別診断にフコシル化分画 (L3 分画) が有用であることが報告された²⁴⁾。その他には、Glypican 3 が肝細胞癌患者の血清 (53%) や癌組織 (72%) で発現が増加していたとの報告がある²⁵⁾。

再発診断に関して、飯塚らは DNA マイクロアレイによる術後早期 (1 年以内) 肝内再発予測システムを開発し報告した²⁶⁾。DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイル (Training set) から術後早期肝内再発と関連する 12 遺伝子を supervised learning in statistical pattern recognition (SSPR) 法にて選択し作成した予測システムにより、27 例 (Blind set) 中 25 例 (93%) を正しく予測することができた。術後の化学療法の可否判断や、術後再発の早期発見に役に立つものと期待される。

むすび

これまでの肝発癌研究および肝細胞癌診断の進歩について代表的なものを紹介した。一方で癌の起源は、自己複製の制御を失った幹細胞すなわち癌幹細胞であるという概念が紹介され注目されている²⁷⁾。幹細胞と癌幹細胞とでは、細胞増殖にかかわるシグナル伝達経路自体は同じものと考えられており、この点で臓器の発生分化と発癌過程とには共通の制御機構が存在するのではないかと考えられている。したがって今後、癌幹細胞の制御機構の解明には、幹細胞の発生分化制御機構の解析が重要になってくるのではないかと考えられる。我々の教室では、肝幹細胞の発生分化および肝発癌に関与すると考えられるヒト新規 Helix-

Loop-Helix 型転写制御分子, Human homologue of Maf (HHM) をクローニングし²⁸⁾, その機能解析を進めている。最近の知見では CDAA 食モデルの前癌性病変部および肝細胞癌部に HHM の発現を認めるなど肝発癌への関与が示唆されている。

このように, これまでにも肝細胞癌の遺伝子異常や, 肝発癌に関与する遺伝子群は数多く報告されているが, 肝発癌機構は未知な部分が多いのが現状である。今回報告した以外にも DNA-chip やプロテオミクスによる解析が進められており, 今後の研究が期待される。

文献

- 1) 日本肝癌研究会. 第15回全国原発性肝癌追跡調査報告(1998~1999). (2002).
- 2) Ikeda K, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 1998; 28: 930-8.
- 3) Yoshida H, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 1999; 133: 174-81.
- 4) Kusano N, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: Their relationship to clinicopathological features. *Hepatology* 1999; 29: 1858-62.
- 5) Snorri S, Thorgeirsson, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics* 2002; 31: 339-46.
- 6) Shirota Y, et al. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001; 33: 832-46.
- 7) Yamashita T, et al. Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 647-54.
- 8) Santoni-Rugiu E, et al. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice c-myc and transforming growth factor- α . *Am J Pathology* 1996; 149: 407-28.
- 9) Santoni-Rugiu E, et al. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expression c-myc and transforming growth factor α . *Cancer Res* 1998; 58: 123-34.
- 10) Kim CM, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991; 351: 317-20.
- 11) Koike K, et al. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994; 19: 810-9.
- 12) Paterlini P, et al. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 313-21.
- 13) Twu JS, et al. Transcriptional transactivating function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 3448-53.
- 14) Seto E, et al. Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85: 8286-90.
- 15) Gottlob K, et al. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase3 activity. *J Biol Chem* 1997; 273: 33347-53.
- 16) Kato N, et al. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000; 32: 405-12.
- 17) Moriya K, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 1998; 4: 1065-7.
- 18) Nakae D, et al. Different role of 8-hydroxydeoxyguanosine formation and 2-thiobarbituric acid-reacting substance generation in the early phase of liver carcinogenesis induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Jpn J Cancer Res* 1994; 54: 3171-2.
- 19) Shimada R, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994; 54: 3171-2.
- 20) Sakaida I, et al. Prevention of fibrosis reduces enzyme-altered lesions in the rat liver. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2201-6.
- 21) Sakaida I, et al. Herbal medicine Inchin-ko-to(TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered

