

- 7) Garcia-Ruiz C, Morales A, Colell A et al : Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 21 : 207-214, 1995
- 8) Stramentinoli G, Gualano M, Ideo G : Protective role of S-adenosyl-L-methionine on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Biochem Pharmacol* 27 : 1431-1433, 1978
- 9) Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR et al : Chemoprevention by S-adenosyl-L-methionine of rat liver carcinogenesis initiated by 1,2-dimethylhydrazine and promoted by orotic acid. *Carcinogenesis* 16 : 427- 430, 1995
- 10) Avila MA, Berasain C, Torres L et al : Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 33 : 907-914, 2000
- 11) Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN : Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem* 255 : 4011-4019, 1980
- 12) Low SY, Salter M, Knowles RG et al : A quantitative analysis of the control of glutamine catabolism in rat liver cells. *Biochem J* 295 : 617-624, 1993
- 13) Bode BP, Kaminski DL, Souba WW et al : Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology* 21 : 511-520, 1995
- 14) Wasa M, Bode BP, Abcouwer SF et al : Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines. *Ann Surg* 224 : 189-197, 1996
- 15) Bode BP, Souba WW : Glutamine transport and human hepatocellular transformation. *J Parenter Enteral Nutr* 23 : 33-37, 1999
- 16) Bode BP, Souba WW : Modulation of cellular proliferation alters Glutamine transport and metabolism in human hepatoma cells. *Ann Surg* 220 : 411-424, 1994
- 17) 和佐勝史 : 癌増殖調節因子としてのグルタミンの役割. *医学の歩み* 198 : 897-900, 2001
- 18) Wasa M, Bode BP, Souba WW : Adaptive regulation of amino acid transport in nutrient-deprived human hepatomas. *Am J Surg* 171 : 163-169, 1996
- 19) Bounous G, Kongshavn PAL : The effect of dietary amino acids on immune reactivity. *Immunology* 35 : 257-266, 1978
- 20) Barbul A, Sisto DA, Wasserkrug HL et al : Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surgery* 90 : 244-251, 1981
- 21) Norris JR, Meadows GG, Massey LK et al : Tyrosine and phenylalanine-restricted formula diet augments immunological competence in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 51 : 188-196, 1990
- 22) 松股 孝, 他 : 慢性肝疾患患者の細胞免疫能低下の一因としてのアミノ酸代謝異常. *臨牀と研究* 75 : 177-180, 1998
- 23) Horie T, Sakaida I, Okita K et al : L-Cysteine administration prevents liver fibrosis by suppressing hepatic stellate cell proliferation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 305 : 94-100, 2003

* * *



テーマ◇肝癌の進展と分子機構

■ 演題 8

肝臓の発生分化と肝発癌に關与する Helix-Loop-Helix (HLH) 型転写 制御分子 Human Homologue of Maid (HHM) の機能解析

高見 太郎¹⁾・寺井 崇二¹⁾・大森 薫¹⁾・山本 直樹¹⁾・内田 耕一¹⁾

木村 輝昭²⁾・山崎 隆弘¹⁾・黒川 典枝¹⁾・坂井田 功¹⁾・宮本 康嗣²⁾

沖田 極¹⁾ 山口大学医学部先端分子応用医科学講座 1) 消化器病態内科学 2) 生体防御機能学

Key words : 肝幹細胞, 癌幹細胞, 肝発癌, 肝細胞癌, HLH 型転写制御分子, HHM

はじめに

幹細胞は「自己複製能と分化能とを合わせ持つ未分化な細胞」と一般に定義され、肝幹細胞は肝臓のヘリング管や骨髄中に存在し肝細胞、胆管細胞、膵臓細胞、小腸細胞への分化能をもつ細胞と考えられている。一方、自己複製能の制御を失った幹細胞こそが癌の起源である、という概念が最近紹介され注目されている¹⁾。この制御を失った幹細胞は Cancer stem cells (癌幹細胞) と呼ばれ、その増殖過程のシグナル伝達経路は、幹細胞の自己複製と同一のものと考えられている。このように臓器の発生分化と発癌は、ともに「幹細胞の自己複製と分化の調節」と機序において深い関わりがある (図 1)。した

がってわれわれは、肝発癌機構を解明するためには、肝幹細胞から肝細胞や胆管細胞への分化制御機構や、肝幹細胞の転写制御機構の理解が重要であると考えている。

一方、Helix-Loop-Helix (HLH) 型転写制御分子が細胞の発生分化に重要な役割を担っていることが、筋肉や膵臓、胆管細胞などで明らかとなっている。なかでも 1987 年 Weintraub らによりクローニングされた MyoD は、筋肉細胞の発生分化を制御するマスター遺伝子として有名である²⁾。筋肉においては、ubiquitous な発現をする E 12 などの I 型 HLH 型転写制御分子と、組織特異的に発現しマスター遺伝子と考えられる II 型 HLH 型転写制御分子 MyoD が hetero-dimer を形成し、この hetero-dim-

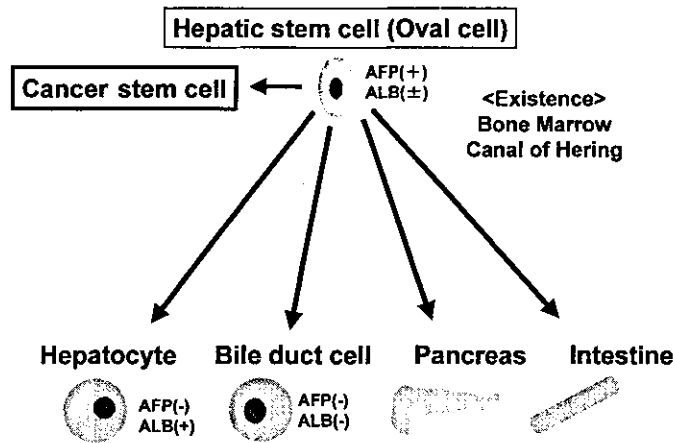


図1 Concept of Hepatic stem cell (Oval cell) and Cancer stem cell

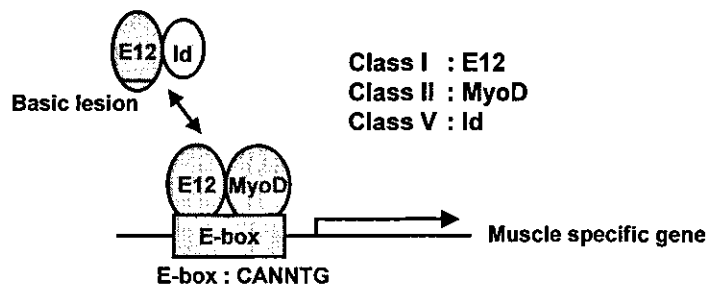


図2 Regulation of muscle cell differentiation by HLH transcription factors (E12/MyoD and Id)

merのbasic領域が、筋肉特異的遺伝子群の上流にあるCANNTGからなるE-boxに結合することで、筋肉細胞の発生分化に関与する遺伝子群が発現する。反対に、V型HLH型転写制御分子のId (Inhibitor of Differentiation) 群はE12などのI型HLH型転写制御分子とは結合できるものの、basic領域を欠くためE-boxとは結合できない。そのため結果的にE12/MyoDの形成を阻害することでdominant inhibitory機能を発揮し、分化の抑制に働いている(図2)。

