

# 骨髄細胞から肝細胞への分化転換の 制御機構の解析とその臨床応用 —自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の 基礎的検討—

寺井崇二\* 石川 剛\* 大森 薫\* 青山浩司\*  
坂井田功\* 沖田 極\*

われわれは「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発のため、骨髄細胞の肝細胞への分化評価モデル“GFP/CCI4モデル”を開発した。このモデルにおいては持続肝障害が続く肝硬変症において骨髄細胞は肝臓へ定着し肝細胞への分化転換していく。一方、肝発生過程において炎症性シグナルは肝芽細胞の発生、増殖は必須であり、肝発生と再生には共通のメカニズムが存在する。さらに、骨髄中の肝幹細胞群の同定のため新規モノクローナル抗体Liv8抗体を用いて基礎的検討をおこなった。これらの結果は自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は次世代の治療法になり得る可能性を示したのでここに紹介する。

## はじめに

B型、C型肝炎ウイルスによる肝疾患はいまだ増加傾向を示し、肝細胞癌による死亡は年間の癌死の第3位を占めるようになってきた。われわれは臨床の現場において、肝癌治療をおこなっているが、その背景には肝硬変症が合併している患者も多く、肝癌治療そのものの治療法の開発とともに

に、いかに肝不全を制御するかが重要な問題になる。わが国において生体肝移植が導入されたが、ドナーの不足、外科手術による侵襲の危険性、経済的な問題などからなかなか普及しにくい状況である。これらをふまえて考えた場合、次世代の治療法として肝臓再生療法の開発は重要と考えられる。われわれは、新たに肝不全に対する治療として「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発をめざし研究を進めてきたのでここに紹介したい。

### 【キーワード】

骨髄細胞  
肝幹細胞  
肝再生  
細胞療法  
Oval細胞  
Niche  
分化転換  
肝芽細胞

## 1. 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性の発見

肝臓は代謝、蛋白合成、解毒などを司る多機能な臓器である。肝臓の発生過程に関してその分化系譜はまだ詳細には明らかにされていないが、われわれは図1のように胎児期にまず肝芽細胞が発

\* Shuji TERAJ, Tsuyoshi ISHIKAWA, Kaoru OMORI, Koji AOYAMA, Isao SAKAIDA, Kiwamu OKITA/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)

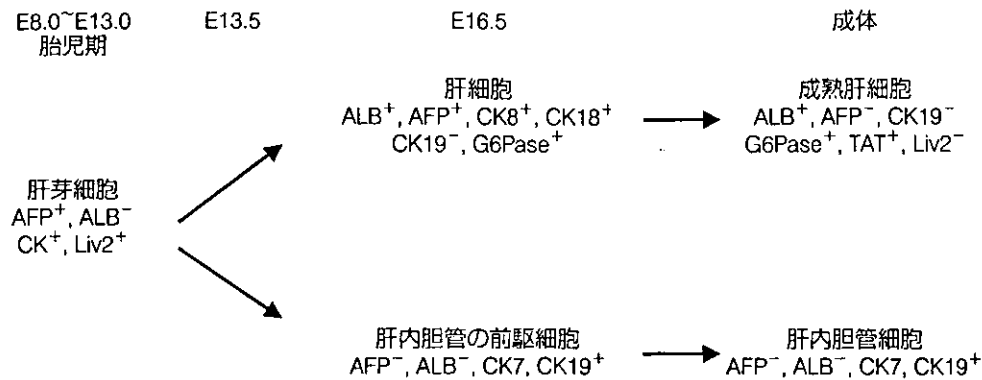


図 1. マウス肝発生過程における分化系譜  
E 12.5 における肝臓は肝芽細胞が全体の 2 割、血球系の細胞が 8 割を占める。

生し、その後肝細胞、肝内胆管の前駆細胞に分かれて、成熟肝細胞、肝内胆管細胞が発生すると考えている。また、臓器としての特徴としては胎児期の肝臓は造血臓器としてはたらいっていることが特徴である。一方、肝臓に存在する幹細胞そのものについては以前より研究がおこなわれてきている。そのなかでも、重篤な肝障害に伴い発生する卵円形をした oval 細胞は肝幹細胞の一つと考えられてきた<sup>1)</sup>。この oval 細胞については肝細胞以外に、膵臓、胆管、小腸細胞に分化する可能性が知られている。また、その他方法で、肝幹細胞の同定が試みられ、ラットより小型肝細胞 (small hepatocyte)<sup>2)</sup>、Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットより肝幹細胞様細胞<sup>3)</sup>、胎児肝からは II-CFU-C などが発見されている<sup>4)</sup>。これらの細胞の臨床応用については今後、病態に伴うこれらの個々の細胞についての発生制御機構、また局在の変化などについて検討していく必要がある。

一方、骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性については、女性レシピエントに男性ドナーからの骨髄移植後の剖検例において、骨髄細胞が肝細胞に分化することが報告された<sup>5)</sup>。これは Y 染色体陽性細胞の存在の有無を肝、胆管細胞にて検討したものであり、骨髄細胞はヒトにおいて肝細胞に分化する可塑性を証明した報告である。このヒトにおける発見は非常に重要で、何らかの機序により

骨髄細胞は肝細胞へと分化する可能性があることを示すとともに、肝幹細胞が骨髄中に存在することが明らかになった。また、骨髄細胞の腸管への分化転換についても報告され、骨髄中にはほかの臓器に分化転換する細胞群が存在することが明らかになった<sup>6)</sup>。

## 2. さまざまな肝再生—部分肝切除による肝再生と oval 細胞の発生を経た肝再生の違い—

ここで一步はなれて肝再生という現象について考えてみたい。肝臓という臓器は非常に複雑な臓器であり、その構成は、肝細胞、胆管細胞、星細胞、内皮細胞、Pit 細胞、クッパー細胞から成り立ち、肝臓という複雑な代謝系を司っている。肝臓は古来から再生する臓器として知られており、実際に肝切除後には肝再生が起こる。図 2 に示すようにラットの部分肝切除により肝小葉内に存在する肝細胞が肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) などの増殖因子の誘導により増殖し肝再生が起こると考えられている<sup>7)</sup>(図 2)。一方で oval 細胞の肝細胞化のモデルとしてはアセトアミノフルレン、部分肝切除 (AAF/PH モデル) があるが、このモデルはアセトアミノフルレンの投与により肝細胞の増殖が起こらないようにした状態で肝切除をおこなうモデルであり、この場合

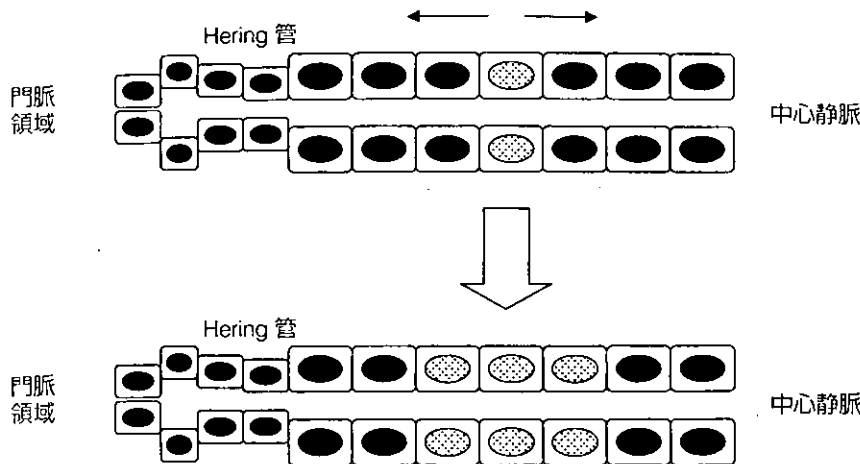


図 2. 部分肝切除に伴う肝再生

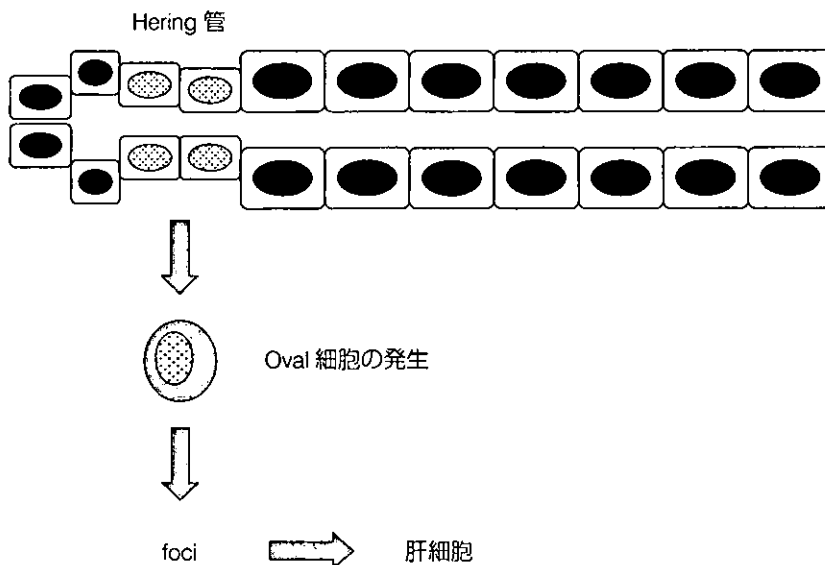


図 3. Oval細胞発生を通じた肝再生 (AAF/PHモデル)

