

Fig. 2. Generation of *Cfr*-deficient mice. (A) Schematic representation of the wild-type and gene-trapped *Cfr* locus. The genomic region around the first intron is shown. In the trapped allele, a β -geo cassette is inserted in the first intron. To confirm the correct insertion, three oligonucleotide primers, P1-P3, were designed. (B) Confirmation of the gene-trapping. PCR with P1-P3 revealed that DNA fragments of the sizes expected from the genotypes were correctly amplified. The sizes of DNA fragments amplified with P1 and P2, and P1 and P3, should be 353 and 500 bp, respectively. The positions of DNA size markers are shown on the right. Western blot analysis of whole embryo lysate from each genotype with anti-*Cfr* serum revealed that the wild-type *Cfr* and the β -geo fusion proteins were expressed in the expected pattern from the wild-type allele and the trapped allele, respectively. No wild-type *Cfr* was detected in $-/-$ embryos, indicating that this trapping resulted in a null mutation. The amount of protein loaded on the gel was confirmed by anti-actin blotting.

weeks of age (Table 1). Adult *Cfr*^{-/-} mice had no obvious abnormality in their appearance, but their size and weight were significantly smaller than those of wild-type mice (data not shown). As a preliminary histological analysis of two *Cfr*^{-/-} adult male survivors showed no obvious pathological abnormality in the brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, stomach, guts, thymus, skin, skeletal muscle, eye or testis (data not shown), the cause of lethality is currently unknown. Because we identified *Cfr* as a Dlk-binding molecule, we considered the possibility that the lack of *Cfr* might affect the expression of *Dlk*. However, neither the mRNA nor protein level of *Dlk* was altered in *Cfr*-deficient mice (see Fig. S1A-D in the supplementary material). Because the inserted β -geo cassette expresses β -gal activity via the promoter of the inserted gene, the β -gal activity in *Cfr*^{+/-} embryos represents the *Cfr* promoter activity. At E7.5, *Cfr* was expressed only in the epiblast, and thereafter ubiquitously at all stages examined, E8.5-14.5 (see Fig. S2A in the supplementary material and data not shown). Northern blot analysis using total RNA from various adult tissues revealed that *Cfr* was expressed in all the tissues examined, although levels were variable (see Fig. S2B in the supplementary material). Thus, *Cfr* is expressed broadly in the body from early embryonic stages to adulthood.

Growth retardation, skeletal abnormality and cleft palate in *Cfr*-deficient mice

At E18.5, *Cfr*^{-/-} embryos were smaller in size and weighed less than *Cfr*^{+/+} and *Cfr*^{+/-} littermates (Fig. 3A,B). We also noticed that tails of all *Cfr*^{-/-} E18.5 embryos and neonates were distorted, suggesting an abnormal skeletal development. In fact, Alcian Blue/Alizarin Red staining of bones and cartilages revealed that tail skeletons of *Cfr*^{-/-} neonates were distorted, whereas the other skeletons were

almost normal (Fig. 3C). The distortion seemed to be caused by an irregular arrangement of the tail cartilages (Fig. 3D). In addition, about 19% (7/37) of *Cfr*^{+/-} neonates had a bloated abdomen filled with air (Fig. 3E). As cleft palate in mice often results in an accumulation of air in the stomach and a bloated abdomen, we investigated the palates of *Cfr*^{+/-} neonates, and found that about 30% (11/37) of the mice exhibited cleft palate (Fig. 3F). All of the *Cfr*^{+/-} mice with a bloated abdomen had a cleft palate. We investigated craniofacial skeletal elements and found incomplete fusion of maxillary shelves in *Cfr*^{+/-} neonates with cleft palate (Fig. 3G). The other skeletal elements were apparently normal in *Cfr*^{+/-} mice (Fig. 3C,G and data not shown). *Cfr*^{+/+} mice showed no obvious abnormality. These results indicate that *Cfr* is essential for normal development.