肝臓においても、肝臓特異的遺伝子のAlpha-fetoproteinや、肝細胞分化促進因子Hepatic nuclear factor (HNF) 群のプロモーターやエンハンサー領域にもE-boxが存在するため、MyoD同様、肝臓の発生分化を制御するマスター遺伝子が存在するのではないかと考えた。

Human Homologue of Maid (HHM) の同定と、これまでの機能解析

肝臓におけるマスター遺伝子の存在を想定し、これを同定するため、Two hybrid screen法にて、I型HLH型転写制御分子E12のHLH領域をおとり蛋白とし、ヒト胎児肝cDNAライブラリーでスクリーニングを行った。この結果、360個のアミノ酸からなるヒト新規HLH型転写制御分子を同定した。これはマウス受精卵が二細胞期に入る過程で発現が上昇するMaternal Id-like molecule (Maid)³⁾のヒトホモログと考えられ、Human Homologue of Maid (HHM)と名付けた。HHMは、basic領域を欠くためII型HLH型転写制御分子ではないものの、leucine-zipper motifをもつ、Id群と同様のdominant inhibitory型HLH型転写制御分子と考えられた⁴⁾(図3)。

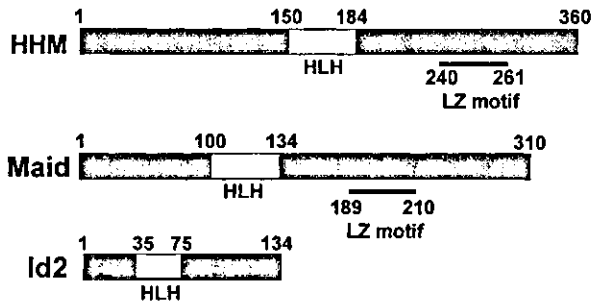


図 3 Structure of HHM, Maid, Id 2

HHM は Maid 分子同様、発生過程への関与が示唆されたため、肝幹細胞から肝細胞への発生分化過程を評価する動物実験モデル（ラット 2 アセトアミノフルオレン・部分肝切除モデル；AAF/PH モデル）を用い HHM mRNA の発現を観察した。そうしたところ、肝幹細胞の発生分化とともに HHM の発現は増加し、basophilic hepatocyte の foci 部に特異的な発現を in situ hybridization にて認めた⁴⁾（図 4）。さらに、肝細胞特異的転写因子 Hepatic Nuclear Factor 4（HNF 4）は肝細胞分化促進因子として知られている。この HNF 4 のプロモーターを解析したところ、肝臓特異的発現に関与する領域に E-box を認めたため、HHM の関与が考えられた。そのため HHM 発現時における HNF 4 プロモーターの転写活性をルシフェラーゼアッセイにて解析したところ、HHM は特異的に HNF 4 のプロモーターに対

する阻害能を有することが明らかになった⁴⁾（図 5）。

以上より HHM は、同定した肝幹細胞から肝細胞への発生分化過程で活性化し、HNF 4 の転写制御能を有することから、肝臓の発生分化に関与していると考えた。さらに今回、HHM の肝発癌における機能を明らかにするため、HHM の細胞分化増殖に与える影響を以下の方法で検討した。

I. 方 法

1. HHM の細胞周期に対する影響の解析

細胞周期への影響をアデノウイルス用いた HHM 強制発現系にてフローサイトメーター（FACS）により解析した。

2. HHM により誘導される遺伝子群の解析

アデノウイルスを用いた HHM 強制発現時に誘導される遺伝子群を DNA-chip（クロンテック社）にて解析した。

3. 肝発癌動物実験モデルにおける HHM mRNA の発現の検討

ラット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-ductual 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

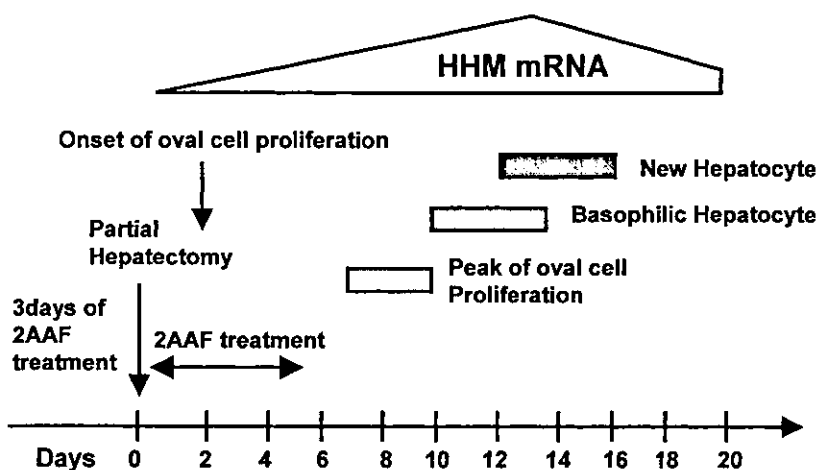


図 4 HHM mRNA expression in rat AAF/PH model

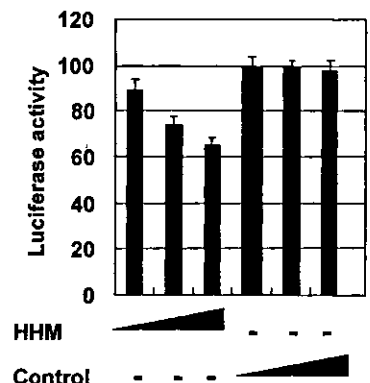


図 5 Inhibition of HHM on the transcriptional activation of Hepatic nuclear factor 4 (HNF 4) promoter

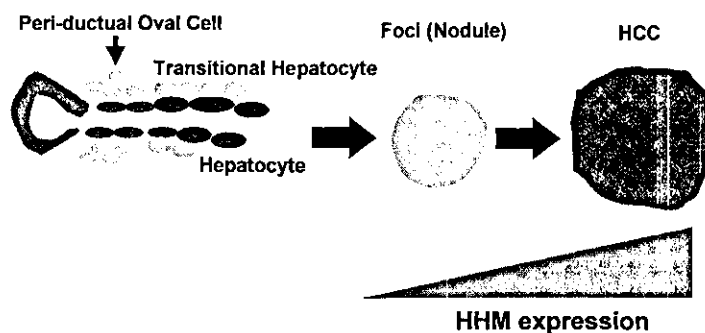


図6 HHM mRNA expression in CDA rat model

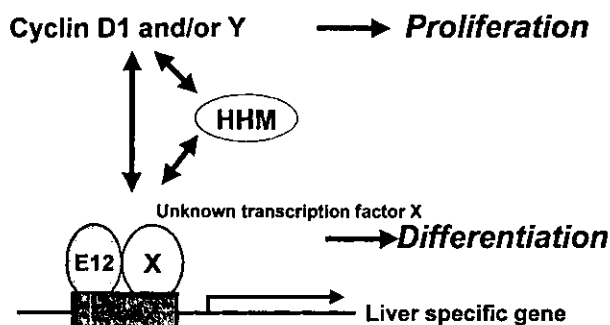


図7 Regulation of proliferation and differentiation by HHM

る動物実験モデルである。このモデルでのHHM mRNAの発現を *in situ* hybridization法で検討した。

4. ヒト肝細胞癌症例におけるHHM蛋白の発現の検討

HHMを特異的に認識するポリクローナル抗体を作成し、ヒト肝硬変、早期肝細胞癌、進行肝細胞癌におけるHHM蛋白の発現を免疫組織学的に検討した。

II. 結 果

1. HHMの細胞周期に対する影響の解析

前回の第4回肝発癌とその制御研究会において、HHMの発現により細胞周期のS期をおよそ5%増加させた、と報告した⁵⁾。今回はさらにHuman fibroblastであるNHDFを用いて検討した。その結果、HHM群はコントロールのLacZ群に比べG0/G1期が約10%低下、S期は約10%増加した。また、HepG2細胞でも同様であった。