は肝細胞の再生は起こらないため、胆管のすぐそばの Hering 管より oval 細胞が発生し basophilic hepatocyte の foci を経て肝細胞に分化するモデルである<sup>1)</sup>(図 3)。これらの実験結果は、部分肝切除に伴う肝再生と、oval 細胞の発生を経た肝細胞の再生は機序が異なることを示す。すなわち、肝臓の再生において、病態の違いによりその再生におもに関与する細胞は異なることになる。一方で Petersen ら<sup>2)</sup>は、骨髓移植後、アセトアミノフルレン・四塩化炭素障害 (CCI 4) したモデルにおいて骨髓細胞由来の oval 細胞があらわれることを報告している。アセトアミノフルレン・

CCI 4 モデルはもともと oval 細胞の発生モデルであり、この条件において骨髓細胞は oval 細胞の表現型を経て肝細胞への分化が誘導される可能性を示した。

### 3. GFP/CCI 4 モデルの開発

われわれは骨髓細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり、どのような状態において骨髓細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決するためには新たな *in vivo* モデルの開発が必要だと考えた。この分化転換に関与する微小環境のことを“Niche”とよぶが、ここにはさまざまなシ

グナル、転写因子、細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられている(図4)。過去の報告では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、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ gal)陽性の血球幹細胞の投与により、移植した $\beta$ gal陽性細胞が肝臓にクラスターをつくって定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが報告されていた<sup>9)</sup>。しかしながら、このモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。また、FAHモデルでみられる移植細胞のクラスター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。最近になり、このモデルにおける骨髄細胞の肝細胞への分化は細胞融合により起こるという報告がなされ、骨髄細胞の分化転換に対して否定的な見解が述べられているが<sup>10)11)</sup>、米国国立公衆衛生研究所(NIH)などでおこなわれた人における、男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植後の頬粘膜の採取を通じた細胞融合の検討では、細胞融合については認められていないと報告されている<sup>12)</sup>。

一方で、われわれは「自己骨髄細胞を用いた肝

臓再生療法」をおこなう可能性のある対象患者は「持続的な肝障害のある肝硬変患者」と考えた。このため、より臨床に近い病態のレシピエントを作成すべくCCI4の持続投与し(肝硬変マウス)作成した、GFPTgマウス<sup>13)</sup>のGFP陽性骨髄細胞を投与することで、その投与したGFP陽性骨髄細胞の肝細胞への分化転換の有無、過程を評価した。われわれの開発したモデルを“GFP/CCI4モデル”と名づけた。図5にGFP/CCI4モデルの概略を示すが、まず4週間ほどCCI4投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP標識した陽性骨髄細胞を尾静脈より投与して骨髄細胞の肝細胞への分化転換について評価した。過去の移植実験においては骨髄細胞の分化については、骨髄細胞投与後は肝障害を止めて評価している。しかしながら、われわれが臨床でみる患者は「持続的な肝障害のある患者」であり、この持続的なCCI4の投与により肝障害を続けることが骨髄細胞の肝細胞への分化においては必須と考えられた。実際の結果であるが、図6<sup>14)</sup>のように肝障害がない状態では骨髄細胞は肝臓には遊走されなかったが、CCI4での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後1日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下の特殊なNicheにおいて