- lesions in rat cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol* 2003; 38: 762-9.
- 22) Horie T, et al. L-Cysteine administration prevents liver fibrosis by suppressing hepatic stellate cell proliferation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 94-100.
- 23) Okuda H, et al. Serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin measured using the revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity in relation to clinico-pathologic features of solitary hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 544-9.
- 24) Aoyagi Y, et al. Fucosylation index of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1998; 61: 769-74.
- 25) Mariana C, et al. Glypican-3: A novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97.
- 26) Iizuka N, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 2003; 361: 923-9.
- 27) Tannishtha R, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- 28) Terai S, et al. Human homologue of Maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. *Hepatology* 2000; 32: 357-66.

K. Okita (Ed.)

Stem Cell and Liver Regeneration

With 28 Figures, Including 3 in Color



Springer

SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- κ B-Induced Anti-Apoptosis

HIROSHI NISHINA, TOMOMI WATANABE, KENTARO NAKAGAWA, SHINYA OHATA, SATOSHI ASAKA, and TOSHIAKI KATADA

Summary. Mice lacking the stress-signaling kinases SEK1 and MKK7 die from embryonic day 10.5 (E10.5) to E12.5 with a defect in liver formation. However, the mechanism of the liver defect has remained unknown. In this review, we first introduce a monoclonal antibody, anti-Liv2, which specifically recognizes murine hepatoblasts, for the analysis of liver development, and further, we describe the genetic interaction of *sek1* with the tumor necrosis factor- α receptor 1 gene (*tnfr1*) and the protooncogene *c-jun*, which are also responsible for liver formation and cell apoptosis. The defective liver formation in *sek1*^{-/-} embryos was not protected by an additional *tnfr1* mutation that rescues the embryonic lethality of mice lacking nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling components. There was a progressive increase in hepatoblast cell numbers in wild-type embryos from E10.5 to E12.5. In contrast, impaired hepatoblast proliferation was observed in *sek1*^{-/-} livers from E10.5, although fetal liver-specific gene expression was normal. The impaired phenotype in *sek1*^{-/-} livers was more severe than that in *c-jun*^{-/-} embryos, and *sek1*^{-/-} *c-jun*^{-/-} embryos died earlier before E8.5. The hepatoblast proliferation required no hematopoiesis, because liver development was not impaired in *AML1*^{-/-} mice, which lack hematopoietic functions. Stimulation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) by hepatocyte growth factor was attenuated in *sek1*^{-/-} livers. Thus, SEK1 and MKK7-mediated SAPK/JNK signaling appears to play a crucial role in hepatoblast proliferation and survival in a manner that is apparently different from that of NF- κ B or c-Jun.

Key words. SEK1, NF- κ B, SAPK/JNK, Hepatoblast, Hepatogenesis

Introduction

Embryonic liver formation consists of multiple stages and is under the influence of hormonal factors, as well as intercellular and matrix-cellular interactions. In mice, the initial event of liver ontogeny occurs around embryonic day 9 (E9), when epithelial cells of the foregut endoderm commit to become the liver primordium through their interaction with the cardiogenic mesoderm. The liver primordium proliferates and

Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

invades the mesenchyme of the septum transversum to give rise to the hepatic cords and bud at E9.5. A critical genetic checkpoint in embryogenesis is the switch from yolk sac- and aorta-gonad-mesonephros region-dependent blood formation to liver-dependent hematopoiesis. This switch in the hematopoietic organ occurs from E10.5 to E12.5. The next major stage occurs around E14.5 when both hepatocytes and bile-duct epithelial cells arise embryologically from a common founder cell, the hepatoblast, which has bipotential differentiation capabilities in liver development [1,2].