2. HHMにより誘導される遺伝子群の解析
今回新たにアデノウイルスを用いたHHM強制発現時に誘導される遺伝子群を解析した。発現亢進する遺伝子群には、JAK 3, Epidermal growth factor receptor (EGFR), Cyclin D 2, Oncostatin Mなどがあり、発現が低下するものにはCadherinやIntegrinなどがあつた。

3. 肝発癌動物実験モデルにおけるHHM mRNAの発現の検討

背景肝にはHHM mRNA陽性部を認めないものの、前癌性病変と考えられるfoci部および肝細胞癌(HCC)部ともに陽性であつた。さらに今回その発現の程度を比較したところHCC部の方がfoci部より強く発現していることが明らかとなつた(図6)。

4. ヒト肝細胞癌症例におけるHHM蛋白の発現の検討

背景肝(肝硬変)には明らかなHHM陽性部を認めなかつた。HHMは進行肝細胞癌で92%(13/14)、早期肝細胞癌で77%(7/9)に陽性で、組織学的にも高分化型HCCでも75%(3/4)が陽性であつた。

結 論

HHMの肝発癌過程における機能を検討した。HHMの機能については不明な部分は多くあるが、さまざまな蛋白質と結合しながら、細胞の発生分化・増殖、さらには発癌過程に関与していると考えられた(図7)。HHMの細胞周期の検討では、S期へのentryを促進させることにより細胞増殖を亢進させる作用があると考え

た。さらに、肝発癌動物実験モデルである CDAA モデルの前癌性病変の段階ですでに HHM が発現していたこと、ヒト早期肝細胞癌でもその発現を認めたことは、肝発癌の早期段階に HHM が関与している可能性が考えられ、HHM の腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。今後さらに HHM の機能を明らかにし、肝発癌機構の解明につなげたい。

文 献

- 1) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al : Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414** : 105-111, 2001.
- 2) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB : Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51** : 987-1000, 1987.
- 3) Hwang S-Y, Oh B, Füchtbauer A et al : Maid : A maternally transcribed novel gene encoding a potential negative regulator of bHLH proteins in the mouse egg and zygote. *Dev Dyn* **209** : 217-226, 1997.
- 4) Terai S, Aoki H, Ashida K et al : Human homologue of Maid : A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. *Hepatology* **32** : 357-366, 2000.
- 5) 寺井崇二, 坂井田功, 高見太郎 他 : 肝発癌に関する転写制御分子 HHM. *医学と薬学* **47**(Suppl) : 4-10, 2002.

* * *

初期肝形成時のシグナル伝達機構

仁 科 博 史 渡 辺 智 美 大 畑 慎 也
浅 香 堅 田 利 明

「肝胆臓」 第46巻 第3号 別刷

(2003年3月)

アークメディア

初期肝形成時のシグナル伝達機構

仁 科 博 史* 渡 辺 智 美* 大 畑 慎 也*
浅 香 聡* 堅 田 利 明*

索引用語：アポトーシス，肝芽細胞，ノックアウトマウス，モノクローナル抗体，MAP キナーゼ

1 はじめに

哺乳動物の肝臓は，胎生期においては造血の場として，また成体においては胆汁の分泌，吸収栄養分の濾過と解毒，糖の貯蔵と血糖の調節などを行う必須の器官である。また，造血系と並び哺乳動物内での再生能の高さから，器官の発生や形成の分子機構の解明を目指す基礎生物学のみならず，再生医学の視点からも多くの注目を浴びている。近年になって，各種の遺伝子ノックアウトマウスの作出と解析によって，肝形成に関わる多数の因子が明らかにされつつある。本稿では，筆者らが作出した肝芽細胞特異的モノクローナル抗体や肝形成不全ノックアウトマウスから得られた結果を中心に，肝芽細胞の生死や増殖に関わる細胞内シグナル伝達系を概説する。

2 肝芽細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

マウスの肝形成は，胎生9日目(E9)から内胚葉性前腸から肝臓原基が形成され，多分

化能を有する内胚葉性幹細胞が成熟肝細胞や胆管上皮細胞の前駆細胞である肝芽細胞へと発生分化することから始まる(図1)。E10-12にかけて顕著な増殖を示す肝芽細胞は，自己増殖能と多分化能を有することから，発生期における肝幹細胞と考えることができる。E16以降になると肝実質細胞に加え，胆管上皮細胞などの細胞分化が進み，成熟肝を構成する基本単位である小葉構造が形成される。そしてE10-12に観察される肝芽細胞の活発な増殖期は初期肝形成，それ以降の細胞分化が誘導される時期は後期肝形成と便宜的に呼ばれている。肝芽細胞の代表的なマーカー分子として転写因子であるHNF3 β やアルファフェト蛋白質(AFP)などが知られているが，これら分子に対する既存の抗体の多くは，パラフィン固定されたマウス肝芽細胞を十分に認識しないこと，またAFPのような分泌性蛋白質の場合にはその抗体によって一つ一つの細胞を明瞭に区別することは原理的に困難であることから，肝芽細胞を定量的に検出する有効なツールとはなっていない。そこでわ

Hiroshi NISHINA et al : Signaling pathways in early fetal liver development

*東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室 [〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1]

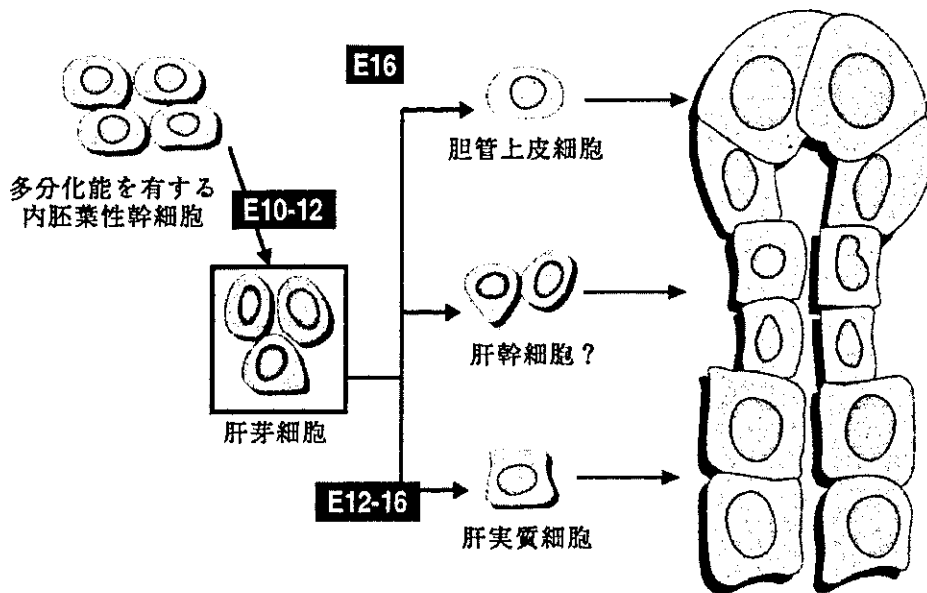


図1 マウス肝形成過程における細胞系譜

れわれは、パラフィン固定されたマウス肝芽細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を行った。胎生 11.5 日の胎児肝を抗原としてラットに免疫後、マウス胎児肝を含むパラフィン切片を用いたスクリーニングにより、胎児肝を特異的に認識するモノクローナル抗体を複数得ることに成功した(図 2A)。このうち、抗 Liv2 と名づけた抗体は、E11.5 の肝領域の HNF3 β 陽性細胞を認識すること(図 2D)、E9.5 の肝芽を特異的に認識すること(図 2E と F)、さらにこの抗体の認識部位は細胞膜であること(図 2C)から、肝芽細胞を特異的にかつ一つ一つを明瞭に識別可能な抗体であることが明らかとなった。以下に抗 Liv2 抗体を用いて各種ノックアウトマウスを解析し得られた結果を紹介する。