Expression profile of *Cfr* and *Dlk* in developing skeletons

Although *Cfr* is ubiquitously expressed in embryos, as shown in Fig. S2 in the supplementary material, the skeletal abnormality of *Cfr*^{-/-} mice prompted us to investigate more detailed expression patterns of *Cfr* in embryonic skeletons. We examined expression patterns of *Cfr* as well as *Dlk* in limbs, vertebrae and maxillae of E14.5 wild-type embryos by immunofluorescent staining and found that *Cfr* and *Dlk* were specifically expressed in prehypertrophic chondrocytes, and reserve and proliferating chondrocytes, respectively, in humeri (Fig. 4). The same expression patterns were observed in other limb skeletons (data not shown). *Cfr* and *Dlk* were also expressed in vertebrae and maxillae, although the specificity of cell-types or stages was unclear (see Fig. S3A,B in the supplementary material). Thus, *Cfr* and *Dlk* are expressed in developing skeletons, contributing to skeletal development.

Table 1. Genotypes of offspring from matings of *Cfr*^{+/-} mice

	E9.5	E18.5	P0	P1	P2	3 week
+/+	26 (25.2)	32 (25.8)	40 (30.8)	32 (30.2)	76 (36.7)	63 (32.0)
+/-	51 (49.5)	57 (46.0)	70 (53.8)	69 (65.1)	124 (59.9)	129 (65.5)
-/-	26 (25.2)	35 (28.2)	20 (15.4)	5 (4.7)	7 (3.4)	5 (2.5)
Total	103	124	130	106	207	197

Male and female *Cfr*^{+/-} mice were mated and genotypes of the offspring were analyzed at the indicated time points. The numbers in parentheses indicate the percentage of a genotype. The Mendelian segregation pattern was observed until E18.5, but the number of *Cfr*^{-/-} mice was reduced after birth. By day 2 after birth, about 90% of *Cfr*^{-/-} mice had died.