The degree of hepatic maturation has been characterized by the expression of liver- and stage-specific genes [3,4]. Alphafetoprotein (AFP) is an early fetal hepatic marker (E9), and its expression decreases as the liver develops [5]. In contrast, the expression of albumin, the most abundant protein synthesized by hepatocytes, starts in early fetal hepatocytes (E12) and reaches the maximal level in the adult [6]. However, antibodies specific for AFP or albumin are not adequate to estimate the precise numbers of hepatoblasts in early fetal livers at E9.5–12.5, because both are diffusible serum proteins. Therefore, novel antibodies that clearly and specifically recognize individual hepatoblasts are required for studying fetal liver development in detail [7].

Recently, it has been shown by using ventral foregut endoderm isolated from mouse embryos at E8.25, that the close proximity of the cardiac mesoderm, which expresses fibroblast growth factors (FGFs) 1, 2, and 8, causes the foregut endoderm to develop into the liver [8,9]. On the other hand, another recent report has indicated a paracrine mechanism of late hepatogenesis that is derived from E14.5 murine embryos in cultured fetal liver cells. Blood cells in the fetal liver produce an interleukin (IL) 6-family cytokine, oncostatin M (OSM), to promote the development of hepatocytes [10]. However, the relationship between hepatogenesis and hematopoiesis in early fetal liver development remains unclear.

The stress-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinases, SEK1/MKK4 and SEK2/MKK7, are direct activators of the stress-activated protein kinase (SAPK; also called c-Jun N-terminal kinase; JNK). Both are activated in response to a variety of cellular stresses, such as changes in osmolarity, metabolic poisons, DNA damage, heat shock, or the inflammatory cytokines, IL-1 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). SEK1 and/or MKK7-mediated activation of SAPK/JNK phosphorylates c-Jun and activates c-Jun/Fos heterodimeric (AP-1) transcriptional complexes [11,12]. Several groups, including ours, have disrupted the *sek1* gene in mice, using homologous recombination [13–17]. SEK1-deficient embryos displayed severe anemia and died between E10.5 and E12.5. Hematopoiesis from yolk-sac precursors and vasculogenesis were normal in SEK1-deficient embryos. However, hepatogenesis and liver formation were severely impaired in the mutant embryos, and SEK1-deficient embryos had greatly reduced numbers of hepatocytes at E11.5–12.5. Although formation of the primordial liver and hepatic bud appeared to be normal, SEK1-deficient hepatocytes underwent massive apoptosis at E12.5 [15,17]. Embryos lacking the *c-jun* gene also display defective liver organization and die between E11.5 and E15.5 [18,19]. These results indicate that SEK1 and c-Jun provide a crucial and specific survival signal for fetal hepatogenesis. It is as yet unclear where SEK1 plays a role in hematopoietic cells or in hepatogenesis, what receptors trigger SEK1 activation, and what molecules regulate the SEK1-mediated signaling pathway in fetal liver development.

TNF- α elicits a wide range of biological responses, such as inflammation, tumor necrosis, differentiation, cell proliferation, and apoptosis, through the stimulation of

its receptor, TNFR1. Recently, it has been revealed that three separate signaling pathways, the induction of apoptosis, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation, and SEK1 and/or MKK7-mediated SAPK/JNK activation, are simultaneously mediated through TNFR1, and that SAPK/JNK activation appears to be not involved in the TNFR1-dependent induction of apoptosis, while the activation of NF- κ B protects against the apoptosis [20]. Knockout mice for genes that are involved in NF- κ B signaling have massive liver degeneration and apoptosis during midgestation, at E12.5–16. Such mice include knockout mice, for the RelA subunit of transcription factor NF- κ B (died at E15–16), I κ B kinase (β /IKK2; died at E12.5–14), NEMO/IKK γ (died at E12.5–13.0), and TRAF2-associated kinase T2K; died at E12.5–14.5) [21–26]. Importantly, the embryonic lethality and liver apoptosis observed in RelA-, IKK2- and T2K-knockout mice can be rescued by the simultaneous inactivation of TNFR1, suggesting that the apoptosis is induced by TNF- α circulating in the embryos [22,26,27]. However, the physiological role of the SEK1 and/or MKK7-mediated activation of SAPK/JNK in response to TNFR1 ligation remains to be resolved [20].