3 肝芽細胞は二次造血とは独立に発生する

マウス胎児肝は二次造血の場であることから、肝形成と造血との相互作用が考えられる。事実、E14.5 から調整された肝細胞は、血液細胞が産生するサイトカインであるオンコス

タチン M によって細胞分化が促進されることが示され、後期肝形成と造血との密接な関わりが示唆された²⁾。しかしながら、初期肝形成、特に肝芽細胞の発生と二次造血との関わりは不明な点が多い。そこでわれわれは、血液幹細胞を欠失し、二次造血が行われない AML1 や c-Myb ノックアウトマウスに肝芽細胞が発生するか否かを検討した。E11.5 の AML1 ノックアウトマウス胎児肝を構成する全細胞数は、野生型に比べて約 70 % に減少していたが、Liv2 陽性の肝芽細胞の数はむしろ増加していた(図 3)。c-Myb ノックアウトマウスについてもほぼ同様の結果を得た。これらの結果は、肝芽細胞の発生には、二次造血は必須ではないことを示唆する。この事実、肝芽細胞の発生を誘導する因子が心臓原基から、肝芽細胞の増殖に関わる因子が血管内皮細胞から分泌される可能性を示唆する最近の報告からも支持される^{3,4)}。すなわち、肝形成は、心臓原基の誘導シグナルによる肝芽細胞の発生に始まり、血管形成に関連した肝芽細胞の増殖、流入してくる造血系細胞からの肝芽細胞の分化誘導というさまざまな相

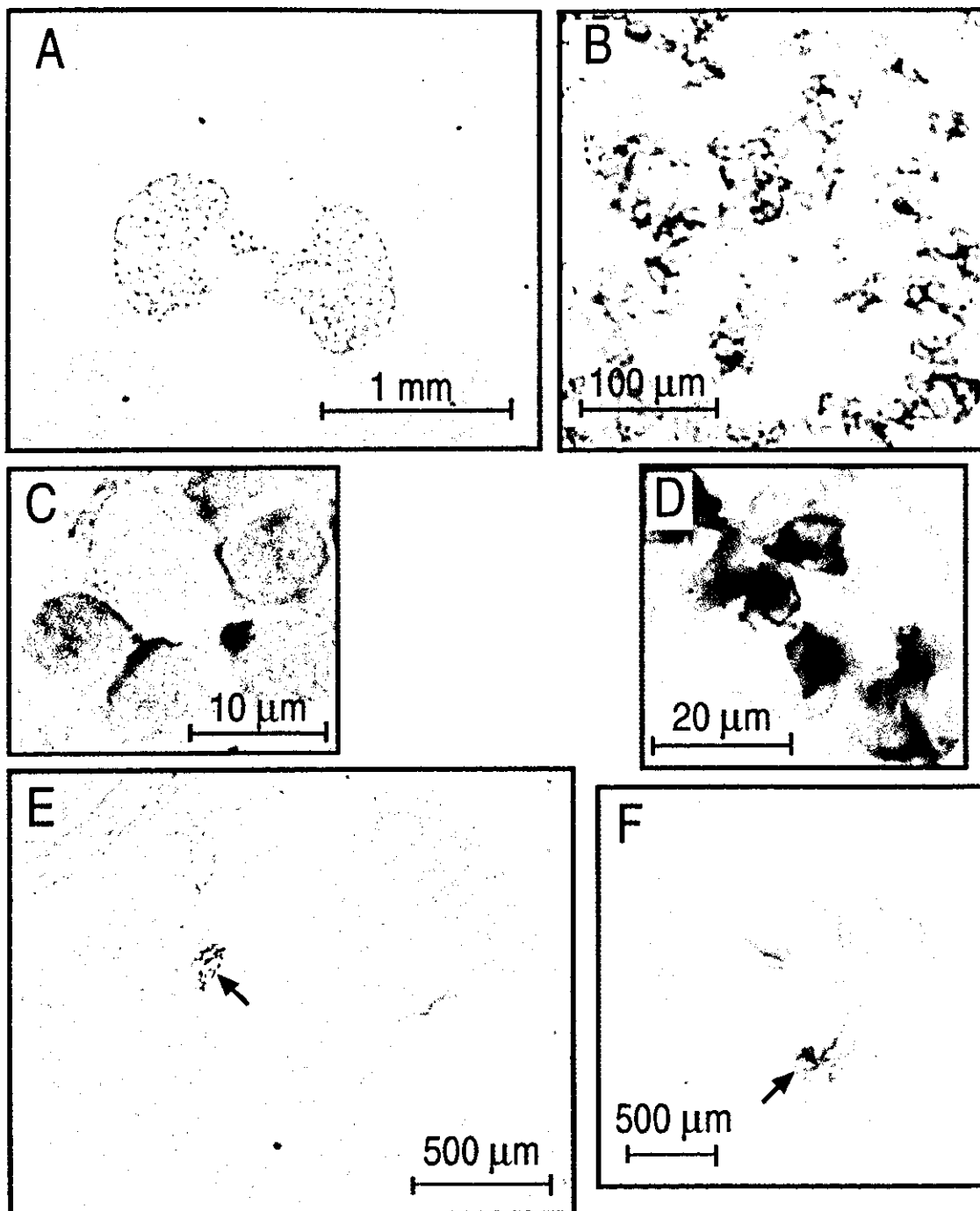


図2 新規ラットモノクローナル抗体, 抗 Liv2

相互作用を受けながら進行すると考えられる。

4 肝形成不全 SAPK/JNK 系ノックアウトマウスの作出と解析

ストレス応答性の MAP キナーゼである SAPK/JNK は c-Jun などの転写因子をリン酸化し、遺伝子発現を制御する。SEK1 や

MKK7 は SAPK/JNK を活性型に導く MAP キナーゼキナーゼである。われわれは SAPK/JNK シグナル伝達系の個体レベルの生理的役割を明らかにする目的で、SEK1 や MKK7 ノックアウトマウスを作出し、これらが E10.5-12.5 で肝形成不全を伴う胎生致死になることを報告してきた^{1,5)}。図 4 には