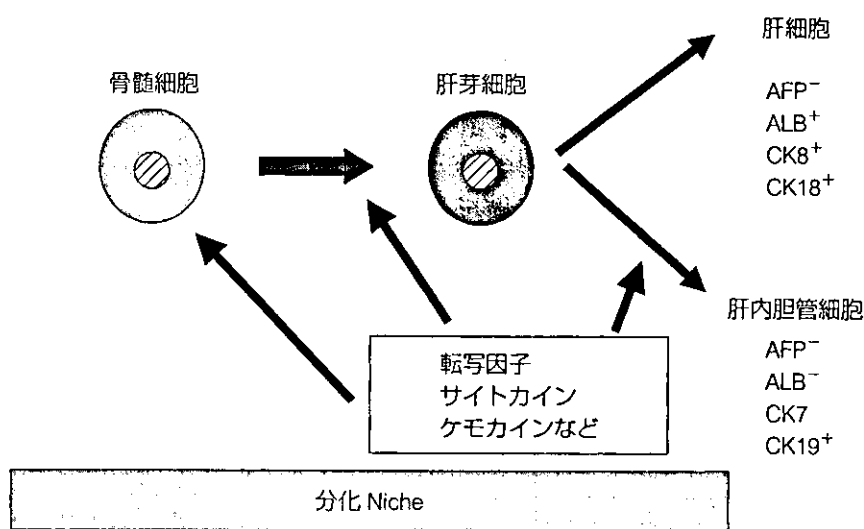


図4. 骨髄細胞の肝細胞への分化転換

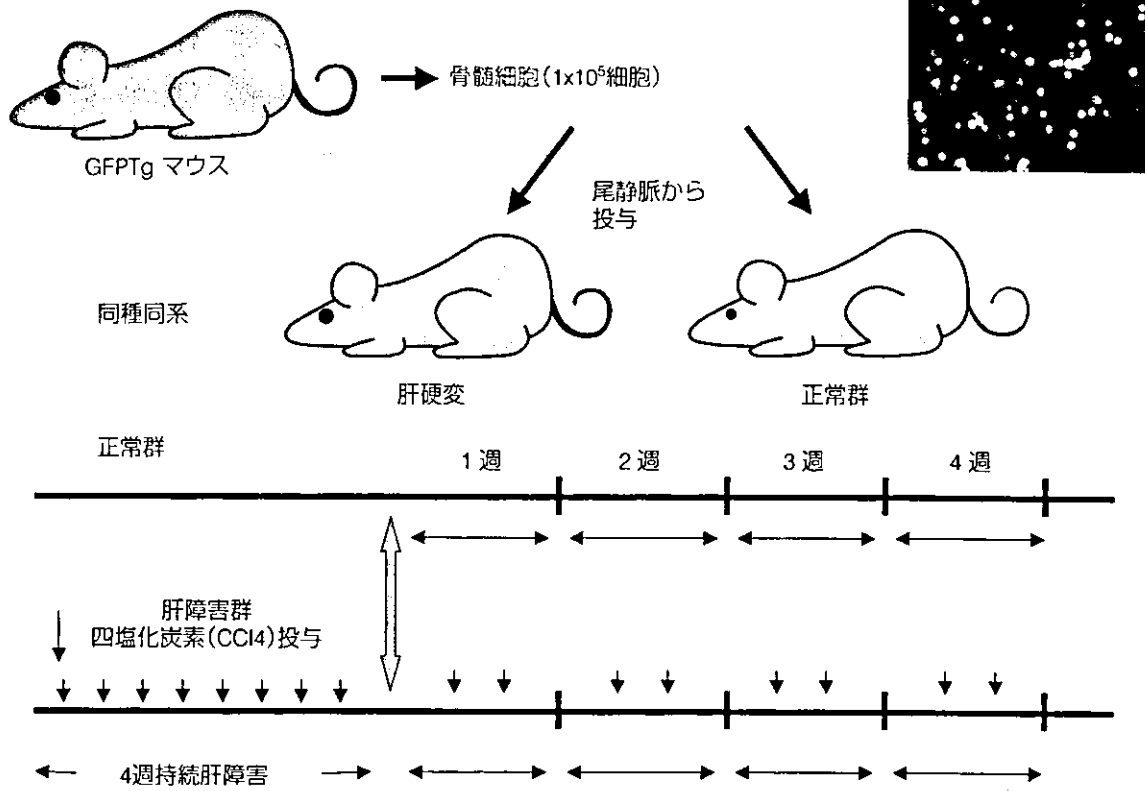


図 5. GFP/CCl<sub>4</sub> モデルの概略

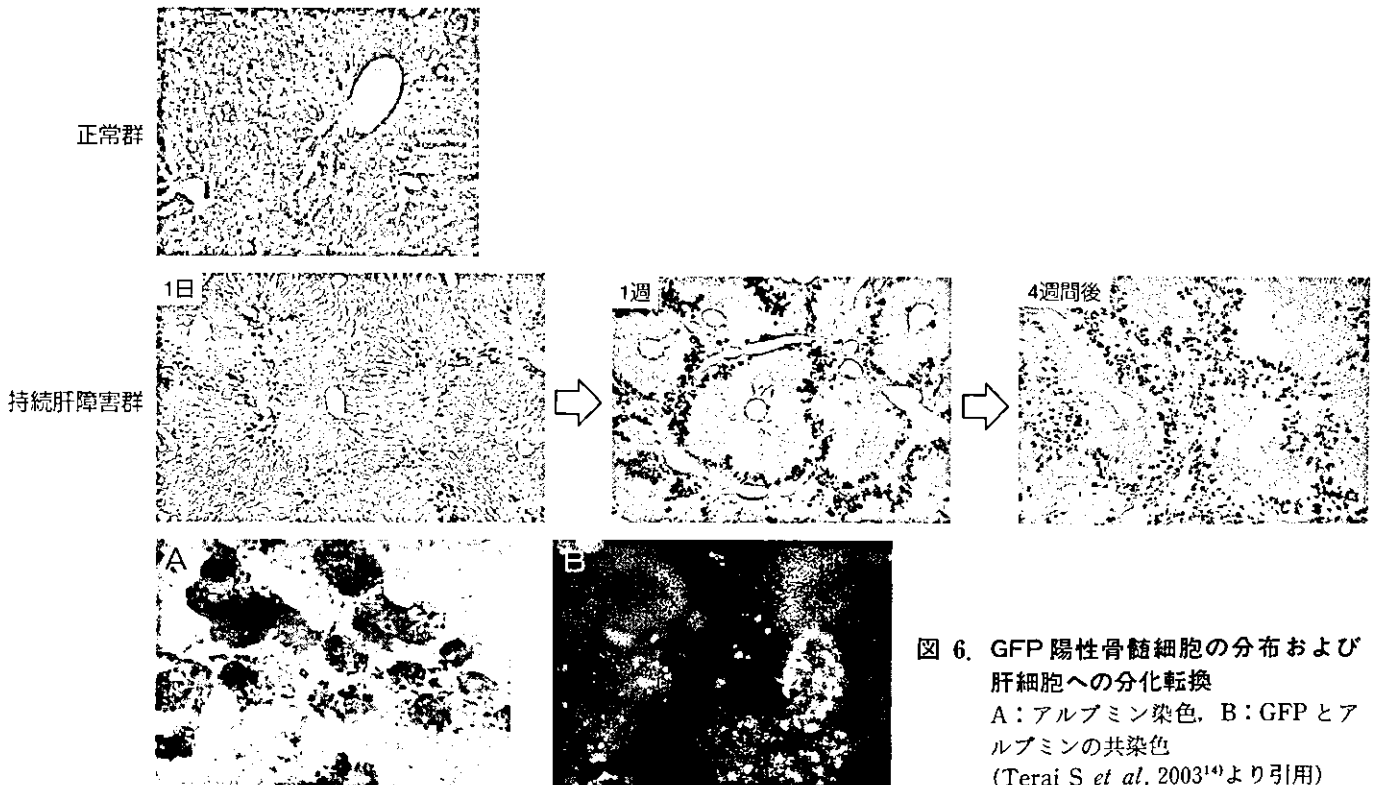
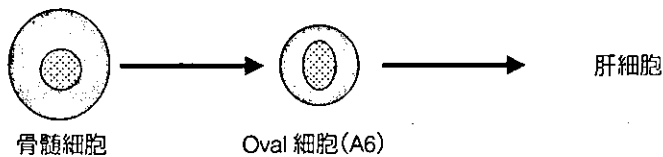


図 6. GFP 陽性骨髓細胞の分布および肝細胞への分化転換  
A: アルブミン染色, B: GFP とアルブミンの共染色  
(Terai S *et al.*, 2003<sup>14)</sup>より引用)

モデル 1



モデル 2

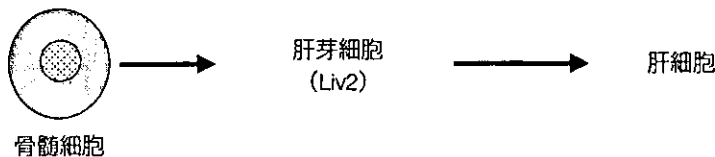


図 7. 骨髓細胞の肝細胞への分化転換の経路

骨髓細胞から肝芽細胞に分化転換し、最後は機能的な肝細胞索構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化転換することが明らかになった。実際に肝機能も代償していた<sup>14)</sup>。次に、分化転換機序についての評価であるが、骨髓細胞は図 7 に示すように oval 細胞の表現型を経るのか、それとも肝芽細胞の表現型を経るのかを明らかにすることが重要と考えられた。共同研究者の仁科博史博士らは、肝発生を分子レベルで解析することを目的として、胎児肝特異的な分子マーカーを単離すべく、胎生期 11.5 日 (E 11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。Liv 2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する<sup>15)</sup>。この Liv 2 抗体で染色してみると、骨髓細胞は Liv 2 陽性の肝芽細胞に分化していることが明らかになった。一方、マウスの oval 細胞の特異抗体である A 6 抗体<sup>16)</sup>の染色をおこなうも骨髓細胞は A 6 陽性 oval 細胞の表現型はとらないことが明らかになり、GFP/CCI 4 モデルにおいては投与した骨髓細胞が oval 細胞の表現型をへることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型をへながら肝細胞に分化することが明らかになった<sup>14)</sup>。Liv 2 抗体を用い、肝形成不全となる SEK 1, MKK 7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する

AML 1 ノックアウトマウスの解析をおこなった結果、炎症性シグナルの SEK 1, MKK 7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることが明らかになっており<sup>15)</sup>、GFP/CCI 4 モデルにおける骨髓細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、炎症性シグナルが肝発生に重要なことと共通機構がはたらいっている可能性を示す。現在、分化制御機構については DNA チップや増殖因子の解析を通じておこなっており、これらの結果は骨髓細胞がまず幼弱化するステップが重要と考えられるデータを得ている(大森, 石川投稿中)。また、このモデルにおいて実際に肝不全状態が骨髓細胞の投与により改善したことについては、血清のアルブミンの値は有意差をもって改善し、また 3 ヶ月以上みた生存率も有意に改善していた。これらの結果は、持続肝障害のある肝硬変状態においては骨髓細胞は肝臓再生に有用な細胞源になる可能性を示すとともに、肝臓再生をうまく誘導するにはレシピエントの状態が重要なことを示した。

#### 4. 骨髓中に存在する肝臓再生に有用な細胞群

一方で肝細胞へ可塑性があると考えられる細胞としては、骨髓中の細胞は大きく 3 つあり、①血

球幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC)<sup>17)</sup>,  
 ② 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell :  
 MSC)<sup>18)</sup>, また最近幹細胞として注目されている  
 ③ side population cell (SP 細胞)<sup>19)</sup>があげられる  
 が, 実際に骨髄中にどの分画に肝幹細胞が存在し  
 ているかについては明らかになっていない. この  
 理由としては, 従来血球系の解析のツールとして  
 解析された抗体を用いており, 肝臓の臓器として  
 の特性を考慮して解析したものではないことがあ  
 げられると考える. この状況を打破するにはやは  
 り肝発生について注目したアプローチが必要と考  
 えられる. 前述で肝臓の発生の特徴として胎児肝  
 は造血の場であるということあげたが, そこで,  
 われわれは胎児肝の造血時期である E 11.5 日  
 のマウス胎児肝を抗原とし, 新規マウスモノクロー  
 ナル抗体の Liv 8 抗体を作成し骨髄中の肝幹細胞  
 の同定を目的に以下の研究をおこなった<sup>20)</sup>. Liv 8  
 陽性細胞は全骨髄細胞中約 30%存在し CD 45 陽  
 性細胞分画を含んでいた. E 11.5 日の胎児肝では  
 Liv 8 陽性細胞の存在を確認するも, 造血能がな  
 い AML 1 ノックアウトマウスの胎児肝では  
 Liv 8 陽性細胞の存在は確認できなかった. Liv 8  
 抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体である

ことを示すため, そこで, GFP/CCI 4 モデルを用  
 い, GFPTg マウスから分離した骨髄細胞を  
 AutoMACS を使用し, Liv 8 抗体で全骨髄細胞を  
 Liv 8 陰性骨髄細胞集団と Liv 8 陽性骨髄細胞集  
 団に分離しそれぞれを CCI 4 投与にて肝硬変状態  
 にしたレシピエントマウスの尾静脈よりこれらの  
 細胞群を投与する (図 8). 免疫組織化学染色, 蛍  
 光二重染色にて Liv 8 陽性, 陰性細胞群の肝細胞  
 への分化転換の有無, また血清アルブミン値の改  
 善について評価した結果, また肝細胞への分化転  
 換についての評価の結果より, Liv 8 陰性分画に  
 肝臓再生に有用な細胞群が存在する可能性が明ら  
 かになった (図 9). 骨髄間葉細胞を HGF, 線維芽  
 細胞成長因子 (fibroblast growth factor : FGF)  
 を加え培養することにより, 非常に可塑性に富む  
 骨髄間葉系幹細胞由来の multipotent adult pro-  
 genitor cells (MAPC) の樹立に成功したとする  
 報告もあることより, 骨髄細胞中の肝幹細胞は間  
 葉系幹細胞群に含まれる可能性が高いのではない  
 かと推測された<sup>21)</sup>.