To understand the mechanisms of defective liver formation, we prepared monoclonal antibodies that specifically recognized murine fetal livers and characterized them using paraffin sections of embryos at various stages. One of the antibodies called anti-Liv2, specifically recognized so-called hepatoblasts at E9.5–12.5. We examined the relationship between the lethality of *sek1*^{-/-} embryos and TNFR1-mediated apoptosis in mice lacking these genes. We found that *sek1*^{-/-} *tnfr1*^{-/-} double-mutant embryos delayed the beginning of liver resorption by 2 days compared with *sek1*^{-/-} *tnfr1*^{+/-} embryos, and that the liver defect was not rescued by the *sek1*^{-/-} *tnfr1*^{-/-} genotype. In addition, we investigated the ability of hepatoblast growth, as judged by the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU), in *sek1*^{-/-} embryos at E10.5 before the occurrence of defective liver formation and massive apoptosis. We found a growth defect of hepatoblasts in *sek1*^{-/-} embryos at E10.5. Furthermore, we showed that hepatoblasts could develop without hematopoiesis in early fetal liver at E9.5–11.5, using *AML1*^{-/-} embryos, which lack definitive hematopoiesis [28,29]. The activation of SAPK/JNK by hepatocyte growth factor (HGF), observable in wild-type fetal livers, was markedly impaired in *sek1*^{-/-} fetal livers. Thus, the lethality of *sek1* mutant embryos is most likely due to a defect that reflects SEK1 function and is not associated with NF- κ B-induced anti-apoptosis in the cell growth of hepatoblasts [7].

A Novel Monoclonal Antibody, Anti-Liv2, Specifically Recognizes Hepatoblasts in Murine Embryos

To investigate fetal liver development in murine embryos at the early stage of E9.5–12.5, we prepared novel rat monoclonal antibodies against the fetal livers at E11.5 [7]. As shown in Fig. 1, one of the antibodies, anti-Liv2, specifically recognized hepatic cells that were co-stained with anti-HNF-3 β antibody (Fig. 1A,B,D), but did not recognize TER119-positive erythrocytes. Although the nature of the Liv2 antigen has not been identified yet, the cell membrane of hepatic cells was stained with the monoclonal antibody, but the cytoplasm and nuclei were not (Fig. 1C). Almost all cells in the hepatic bud at E9.5 were recognized by anti-Liv2 (Fig. 1E,F). Interestingly, there was a progressive decrease in the ratio of Liv2-positive cells to the total number of