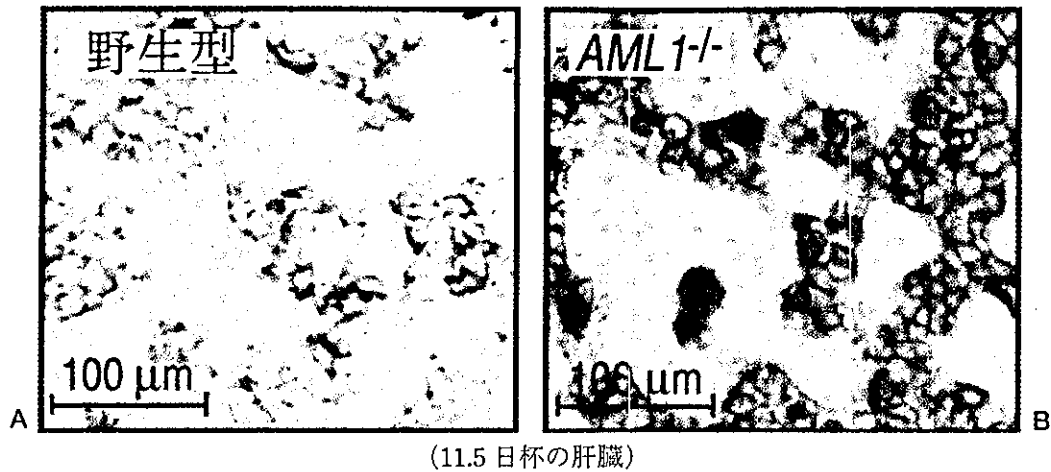


図3 二次造血を欠損 AML1 ノックアウトマウスの胎児肝

E12.5 の SEK1 ノックアウトマウスを示してある。血管形成および二次造血能は正常であったが、アポトーシス亢進を伴う著しい肝形成不全が観察された。また、c-Jun ノックアウトマウスでは E11.5-15.5 で肝形成不全を伴う胎生致死となる。これらの結果は、SEK1, MKK7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル伝達系が肝芽細胞において生存シグナルとして必須の役割を果たしていることを示唆する。これまでの報告の多くは SAPK/JNK 系は細胞をアポトーシスに誘導するシグナル伝達系であるとする結果であり、われわれの報告は SAPK/JNK 系の多様な生理機能を見出すこととなった。

5 肝芽細胞の生存と死および増殖を制御するシグナル伝達系

SEK1 を介するシグナル伝達系のより詳細な生理的役割を明らかにする目的で、われわれは肝形成との関わりが明らかにされている腫瘍壊死因子 (TNF α) とその受容体 (TNF 受容体 1 型) を介するシグナル伝達系を検討した¹⁾。TNF 受容体 1 型の下流には、蛋白質やゲノム DNA の分解に関与する酵素を活性化し細胞をアポトーシスに誘導するシグナル系、それに拮抗する抗アポトーシスシグナ

ルを誘導する NF- κ B 系、そして SAPK/JNK 系の 3 種類が存在する。NF- κ B 系を構成する因子のノックアウトマウスの多くも、肝形成不全を伴う胎生致死となる。興味深いことに、これらノックアウトマウスは TNF 受容体 1 型を不活性化すると肝形成不全の表現型は回避される。すなわち、胎児肝においては TNF 受容体 1 型を介するアポトーシス誘導シグナル系と NF- κ B 系の抗アポトーシスシグナルがバランスよく機能し、肝芽細胞の生存と死を制御している (図 7 参照)。われわれは SEK1 と TNF 受容体 1 型の二重ノックアウトマウスを作出し、TNF 受容体 1 型の不活性化を行った (*sek1^{-/-} tnfr1^{-/-}*)。結果は、NF- κ B 系ノックアウトマウスの場合とは異なり肝形成不全の表現型は回避されず、SEK1 単独ノックアウトマウス同様の肝の著しい空洞化が観察された (図 5E と G)。この結果は、SAPK/JNK 系は NF- κ B 系とは異なる生理的な役割で肝芽細胞の生存に関与していることを示唆する。それゆえ、われわれは SAPK/JNK 系の生理的役割を肝芽細胞の増殖の観点から検討した。プロモウリジンの取り込みを E10.5 の野生型、c-Jun および SEK1 ノックアウトマウスにおいて検討したところ、c-Jun や SEK1 ノックアウトマウスでは

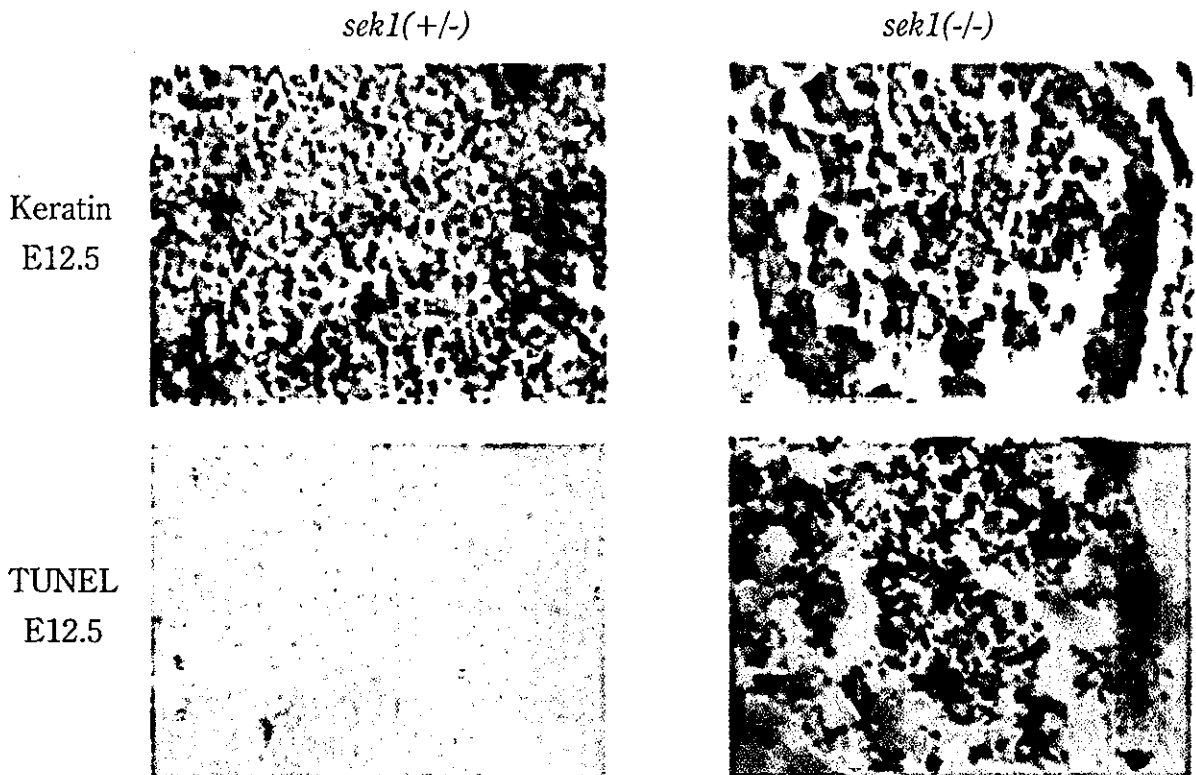
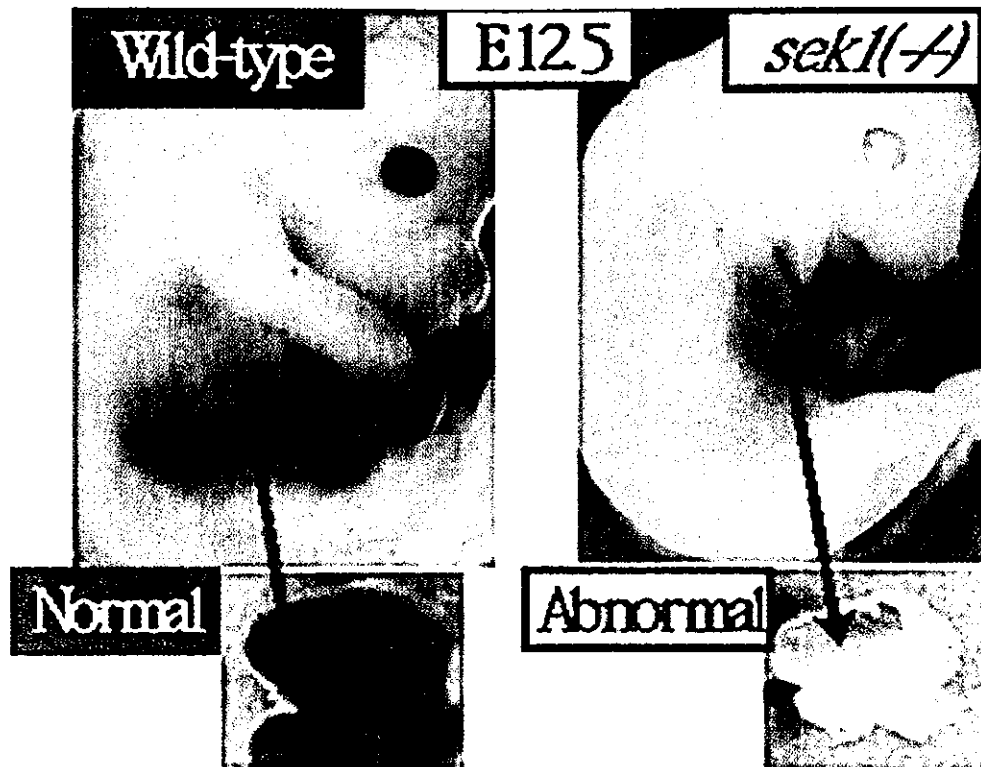