## 5. 今後の課題

今回われわれは GFP/CCI 4 モデルを開発する

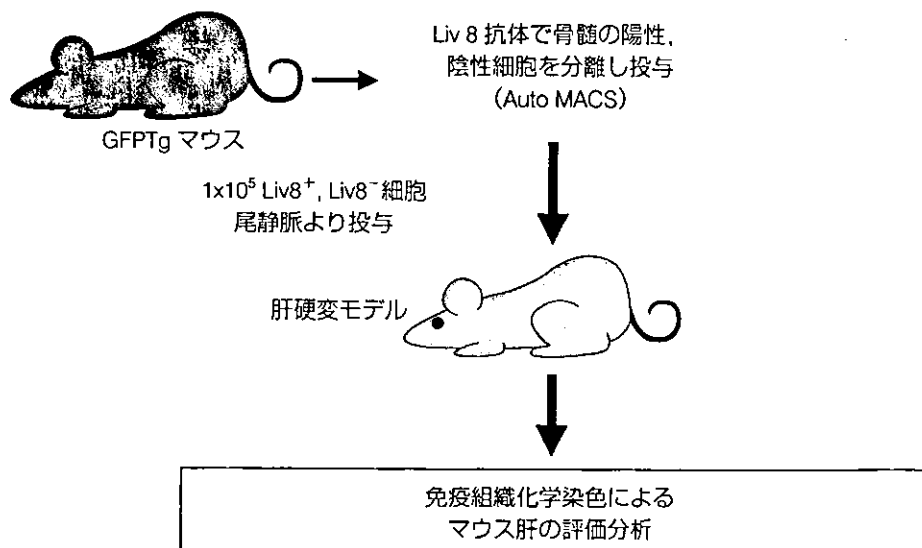


図 8. 実験プロトコル

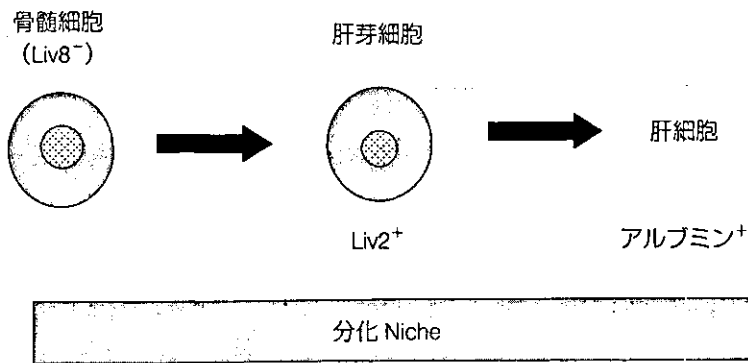


図 9. GFP/CCl4 モデルにおける骨髄細胞の肝細胞への分化転換

ことにより、持続肝障害下において、投与した骨髄細胞が効率よく肝臓に遊走定着し、幼弱化しながら肝芽細胞のなり肝細胞になることが明らかになったが、①なぜ投与した細胞は効率よく障害を起こした肝臓に遊走されたか？、②移植した細胞の運命は？、また③移植した細胞が分化することで周囲の肝臓への影響はどうか？など今後解明していかなければならない課題がある。これらを解明できれば将来さらに効率的な肝臓再生療法の開発につながると考えられる。

## おわりに

すでに自己骨髄細胞を用いた下肢および血管再生療法はすでに臨床応用がおこなわれており、良好な成績をあげている<sup>22)23)</sup>。また、骨髄移植は血液疾患の治療に多くの施設で応用されており、骨髄採取のそのものについては確立されている。われわれの基礎的な検討では骨髄細胞の投与により肝機能の改善が確認され、また生存率も改善していた。これらの結果は肝不全（非代償性肝硬変症）などに対する「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の臨床開発の可能性を強く示す結果であった。われわれはすでに報道されたように、2003年11月14日より、（自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法）Phase I 臨床研究を開始した。まずは、安全性を評価する臨床研究になるが、この「基礎から臨床」・臨床から基礎研究というトランスレーショナルリサーチを推進することで、次世代にス

タンダードになる肝臓再生療法を開発したいと考えている。

## 文 献

- 1) Grisham JW, Thorgeirsson SS : In : *Liver stem cells*, academic press, Manchester, 1997, pp. 233-282
- 2) Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T *et al* : Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* **29** : 111-125, 1999
- 3) Yasui O, Miura N, Terada K *et al* : Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes *in vivo* in the rat liver. *Hepatology* **25** : 329-334, 1997
- 4) 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
- 5) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R *et al* : Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32** : 11-16, 2000
- 6) 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
- 7) Sell S : Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* **33** : 738-750, 2001
- 8) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD *et al* : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284** : 1168-1170, 1999



- 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) Wang X, Willenbring H, Akkari Y *et al* : Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422** : 897-901, 2003
- 11) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW : Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422** : 901-904, 2003
- 12) Tran SD, Pillemer SR, Dutra A *et al* : Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells *in vivo* : a molecular analytical study. *Lancet* **361** : 1084-1088, 2003
- 13) Okabe M, Ikawa M, Kominami K *et al* : 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407** : 313-319, 1997
- 14) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N *et al* : An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* **134** : 551-558, 2003
- 15) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S *et al* : SEK 1/MKK 4-Mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- $\kappa$ B-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* **250** : 332-347, 2002
- 16) Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS : Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* **145** : 409-422, 1994
- 17) 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
- 18) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 19) Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC *et al* : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD 34<sup>+</sup> side population (SP) phenotype. *J Clin Invest* **108** : 1071-1077, 2001
- 20) Yamamoto N, Terai S, Ohata S *et al* : A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv 8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* **313** : 1110-1118, 2004
- 21) 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
- 22) Hamano K, Li TS, Kobayashi T *et al* : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* **73** : 1210-1215, 2002
- 23) Stamm C, Westphal B, Kleine HD *et al* : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361** : 45-46, 2003

# 炎症と免疫

別刷

---

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 浜町花長ビル 2階

## 肝硬変治療の新たなストラテジー —自己骨髄細胞移植による肝臓再生療法—

寺井崇二\* 坂井田功\* 沖田 極\*

骨髄細胞移植による非代償性肝硬変症に対する治療の有用性を検討するため、われわれは GFP/CCl<sub>4</sub>モデルを開発しその有効性について検討してきた。その結果、持続炎症の存在する肝硬変状態において、末梢静脈より投与した骨髄細胞は効率よく肝臓へ遊走され、肝芽細胞への表現型を経てアルブミン陽性の肝細胞へ分化するとともに、この分化過程において肝線維化抑制効果があることが明らかになった。また骨髄細胞移植により肝機能、生存率が改善しており、これらの結果は、肝硬変症の治療の1つとして自己骨髄細胞移植の有効性を示す結果であった。本稿では、過去にわれわれがおこなった基礎的検討について概説する。

### はじめに

B型、C型肝炎ウイルスの蔓延により肝疾患は増えつづけ、現在肝疾患をベースとした肝細胞癌による癌死は年間の癌死の第3位を占めるようになってきた。肝細胞癌の背景にある病変は肝硬変症であるため、肝癌の効率的な治療、生存率の向上のためにはいかに肝不全を制御するかが重要な問題になる。わが国においては末期肝不全患者に対してはすでに生体肝移植がおこなわれているがドナーの不足、外科的侵襲など克服すべき課題は多い。われわれは新たな肝不全(肝硬変)に対する

治療として『自己骨髄細胞移植による肝臓再生療法』の開発をめざし研究を進めてきたのでここに紹介する。

### 1. 骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性の発見

肝臓は肝細胞、星細胞、Kupffer細胞、Pit細胞、内皮細胞より構成されており代謝、蛋白合成、解毒など多機能をつかさどっている臓器である。2000年に骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性についての女性レシピエントに男性ドナーからの骨髄移植後の剖検例において、骨髄細胞が肝細胞に分化することが報告された<sup>1)</sup>。これはY染色体陽性細胞の存在の有無を肝、胆管細胞にて検討したものであり、ヒトにおける骨髄細胞の肝細胞への分化の可塑性を証明した報告である。この発見は何らかの機序により骨髄細胞は肝細胞へと分化する可能性があることを示すものであり、肝臓に分化する細胞群が骨髄中に存在することが予測された。また骨髄細胞の腸管への分化についても報告され、骨髄中には、さまざま臓器に分化する細

#### 〔キーワード〕

骨髄細胞  
肝幹細胞  
肝再生  
細胞療法  
Oval cell  
Niche  
肝硬変症

\* TERAJI Shuji, SAKAIDA Isao, OKITA Kiwamu/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