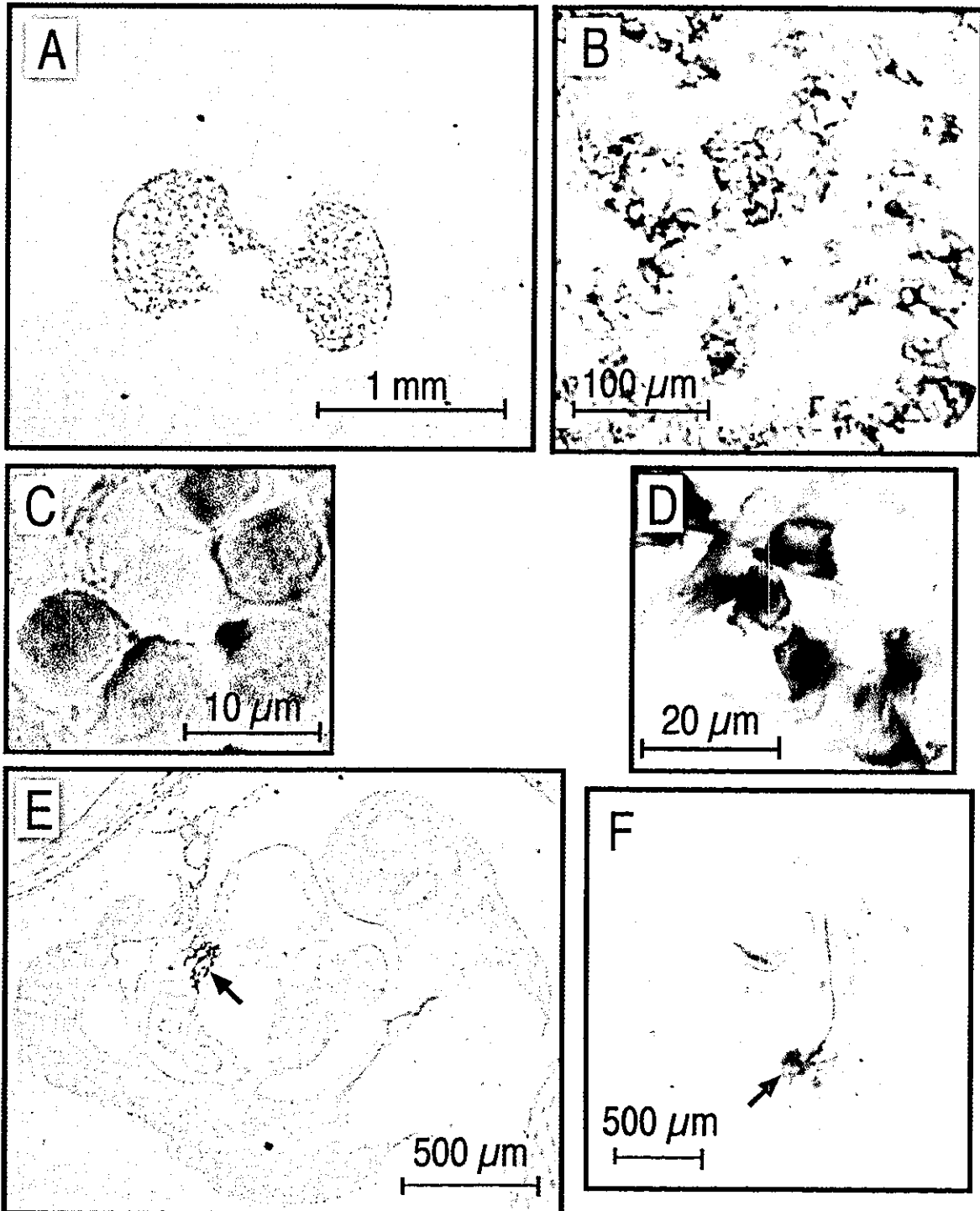


Fig. 1A-E. Characterization of a novel rat monoclonal antibody, anti-Liv2, which shows specific recognition of hepatoblasts in murine embryos. Transverse paraffin sections of murine embryonic livers at embryonic day 11.5 (E11.5) (A-C) and E9.5 (E), together with a frozen section at E11.5 (D) and a whole embryo at E9.5 (F), were stained with the rat monoclonal antibody, anti-Liv2. Positive cells exhibit a *brown* (A-C, and E) or *dark blue* (D and E) precipitate. **D** The frozen section containing Liv2-positive cells (*dark blue*) was further stained with anti-HNF-3 β (*brown*). The *arrows* show hepatic buds

cells as the fetal liver developed from E9.5 to E12.5. Thus, it is very likely that anti-Liv2 specifically recognizes the so-called hepatoblasts that appear with fetal liver development. This monoclonal antibody was employed in the present study as a useful tool to analyze hepatoblasts in various mutant mice.