図4 肝形成不全 SEK1 ノックアウトマウス

Liv2 陽性の肝芽細胞でプロモウリジンの取り込みの著しい減少が観察された(図6). この減少の程度は c-Jun および SEK ノックア

ウトマウスの表現型の程度とよく一致していた. これらの結果は, SAPK/JNK 系は肝芽細胞の増殖シグナルとして機能していることを

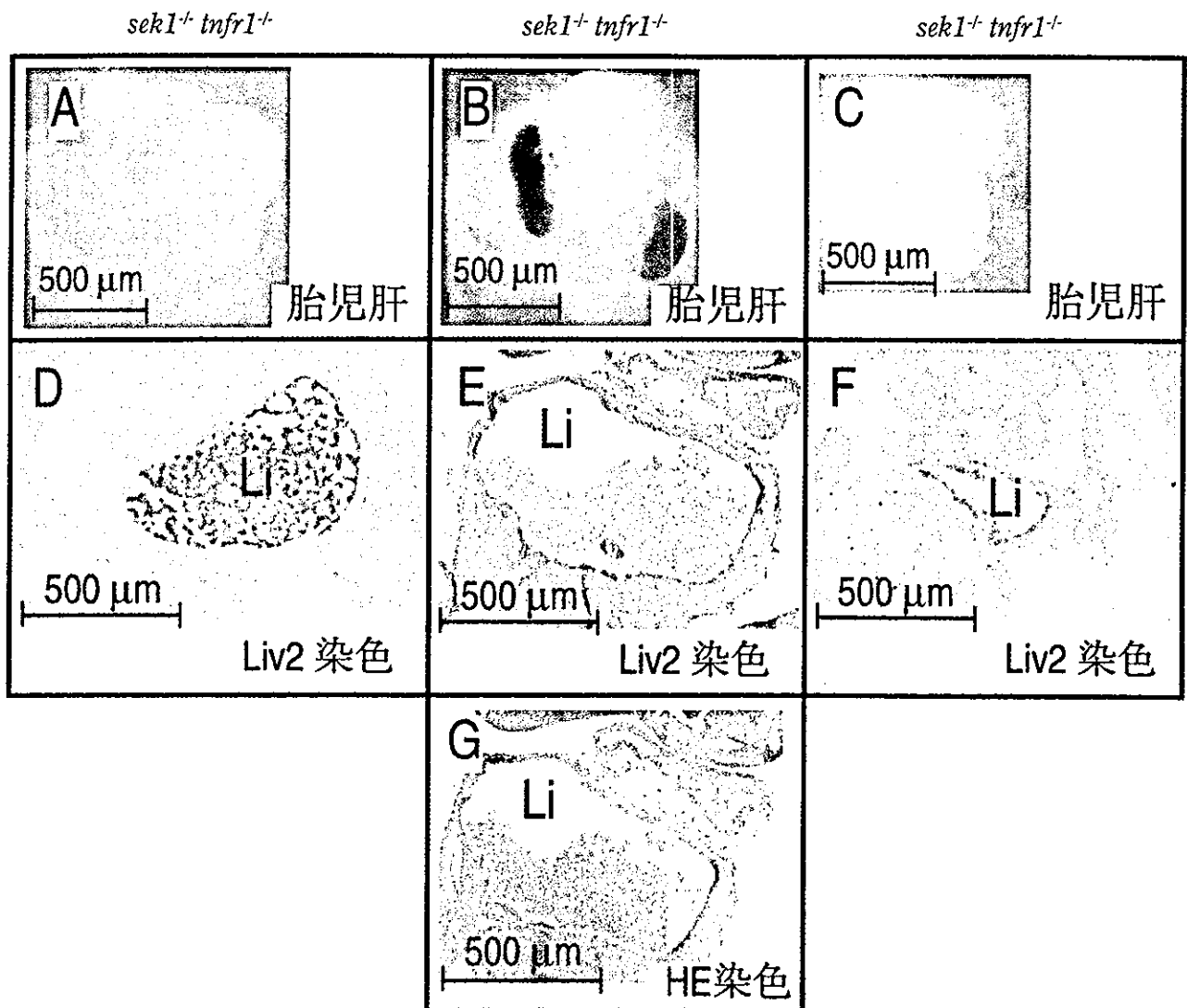
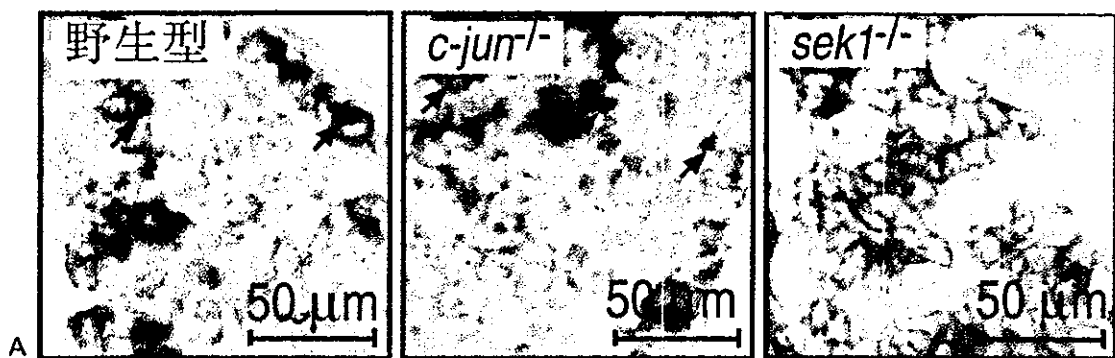


図5 SEK1 および TNF 受容体 1 型二重ノックアウトマウスの胎児肝



(E10.5)