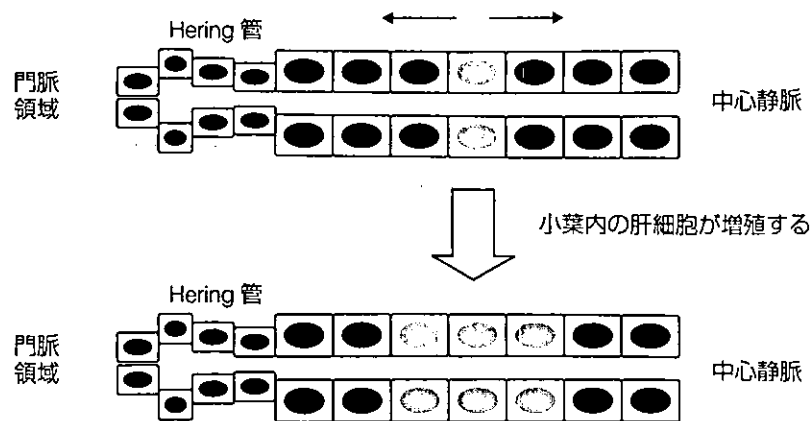


図 1. 部分肝切除に伴う肝再生

胞群が存在することが明らかになった<sup>2)</sup>。

## 2. 肝再生(部分肝切除による肝再生とOval細胞の発生と経た肝再生の違い)

ここで一步はなれて肝再生という現象について考えてみる。肝臓は再生する臓器として知られており、実際に肝切除後には肝再生が起こる。図1に示したようにラットの部分肝切除により肝小葉内に存在する肝細胞が肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)などの増殖因子の誘導により増殖し肝再生が起こると考えられている<sup>3)</sup>。一方で肝幹細胞の1つであるOval細胞の有名なモデルとしてはアセトアミノフルレン(acetylaminofluorene: AAF)投与に部分肝切除(partial hepatectomy: PH)を加えたAAF/PHモデルがあるが、このモデルはAAFの投与により肝細胞の増殖が起こらない状態で肝切除をおこなうことで、肝細胞の再生は起こらないためHering管由来で卵円形の形のOval細胞が発生し好塩基性肝細胞のFociを経て肝細胞に分化が観察できる<sup>4)</sup>(図2)。このようなラット動物実験モデルを用いた治験は、部分肝切除による肝再生と、Oval細胞の発生を経た肝細胞の再生は機序、関与細胞が異なることを示す。すなわち肝臓の再生において、病態の違いによりその再生におもに関与

する細胞は肝細胞かあるいはOval細胞と肝臓の病態により異なることを示す。

## 3. GFP/CCl<sub>4</sub>モデルの開発

われわれは骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の研究を推進するにあたり、どのような状態において骨髄細胞は肝細胞に分化するかという問題を解決したいと考えた。このためには新たな*in vivo*モデルの開発が必要だと考えた。この分化に関与する微小環境“Niche”は、さまざまな炎症、免疫的なシグナル、転写因子、細胞外マトリックスなどが関与し制御されていると考えられる。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、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -galactosidase:  $\beta$ -gal)陽性の血球幹細胞の投与により、移植した $\beta$ -gal陽性細胞が肝臓に細胞塊をつくり定着し、肝臓の機能がうまく代償されることが、報告されていた<sup>5)</sup>。しかしながらこのモデルは非常に特殊なチロシン血症モデルであり、われわれが日常の現場でみる肝炎、肝硬変モデル病態は異なる。またFAHモデルでみられる移植細胞の細胞塊をわれわれは実際のヒトの肝臓の病理像においてはほとんどみることはない。一方でわれわれが実際に再生療法をおこない救済したいと考える対象患者は持続的な肝障害がつづい

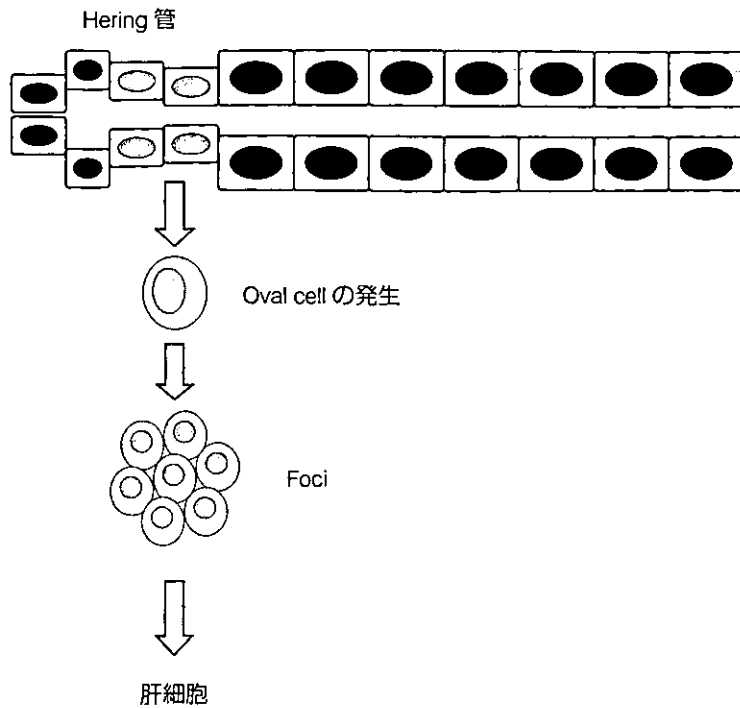


図 2. Oval cell 発生をつうじた肝再生 (AAF/PH モデル)

ている肝硬変患者(非代償性肝硬変症)が対象になる。われわれは持続的な肝障害がつづく肝硬変症患者を対して、果たして骨髄細胞を用いた肝臓再生療法をおこなうことが有用であるか評価したいと考えた。このために、まずレシピエントモデルを四塩化炭素( $\text{CCl}_4$ )の持続投与によりつくった肝硬変マウスとし、GFPTg マウス<sup>6)</sup>から GFP 陽性骨髄細胞を投与することで投与した GFP 陽性骨髄細胞の肝細胞への分化の有無またその過程を評価した。最終的にわれわれの開発したモデルは“GFP/ $\text{CCl}_4$ モデル”と名づけた。図 3 に GFP/ $\text{CCl}_4$ モデルの概略を示すが、まず 4 週間ほど  $\text{CCl}_4$  投与により持続肝障害を起こし肝硬変状態にしたレシピエントマウスに、GFP 標識した陽性骨髄細胞(非培養、ヘテロな細胞集団)を尾静脈より投与して骨髄細胞の肝細胞への分化について評価した。過去の移植実験においては骨髄細胞の分化については、骨髄細胞投与後は肝障害を止めて評価している。しかしながらわれわれが臨床でみる患者は持続的に肝障害がつづく患者であるため  $\text{CCl}_4$  投与は骨髄細胞移植後もつづけ GFP 陽性骨髄細胞

の定着について評価した。結果は、図 4 のように肝障害がない状態では骨髄細胞は肝臓には遊走されなかったが、 $\text{CCl}_4$ での持続肝障害状態で投与した骨髄細胞は投与後 1 日目から門脈周囲に定着し、持続肝障害下の特殊な Niche において骨髄細胞から肝芽細胞に分化し、最後は機能的な肝細胞索構造をつくりアルブミン産生の肝細胞へ分化することが明らかになった。実際に肝機能も代償していた<sup>7-9)</sup>。つぎに分化機序についての評価であるが、骨髄細胞は図 5 に示すように Oval cell の表現型を経るのか、それとも肝芽細胞の表現型を経るのかを明らかにすることが重要と考えられた。共同研究者の仁科博史博士らは肝発生を分子レベルで解析することを目的として、過去に知られているアルファフェトプロテイン以外の胎児肝特異的な分子マーカーを単離する目的で、胎生期 11.5 日 (E 11.5) のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。Liv 2 と命名した抗体は、マウス発生期に出現する肝幹細胞である肝芽細胞を特異的に認識する<sup>10)</sup>。この Liv 2 抗体で染色してみると骨髄細胞は Liv 2 陽性の肝芽細胞に