A Different Role of SEK1 from that of NF- κ B-Induced Anti-Apoptosis in Fetal Liver Formation

As mentioned in the "Introduction", mice lacking SEK1 or NF- κ B signaling components show embryonic lethality, with impaired liver formation, furthermore, the activation of both SEK1 and NF- κ B is induced by TNFR1 in the fetal livers. Interestingly, liver apoptosis originating from the lack of NF- κ B signaling components was rescued by the inactivation of TNFR1 [22,26,27]. Therefore, we investigated the relationship between SEK1- and TNFR1-mediated signaling pathways in whole embryos and fetal livers. C57BL/6-background *sek1^{-/-} tnfr1^{-/-}* embryos were prepared from *sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}* intercrosses, and *sek1^{-/-} tnfr1^{+/-}* embryos were prepared from *sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}* and *sek1^{+/-} tnfr1^{+/-}* intercrosses (Table 1). Embryos of all three expected genotypes from *sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}* and *sek1^{+/-} tnfr1^{+/-}* intercrosses were not present at normal Mendelian ratios at E12.5 (Table 1, left side). Interestingly, embryos of all three expected genotypes from *sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}* intercrosses were present at the normal Mendelian ratios until E13.5 and became abnormal at E14.5 (Table 1, right side). Embryo resorption was thus rescued by 2 days. The apparent sizes of *sek1^{-/-} tnfr1^{-/-}* embryos and livers were almost the same as those of the wild-type at E11.5 (Fig. 2A,B). However, liver defects were not rescued in *sek1^{-/-} tnfr1^{-/-}* embryos (Fig. 2E,G). The SEK1-deficient livers contained a capsule, hematopoietic precursors, and disorganized islands of Liv2-positive hepatoblasts (Fig. 2F), and these defects were still observed in *sek1^{-/-} tnfr1^{-/-}* livers (Fig. 2E,G). These results clearly indicate that embryo resorption is partially due to TNFR1-mediated signaling and that the role of SEK1 in fetal liver formation is different from that of NF- κ B signaling, whose defects were rescued by inactivation of TNFR1 function.

Table 1. Analysis of embryos obtained from *sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}* intercrosses or *sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}* and *sek1^{+/-} tnfr1^{+/-}* intercrosses

Embryonic stage	<i>sek1^{+/-} tnfr1^{+/-}</i>	<i>sek1^{+/-} tnfr1^{+/-}</i>	<i>sek1^{-/-} tnfr1^{+/-}</i>	<i>sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}</i>	<i>sek1^{+/-} tnfr1^{-/-}</i>	<i>sek1^{-/-} tnfr1^{-/-}</i>
E12.5	4	6	1*	12	34	15
E13.5	11	23	6*	17	33	17
E14.5	ND	ND	ND	9	16	1*

Asterisks indicate that embryos were under conditions of resorption

Embryos were isolated at the indicated time points of gestation and analyzed for Mendelian ratios of all three expected genotypes. Genotypes of embryos were determined by polymerase chain reaction (PCR), and the numbers of each genotype are listed in the Table.