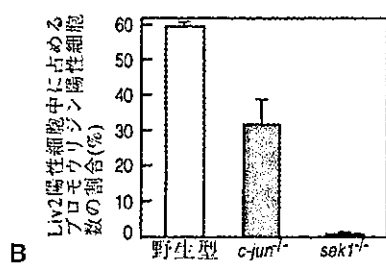


図6 SEK1 や c-Jun を欠損する肝芽細胞の増殖能

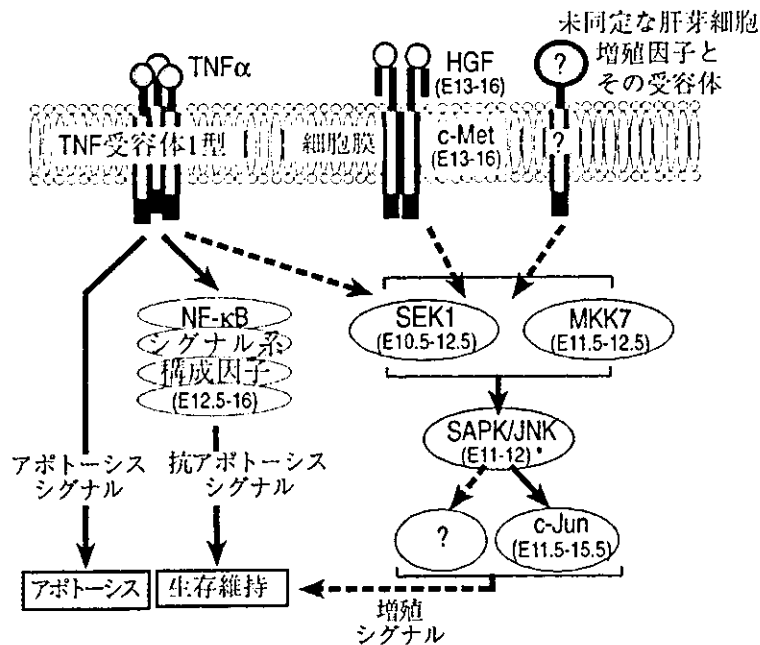


図7 肝芽細胞の生死や増殖に関わるシグナル伝達系

示唆する(図7)。すなわち、SAPK/JNK系は肝芽細胞の増殖シグナルとして生存維持に関与していると考えられる。これまでにTNF α が肝細胞に対して、アポトーシス誘導、生存維持、増殖など多様な生理機能を誘導することが報告されてきたが、これらを分子の言葉で説明することは困難であった。しかしながらTNF受容体1型の下流に存在する3種類のシグナル伝達系のそれぞれの役割が明らかとなった現在、多様な細胞応答をシグナル間のバランスの制御によって理解することが可能となった。

6 おわりに

主に肝芽細胞の生存や増殖に関わる細胞内シグナル伝達系について述べたが、これらを活性化するリガンド-受容体としてTNF α -TNF受容体1型や肝細胞増殖因子(HGF)-肝細胞増殖因子受容体(c-Met)の関与は示唆されている。しかしながらノックアウトマウスの結果はこれら以外の因子の存在を強く示唆している。SEK1ノックアウトマウスの致

死の時期がE10.5-12.5に対して、HGFやc-MetノックアウトマウスではE13-16と遅いこと、肝形成不全の表現型の程度もSEK1ノックアウトマウスの方が強いことが理由として上げられる。それゆえ、肝芽細胞の増殖因子やその受容体を明らかにすることが今後の重要な課題の一つと考えられる。また、本稿では詳述しなかったが、肝芽細胞の発生に関わる分子機構もいまだ未解明の点が多いのが現状であり、多分化能を有する内胚葉性幹細胞がいかなるシグナル伝達系を利用して肝芽細胞へと分化するかを解明することも大切な課題となっている。

文献

- 1) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S et al : SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. Dev Biol 250 : 332-347, 2002
- 2) Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y et al : Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. EMBO J 18 : 2127-2136, 1999
- 3) Zaret KS : Liver specification and early morpho-

genesis. *Mech Dev* 92 : 83-88, 2000
4) Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J et al : Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294 : 559-563, 2001

5) 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

*

*

*

KAN·TAN·SUI **肝胆膵** 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

肝発生と再生時の HGF

坪内博仁*** 井戸章雄** 宇都浩文*
蓮池悟* 森内昭博**

索引用語：HGF, 肝発生, 肝再生, 肝幹細胞, 肝前駆細胞

1 はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) およびその受容体 c-Met のノックアウトマウスは肝発育が見られず, embryonic lethal であることから, HGF は肝発生に極めて重要な役割を果たしていることが推測されていた。実際, 最近, HGF が肝発生過程および胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES cell) や肝芽細胞 (hepatoblast) の分化過程において重要な働きを果たしていることが明らかにされてきている。一方, 肝再生にはその主役を演じる細胞によって2つのシステムがある。静止期にある成熟肝細胞が増殖能を獲得し再生するシステムと肝細胞または胆管上皮細胞への分化能を持った肝幹細胞や肝前駆細胞が分化・増殖し, 肝臓を再生するシステムである。HGF は成熟肝細胞の増殖を促進する因子として発見されたが, 肝前駆細胞のひとつと考えられている oval cell に対しても増殖促進作用を示すことが明らかとなった。本

稿では, 肝発生および再生時における HGF の役割について最近の知見を述べる。

2 肝発生における HGF の役割

マウスでは肝臓原基は 8.5 日胚に腹側前腸内胚葉 (ventral foregut endoderm) が肥厚して形成される憩室に由来する (図 1)¹⁻³⁾。この肝発生への運命づけには隣接する心中胚葉 (cardiac mesoderm) から分泌される fibroblast growth factor (FGF) が必須である⁴⁾。すなわち, 心中胚葉は肝発生に先行して FGF8 を分泌し, その後 FGF1 および FGF2 を分泌して肝発生を誘導する。一方, 中胚葉由来の横中隔間葉 (septum transversum mesenchyme) は心中胚葉と前腸の間に存在し, TGF β スーパーファミリーである bone morphogenic factor (BMP) を産生, この BMP シグナルは FGF の肝発生誘導に必要とされている。しかし, FGF の役割はここまでの, 8.5 ~ 9.5 日胚では, 横中隔間葉から産生される HGF が BMP とともに肝発生を進行させ, コラー

Hirohito TSUBOUCHI et al : Role of HGF in liver development and regeneration

*宮崎医科大学第2内科学教室 [〒889-1692 宮崎県宮崎郡清武町大字木原 5200]

**京都大学医学部附属病院探索医療センター

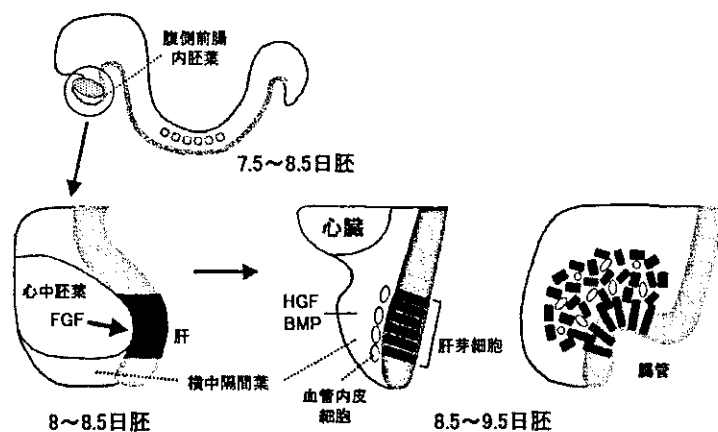


図1 マウス肝発生に関わる増殖因子

肝臓原基はマウス 8.5 日胚の腹側前腸内胚葉が形成する憩室に由来するが、心中胚葉から分泌される FGF によって肝発生へ方向づけられる。その後、横中隔間葉で産生される HGF と BMP の作用によって c-Met を発現している肝芽細胞が横中隔間葉内に向かって増殖し、肝芽 (liver bud) を形成していく。