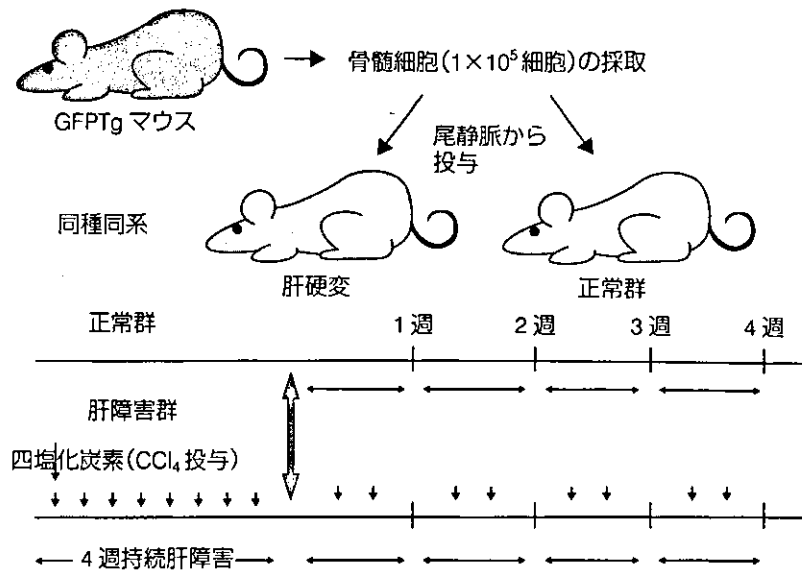


図 3. GFP/CCl<sub>4</sub>モデル

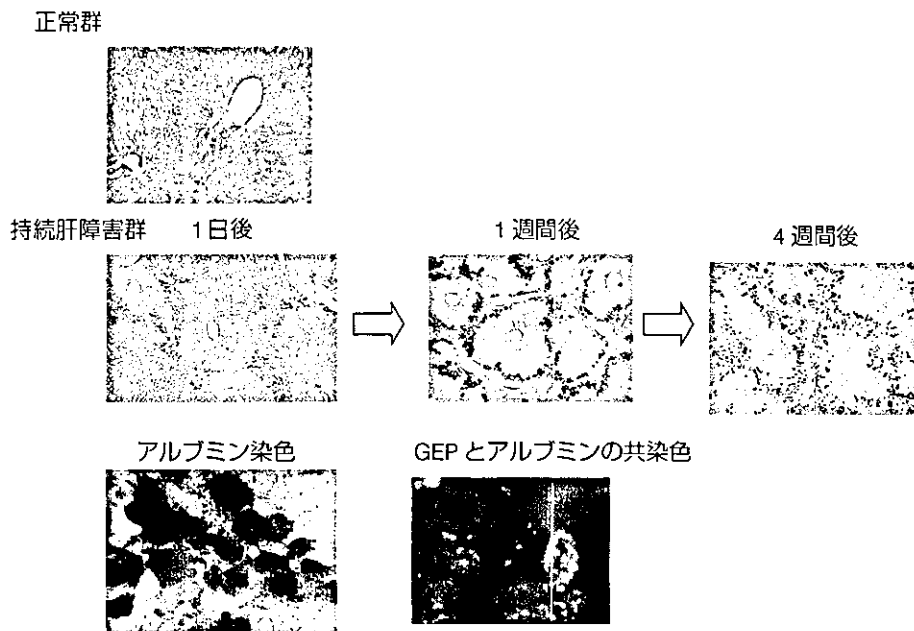


図 4. GFP 陽性骨髄細胞の分布および肝細胞への分化

分化していることが明らかになった。一方マウスの Oval 細胞の特異抗体である A 6 抗体<sup>11)</sup>の染色をおこなうも骨髄細胞は A 6 陽性 Oval 細胞の表現型はとらないことが明らかになり、GFP/CCl<sub>4</sub>モデルにおいては投与した骨髄細胞が Oval 細胞

の表現型を経ることはなく、発生段階と同様に肝芽細胞の表現型を経ながら肝細胞に分化することが明らかになった<sup>7)</sup>。Liv 2 抗体を用い肝形成不全となる SEK 1, MKK 7, c-Jun ノックアウトマウスや血液幹細胞を欠損する AML 1 ノックアウト

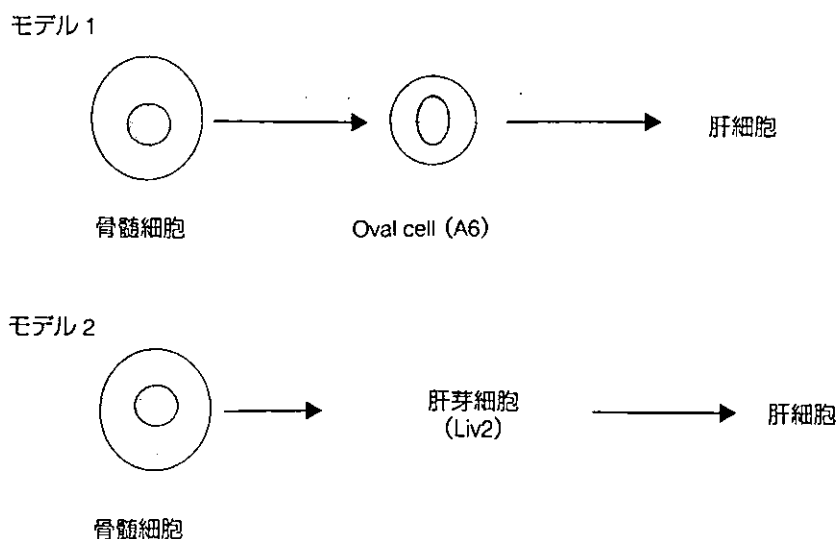


図 5. 骨髓細胞の肝細胞への分化の経路

マウスの解析をおこなった結果、炎症性シグナルの SEK 1, MKK 7 → SAPK/JNK → c-Jun シグナル系が肝芽細胞の自己複製と生存維持に必須の役割を果たしていることが明らかになっており<sup>10)</sup>, GFP/CCl<sub>4</sub>モデルにおける骨髓細胞の分化転換に炎症性シグナルが重要なことは、炎症性シグナルが肝発生に重要なことと、共通機構がはたしている可能性が考えられた。現在、分化制御機構については DNA-Chip や増殖因子の解析をつうじておこなっており、これらの結果は骨髓細胞がまず幼弱化するステップが重要と考えられるデータを得ている(大森, 石川未発表データ)。またこのモデルにおいて実際に肝不全状態が骨髓細胞の投与により改善されたのであるが、血清のアルブミンの値は有意差をもって改善し、また3ヵ月以上みた生存率も有意に改善していた。これらの結果は持続肝障害がつづく肝硬変状態において骨髓細胞は肝臓再生に有用な細胞源になる可能性を示した。

#### 4. 骨髓中に存在する肝臓再生に有用な細胞群

一方で肝細胞へ可塑性があると考えられる候補細胞としては、骨髓中の細胞は大きく3つ、血球幹細胞(hematopoietic stem cell : HSC)<sup>12)</sup>, 間葉

系幹細胞(mesenchymal stem cell : MSC)<sup>13)</sup>また最近幹細胞として注目されている SP 細胞(side population cell)<sup>14)</sup>があげられるが、実際に骨髓中にどの分画に幹細胞がするかは非常に混乱している。血球系マーカーをどこまで使い分画を評価するかの問題もあるが非常に混乱している。われわれは従来の手法とは違う方法、すなわち肝発生について注目したアプローチをおこなうこととした。肝臓の発生の特徴として胎児肝は造血の場であるということがあげられる。そこでわれわれは胎児期の造血時期である E 11.5 日のマウス胎児肝を抗原とし新規マウスモノクローナル抗体 Liv 8 抗体を作成し骨髓中の肝幹細胞の同定を目的に以下の研究をおこなった<sup>15)</sup>。Liv 8 陽性細胞は全骨髓細胞中約 30%存在し CD 45 陽性細胞分画を含んでいた。E 11.5 日の胎児肝では Liv 8 陽性細胞の存在を確認するも、造血能がない AML 1 KO マウスの胎児肝では Liv 8 陽性細胞の存在は確認できなかった。これらの結果は、Liv 8 抗体は血球前駆細胞を大きく認識する抗体であることを示す。そこで GFP/CCl<sub>4</sub>モデルを用い、GFPTg マウスから分離した骨髓細胞を AutoMACS を使用し、Liv 8 抗体で全骨髓細胞を Liv 8(-)骨髓細胞集団と Liv 8(+ )骨髓細胞集団に分離しそれぞれを