ND, not determined

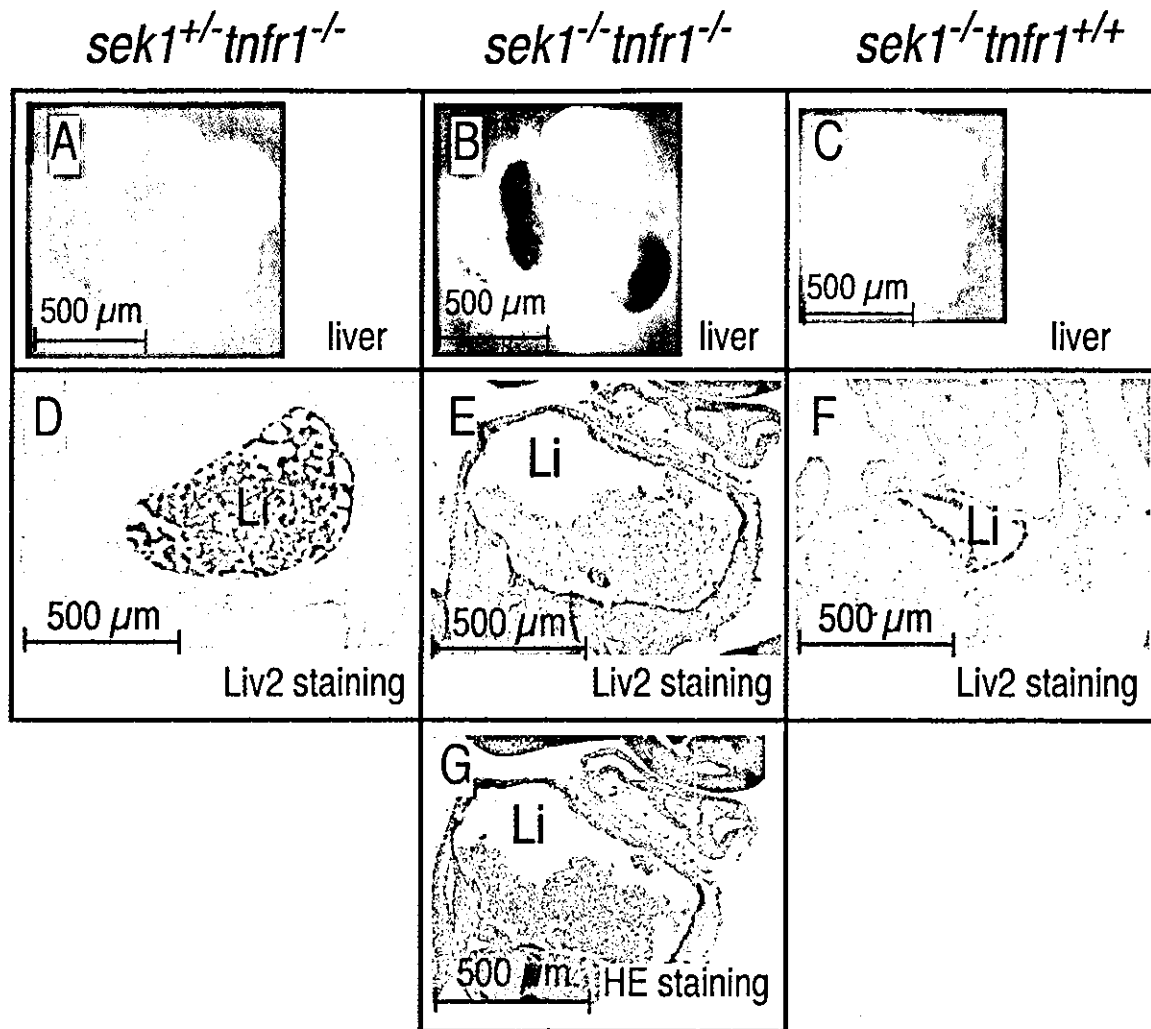


Fig. 2A–G. No rescue by tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) inactivation of defective liver formation in *sek1^{-/-}* embryos. Microscopic analysis was performed in *sek1^{+/-}tnfr1^{-/-}* (A and D), *sek1^{-/-}tnfr1^{-/-}* (B, E, and G), and *sek1^{-/-}tnfr1^{+/+}* (C and F) fetal livers at E11.5. Transverse sections were stained with anti-Liv2 (D–F) and HE (G). *Li*, liver. Bars, 500 μ m

SEK1-Deficient Livers Show a Decreased Number of Hepatoblasts in Early Hepatogenesis

To characterize *sek1^{-/-}* livers, we determined numbers of Liv2-positive cells in *c-jun^{-/-}* embryos, which also have defective liver formation [18,30]. Total cell numbers in *sek1^{-/-}* and *c-jun^{-/-}* livers were significantly lower than those in the wild-type liver. However, the ratio of Liv2-positive to the total number of liver cells was not significantly different among the three types of mice, and the ratios gradually decreased with liver development, being approximately 100% at E9.5, 60% at E10.5, 50% at E11.5, and 20% at E12.5. The number of Liv2-positive cells increased progressively, from 5×10^4 to 3×10^5 cells, during E10.5–12.5 in wild-type fetal livers. Although the numbers of Liv2-positive cells at E10.5 were not different among wild-type, *sek1^{-/-}*, and *c-jun^{-/-}* livers, the progressive increase observed in wild-type livers was markedly attenuated