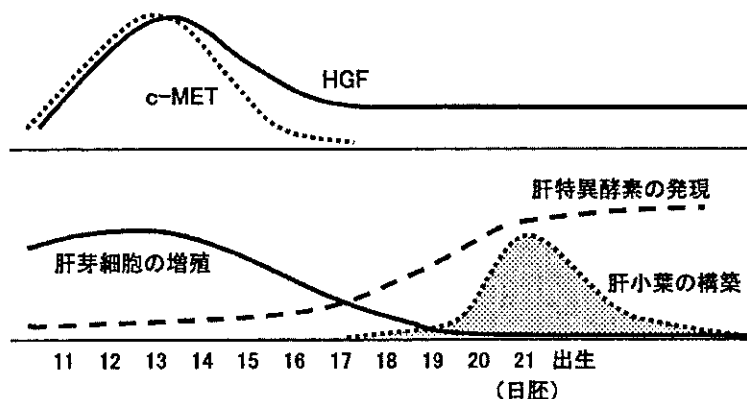


図2 肝の発生・成長と HGF/c-Met

ラット 11 日胚において HGF は肝非実質細胞に、c-Met は肝実質細胞に発現するようになり、13 日胚でピークとなる。その後、c-Met 発現は 16 ~ 19 日胚で消失するが、HGF 発現は持続する。c-Met 発現は肝芽細胞の増殖と平行しており、肝特異酵素の発現 (肝細胞への分化) や肝小葉の構築は c-Met 発現消失後に誘導される。

ゲンに富み弱く結合した間葉細胞からなる横中隔間葉内に向かい、速やかに肝芽 (liver bud) を形成していく (図 1)¹⁻³⁾。この時期の未分化肝細胞は肝芽細胞 (hepatoblast) と呼ばれて c-Met を発現し、HGF は肝芽を取り囲む横中隔間葉に発現している。全体的な肝の構造はこの時期に形成され、間葉系のスペースが血液を含んだ類洞となり、14.5 日胚までに肝は増大する。胎性肝は造血の主要臓器でその 60 % は血液細胞から構成されて

いるが、次第に代謝など肝臓本来の機能を獲得し、出生を契機に造血機能は骨髓と脾臓に移行する^{3,5)}。

HGF ノックアウトマウスは胎盤形成不全と肝の発育不全が生じ embryonic lethality であり、c-met ノックアウトマウスも embryonic lethality である。これらの事実は、HGF が肝臓をはじめとした種々の組織の発生・分化に重要な因子であることを示している^{6,7)}。最近、Spijkers らはラット肝発生における

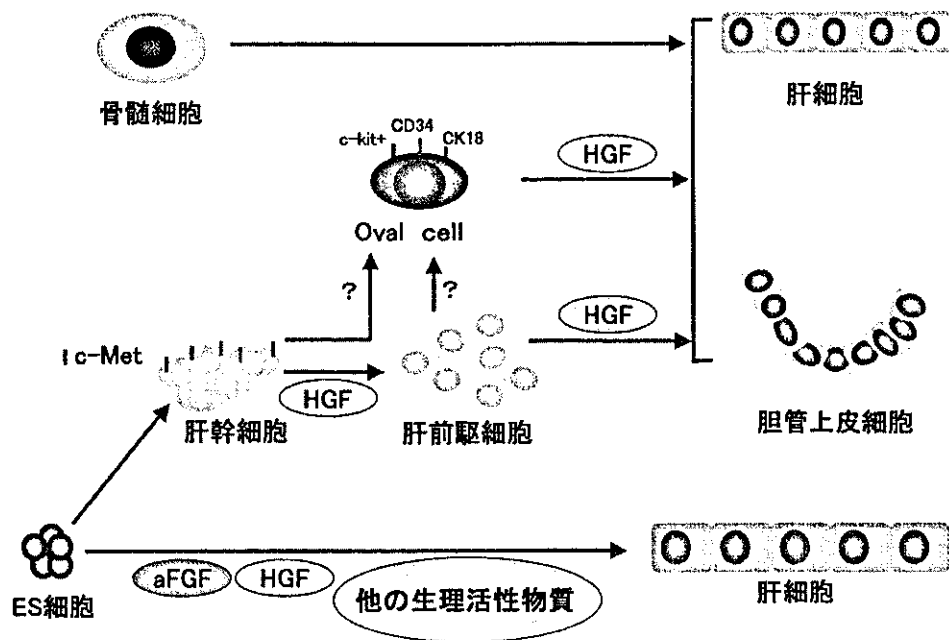


図3 ES細胞および肝幹(前駆)細胞におけるHGFの役割

ES細胞から肝細胞への分化にはFGFやHGFといった増殖因子が必要とされている。一方、胎児肝臓中に存在する多能性肝細胞はc-Metを発現しており、その増殖・分化にHGFは必須の因子と考えられている。

HGFとc-Met発現の経時的変化を報告した(図2)⁸⁾。HGFとその受容体c-Metはそれぞれ11日胚の肝非実質細胞および実質細胞に弱く発現するが、12日胚で増強し13日胚でピークに達する。その後、14日胚ではHGFおよびc-Metの発現は減弱し、16～19日胚でc-Met発現は消失するが、HGF発現は肝非実質細胞で弱く持続する。c-Metの発現消失は肝小葉構築やアンモニア代謝能など肝特異的機能の獲得の時期に一致し、胎児肝が肝芽形成からの肝実質細胞増殖を経て成熟肝への分化する移行期であることを意味している。

3 ES細胞および肝幹(前駆)細胞の分化におけるHGFの役割(図3)

胞胚(blastocyst)の内部細胞塊(inner cell mass; ICM)に由来するES細胞は増殖能と多分化能を併せ持った多能性幹細胞である。種々の増殖因子はヒトES細胞における外胚

葉と中胚葉由来の組織特異的遺伝子発現を誘導するが、HGFは中・外胚葉のみならず内胚葉由来である肝臓や膵臓に特異的な遺伝子発現をも誘導することが報告された⁹⁾。また、HamazakiらはマウスES細胞を用いて肝発生に関わる増殖因子などを早期(FGF)、中期(HGF)、後期(オンコスタチンM(oncostatin M; OSM)、デキサメタゾン、インスリン、トランスフェリン、selenious acid)に分類し、これらを経時的に添加して肝特異遺伝子発現が誘導されることを報告した¹⁰⁾。マウスES細胞は増殖因子を添加せずとも、Embryoid body(EB)を形成させた後に α フェトプロテインやアルブミン遺伝子発現が検出されるようになるが、増殖因子を添加すると胎生後期から新生児期の肝分化マーカーであるglucose-6-phosphate(G-6-P)やtyrosine aminotransferase(TAT)遺伝子が発現誘導される。FGF単独ではG-6-PおよびTAT発現は誘導されないが、HGFおよび後期増殖因