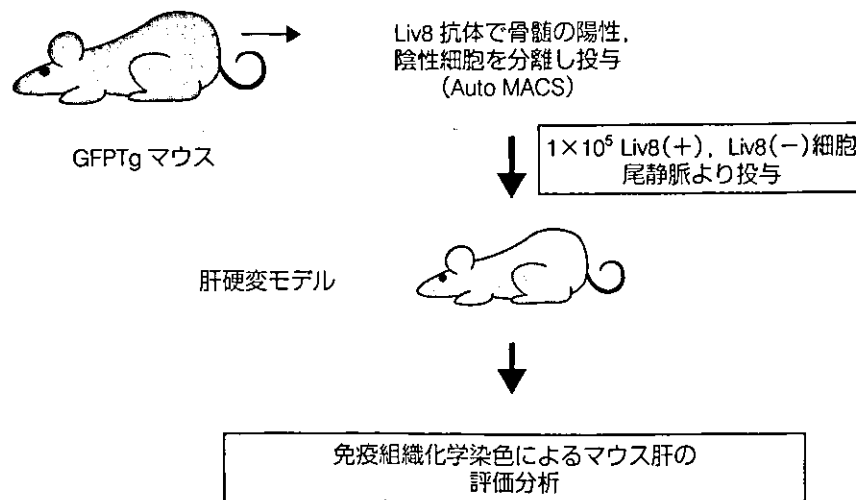


図 6. 実験プロトコール

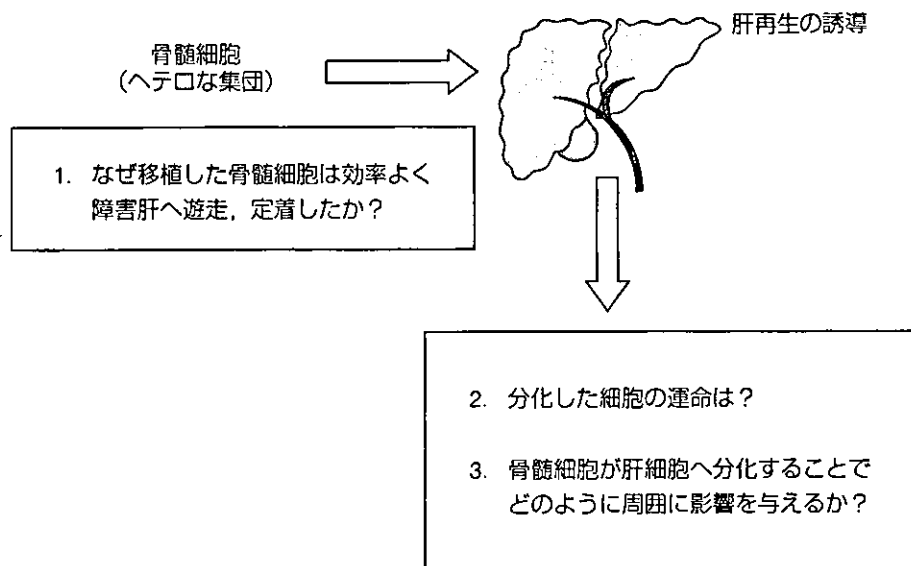


図 7. 今後の課題

CCl<sub>4</sub>投与にて肝硬変状態にしたレシピエントマウスの尾静脈よりこれらの細胞群を投与し免疫染色, 蛍光二重染色にて Liv 8 陽性, 陰性細胞群のアルブミン陽性肝細胞への分化の有無, また血清アルブミン値の改善について評価した(図 6)。その結果肝細胞への分化転換についての評価の結果より, Liv 8 陰性分画に肝臓再生に有用な細胞群が存在する可能性が明らかになった。現在 Liv 8 抗体の認識する抗原については同定をめざしている。

今後の解析によりさらに骨髄中の肝疾患の治療に有用な細胞群を評価していきたいと考える。

### 5. 肝線維化との関連

われわれが対象とする疾患は肝硬変症の患者である。肝硬変症というのは持続的な肝障害の進行にともない, 肝線維化が進行する病態である。今回われわれは GFP/CCl<sub>4</sub>モデルにおける肝線維化との関連についてもシリウスレッド染色にて評価



した。その結果、肝線維化については持続的な炎症の存在下であるにもかかわらず、肝線維化は有意に改善していた<sup>16)</sup>。つまり CCl<sub>4</sub> 投与による持続炎症下において、骨髄細胞はアルブミン陽性肝細胞に分化するとともに、線維化改善という面において有用性を示すデータが得られている。今後はこの機序の解明をおこなっていく必要があると考える。

## 6. 今後の課題

今回われわれは GFP/CCl<sub>4</sub> モデルを開発することにより、持続肝障害下において投与した骨髄細胞が効率よく肝臓に遊走定着し、幼弱化しながら肝芽細胞のなり肝細胞になることが明らかになったが、①なぜ投与した細胞は効率よく障害を起こした肝臓に遊走されたか？ ②また移植した細胞の運命は？ ③また移植した細胞が分化することで周囲の肝臓への影響はどうか？(図7)など今後さまざまなことについて解明していかなければならない。これらを解明できれば将来さらに効率的な肝臓再生療法の開発につながると考えられる。

## 7. 臨床への応用

骨髄細胞移植を用いた下肢および血管再生療法はすでに臨床応用がおこなわれており良好な成績をあげている<sup>17)18)</sup>。また血液疾患の治療に骨髄移植は過去20年以上の経験があり、多くの施設で応用されており、骨髄採取のそのものについては確立されている。われわれの基礎的な検討では骨髄細胞の投与により肝機能の改善が確認され、また肝線維化生存率も改善していた。これらの結果は肝不全(非代償性肝硬変症)などに対する『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発の可能性を強く示す結果であった。われわれは2003年11月14日より、(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)第I相臨床研究を開始した。まずは安全性を評価する臨床研究になるが、この(基礎から臨床)、(臨床から基礎研究)というトランスレーショナルリサーチを推進することで、次世代のスタンダー

ドになる肝臓再生療法を開発したいと考えている。

## おわりに

われわれの臨床研究は現時点(2004年9月)においては6例の患者に施行している。今後さらに慎重に臨床研究、基礎研究を進めていき、多くの肝硬変、肝不全患者に役立つ治療法を開発したいと考えている。

本稿の発表する機会を与えて頂いた大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野の松本邦夫先生に紙面を借り深謝いたします。

## 文献

- 1) Theise, ND. *et al.*: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11-16, 2000
- 2) Okamoto, R. *et al.*: Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.* 8: 1011-1017, 2002
- 3) Sell, S.: Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33: 738-750, 2001
- 4) Grisham, JW. *et al.*: Liver stem cells. In: *Stem Cell*, ACADEMIC PRESS INC, Manchester, 1997, pp. 233-282
- 5) Lagasse, E. *et al.*: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* 6: 1229-1234, 2000
- 6) Okabe, M. *et al.*: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407: 313-319, 1997
- 7) Terai, S. *et al.*: An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 134: 551-558, 2003
- 8) McTaggart, RA. *et al.*: An uncomfortable silence em leader while we all search for a better reporter gene in adult stem cell biology. *Hepatology* 39: 1143-1146, 2004
- 9) 寺井崇二ほか: 骨髄細胞から肝細胞への分化転換の制御機構の解析とその臨床応用—自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の基礎的検討—. *G. I. Research* 12: 117-125, 2004

- 10) Watanabe, T. *et al.* : SEK 1/MKK 4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev. Biol.* **250** : 332-347, 2002
- 11) Factor, VM. *et al.* : Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am. J. Pathol.* **145** : 409-422, 1994
- 12) Krause, DS. *et al.* : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105** : 369-377, 2001
- 13) Pittenger, MF. *et al.* : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 14) Uchida, N. *et al.* : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD 34(+)side population(SP) phenotype. *J. Clin. Invest.* **108** : 1071-1077, 2001
- 15) Yamamoto, N. *et al.* : A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv 8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313** : 1110-1118, 2004
- 16) Sakaida, I. *et al.* : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl 4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* (in press)
- 17) Hamano, K. *et al.* : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann. Thorac. Surg.* **73** : 1210-1215, 2002
- 18) Stamm, C. *et al.* : Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361** : 45-46, 2003

# MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence

Teiji Wada<sup>1,2</sup>, Nicholas Joza<sup>1,2</sup>, Hai-ying M. Cheng<sup>2</sup>, Takehiko Sasaki<sup>2</sup>, Ivona Kozieradzki<sup>2</sup>, Kurt Bachmaier<sup>2</sup>, Toshiaki Katada<sup>3</sup>, Martin Schreiber<sup>4</sup>, Erwin F. Wagner<sup>5</sup>, Hiroshi Nishina<sup>3</sup> and Josef M. Penninger<sup>1,2,6</sup>

During the development of multicellular organisms, concerted actions of molecular signalling networks determine whether cells undergo proliferation, differentiation, death or ageing. Here we show that genetic inactivation of the stress signalling kinase, MKK7, a direct activator of JNKs in mice, results in embryonic lethality and impaired proliferation of hepatocytes. Beginning at passage 4–5, *mkk7*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEFs) display impaired proliferation, premature senescence and G2/M cell cycle arrest. Similarly, loss of c-Jun or expression of a c-JunAA mutant in which the JNK phosphorylation sites were replaced with alanine results in a G2/M cell-cycle block. The G2/M cell-cycle kinase CDC2 was identified as a target for the MKK7–JNK–c-Jun pathway. These data show that the MKK7–JNK–c-Jun signalling pathway couples developmental and environmental cues to CDC2 expression, G2/M cell cycle progression and cellular senescence in fibroblasts.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of serine/threonine kinases that transduce signals from the cell membrane to the nucleus in response to a wide range of stimuli<sup>1–7</sup>. Two independent stress kinase signalling pathways — p38-MAPK and JNKs (c-Jun N-terminal kinase or SAPKs, stress-activated protein kinases) — participate in many different intracellular signalling pathways that control a spectrum of cellular processes, including cell growth, differentiation, transformation and apoptosis<sup>1–7</sup>. Both JNK-activation kinases — MKK4 and MKK7 — are required for full activation of JNK<sup>8–10</sup>, and genetic inactivation of *mkk4* results in embryonic lethality with a liver defect

between embryonic day 10.5 (E10.5) and E12.5 (ref. 11). However, nothing is known about the role of MKK7 in embryogenesis<sup>12</sup>.

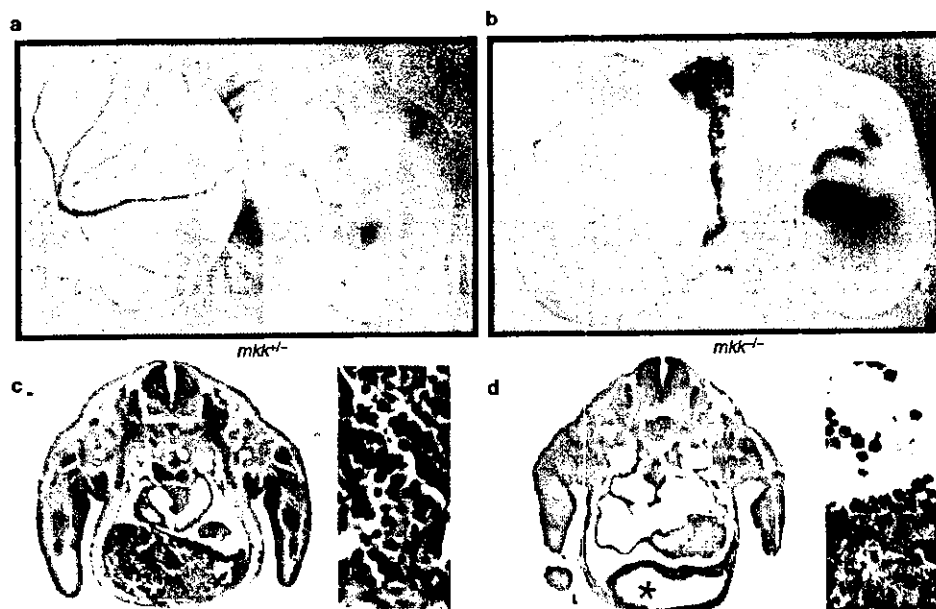
Here we show that genetic inactivation of MKK7 in mice results in defective hepatocyte proliferation and embryonic lethality. Inactivation of MKK7 in embryonic fibroblasts results in impaired proliferation, a G2/M cell-cycle arrest and premature senescence. The G2/M cell-cycle kinase CDC2 was identified as a molecular target for MKK7–JNK signalling. Loss of c-Jun or a expression of c-JunAA mutant in which the JNK phosphorylation sites were inactivated<sup>13,14</sup> also resulted in defective G2/M cell cycle progression and impaired CDC2 expression.

**Table 1 Embryonic lethality in *mkk7*<sup>-/-</sup> mice**

	Litters	<i>mkk7</i> <sup>+/+</sup>	<i>mkk7</i> <sup>-/-</sup>	<i>mkk7</i> <sup>-/-</sup>	Dead (%)	Total
E9.5	2	4	11	2	0 (0)	17
E10.5	2	5	8	5	0 (0)	18
E11.5	26	55	106	47	15 (31.1)	208
<b>E12.5</b>	<b>16</b>	<b>31</b>	<b>67</b>	<b>33</b>	<b>30 (90.9)</b>	131
E13.5	5	11	17	12	12 (100)	40
E16.5	1	3	4	0	–	7
1W	5	9	21	0	–	39

Embryos were isolated at the indicated time of gestation, analysed for viability and processed for histological staining. Genotypes of embryos were determined by PCR. Viability of embryos was determined by observing heart beating. E = embryonic day; 1W = 1 week after birth.

<sup>1</sup>IMBA (Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences), c/o Dr. Bohrgasse 3-5, A-1030 Vienna, Austria. <sup>2</sup>University Health Network, Departments of Medical Biophysics and Immunology, University of Toronto, 620 University Avenue, Ontario M5G 2C1, Toronto, Canada. <sup>3</sup>Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan. <sup>4</sup>University of Vienna School of Medicine, Dept of Obstetrics and Gynecology Waehringer Guertel 18-20, A-1090 Vienna, Austria. <sup>5</sup>IMP (Research Institute of Molecular Pathology), Dr. Bohrgasse 7, A-1030 Vienna, Austria. <sup>6</sup>Correspondence should be addressed to J.P. (e-mail: josef.penninger@oeaw.ac.at)



**Figure 1** Impaired liver development in *mkk7*<sup>-/-</sup> embryos. (a, b) Macroscopic analysis of E11.5 *mkk7*<sup>+/+</sup> (a) and E11.5 *mkk7*<sup>-/-</sup> (b) littermate embryos. (c, d) Transverse sections of E11.5 *mkk7*<sup>+/+</sup> (c) and E11.5 *mkk7*<sup>-/-</sup> (d) embryos stained with H&E. Note the severe anaemia (b) and reduction of

parenchymal hepatocytes in E11.5 *mkk7*<sup>-/-</sup> embryonic livers (asterisk in c and d). It should be noted that the liver structure and liver parenchyma are overtly normal in E9.5. Right panels show embryonic livers at higher magnifications (x100).

**Table 2** Increased G2/M boundaries in *junAA* and *c-jun*<sup>-/-</sup> MEFs

Passages	2			4			6			
	<i>mkk7</i> <sup>+/+</sup>	<i>mkk7</i> <sup>-/-</sup>	<i>junAA</i>	<i>mkk7</i> <sup>+/+</sup>	<i>mkk7</i> <sup>-/-</sup>	<i>junAA</i>	<i>mkk7</i> <sup>+/+</sup>	<i>mkk7</i> <sup>-/-</sup>	<i>junAA</i>	<i>c-jun</i> <sup>-/-</sup>
G1 (%)	66.5	70.2	64.0	65.0	56.3	66.9	65.4	64.8	64.6	62.9
S (%)	14.7	11.8	14.5	16.3	13.0	5.8	14.9	9.0	6.4	7.9
G2/M (%)	18.8	18.0	21.5	18.7	30.3	27.3	19.7	26.2	29.0	29.2

Cells were stained with PI, and cycle profiles were determined in *mkk7*<sup>+/+</sup>, *mkk7*<sup>-/-</sup>, *mkk7*<sup>+/+</sup>, *c-jun*<sup>-/-</sup> and *c-junAA* MEFs at the indicated passage numbers. Data from one representative experiment are shown.

## RESULTS

### Generation of *mkk7* knockout mice

The *mkk7* gene was targeted, as shown in Supplementary information Fig. S1a. Disruption of the gene was confirmed by southern blot analysis of genomic DNA and Northern blot analysis of total RNA (see Supplementary Information, Fig. S1b, c). *mkk7*<sup>+/+</sup> mice appear normal, are fertile, and show no obvious defects. However, no *mkk7*<sup>-/-</sup> mice were found from intercrosses between heterozygous mice (Table 1). Thus, loss of MKK7 results in embryonic lethality.

### MKK7 controls embryonic liver development

To determine the gestational time of *mkk7* lethality, we examined embryos from heterozygous intercrosses at different developmental stages. *Mkk7*<sup>-/-</sup> embryos died between E11.5 and E13.5 (Table 1). All *mkk7*<sup>-/-</sup> embryos were severely anaemic, but otherwise normal in appearance (Fig. 1b). PECAM-1 staining of endothelial cells and H&E (haematoxylin and eosin) staining of blood islands from E8.5–E10.5

embryos showed that MKK7 expression is not essential for blood-island formation in the yolk sac and vasculogenesis (data not shown).

Histological analysis revealed that the liver anlage form normally in E8.5 and E9.5 *mkk7*<sup>+/+</sup>, *mkk7*<sup>+/+</sup>, and *mkk7*<sup>-/-</sup> embryos (data not shown). However, livers from E11.5 and E12.5 *mkk7*<sup>-/-</sup> embryos were severely disorganized and contained significantly reduced numbers of parenchymal hepatocytes (Fig. 1d). At E11.5 of embryogenesis, the expression levels of p53, MDM2, phospho-ERKs and phospho-p38 seemed comparable between *mkk7*<sup>+/+</sup> and *mkk7*<sup>-/-</sup> livers, as well as in whole embryos (see Supplementary information, Fig. S1d). These data show that MKK7 is essential for liver formation during embryogenesis.

### Decreased proliferation and premature senescence in *mkk7*<sup>-/-</sup> MEFs

As genetic inactivation of *mkk7* resulted in embryonic lethality, we analysed the role of MKK7–JNK signalling in MEFs isolated from *mkk7*<sup>+/+</sup>, *mkk7*<sup>-/-</sup> and *mkk7*<sup>-/-</sup> embryos. As predicted from other stud-