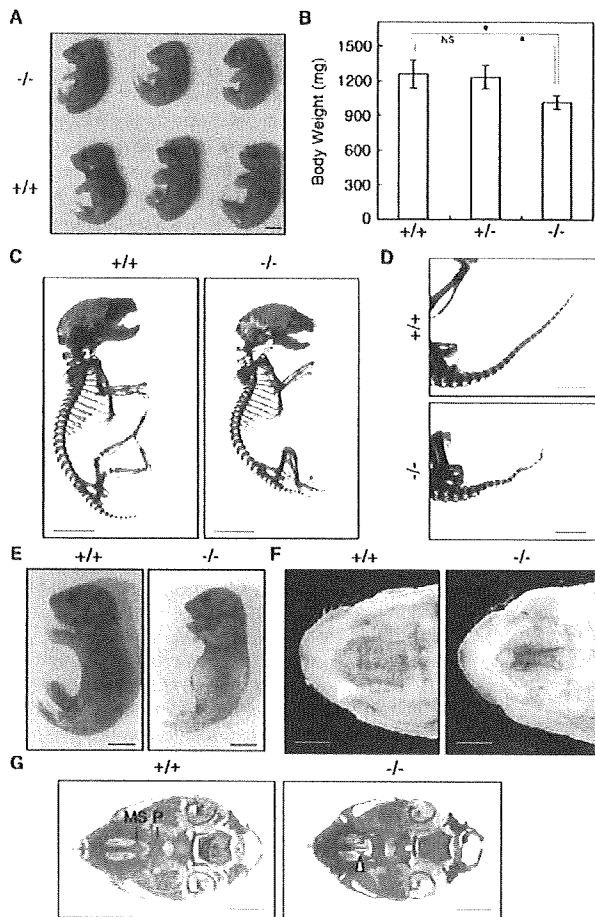


Fig. 3. Phenotypes of *Cfr*-deficient mice. (A) E18.5 *Cfr*^{+/+} (lower three) and *Cfr*^{-/-} (upper three) littermates. Note that the *Cfr*^{-/-} embryos are smaller. (B) Body weight of E18.5 embryos with s.d. (+/+, n=25; +/-, n=46; -/-, n=30). P-value was calculated with Student's *t*-test: *, *P*<0.001; NS, *P*>0.5. (C) Alcian Blue/Alizarin Red staining of bone and cartilage of neonates. *Cfr*^{-/-} neonates showed a basically normal skeleton except for their distorted tails. (D) Distorted tails of *Cfr*^{-/-} neonates. All *Cfr*^{-/-} neonates had a distorted tail. (E) Bloated abdomen of *Cfr*^{-/-} neonates. About 19% (7/37) of *Cfr*^{-/-} neonates had a bloated abdomen filled with air. (F) Cleft palate of *Cfr*^{-/-} neonates. About 30% (11/37) of *Cfr*^{-/-} neonates had a cleft palate. (G) Incomplete fusion of maxillary shelves in about 25% (3/13) of *Cfr*^{-/-} neonates. Craniofacial skeletons were stained with Alcian Blue/Alizarin Red and viewed from beneath. For clarity, the lower jaws were removed. The arrowhead indicates the incomplete fusion of maxillary shelves. Scale bars: 2 mm in D,F,G; 5 mm in A,C,E. MS, maxillary shelves; P, palatine.

Genetic interaction between *Cfr* and *Fgf18*

Because *Cfr* is an FGF-binding molecule, we considered that the observed phenotypes of *Cfr*-deficient mice were caused by deregulation of some of the FGF signaling pathways. To address this possibility, we compared *Cfr*-deficient mice with all the *Fgf*-deficient mice reported previously, and noticed that the phenotypes of *Cfr*^{-/-} mice, such as perinatal death, growth retardation, tail distortion and cleft palate, are markedly similar to those of *Fgf18*-deficient mice. Therefore, we searched for a

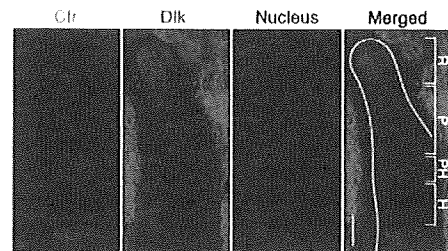


Fig. 4. Expression profiles of *Cfr* and *Dlk* in humeri.

Immunofluorescent staining of *Cfr* (green) and *Dlk* (red) in E14.5 wild-type humeral longitudinal sections. In the merged photograph, the green and red signals are merged with signals of nuclei stained with Hoechst 33342 (blue), and humeri are outlined by a white line. Regions for reserve (R), proliferating (P), prehypertrophic (PH) and hypertrophic (H) chondrocytes are indicated. Note that *Cfr* is expressed specifically in prehypertrophic chondrocytes, while *Dlk* in reserve and proliferating chondrocytes. Scale bar: 80 μ m.

functional link between *Cfr* and *Fgf18*. First, we investigated whether there is any genetic interaction between *Cfr* and *Fgf18* by mating *Cfr*^{+/-} mice with *Fgf18*^{+/-} mice. Among the offspring, wild-type, *Cfr*^{+/-} and *Fgf18*^{+/-} mice had no obvious phenotype. *Cfr*^{+/-};*Fgf18*^{+/-} double heterozygous (D-HT) mice were viable and fertile (data not shown). They were comparable in body weight to other genotypes and had a normal tail morphology at birth (see Fig. S4A,B in the supplementary material). However, D-HT mice were significantly smaller than wild-type mice at 3 months after birth, whereas neither *Cfr*^{+/-} nor *Fgf18*^{+/-} mice showed such a phenotype (Fig. 5A). The phenotype was more evident in D-HT male mice, as they were already smaller than wild-type male mice at 1 month after birth (Fig. 5A). Moreover, the tails of D-HT mice were distorted by 7 days after birth like those of *Cfr*-deficient mice and *Fgf18*-deficient mice, but neither *Cfr*^{+/-} nor *Fgf18*^{+/-} mice showed tail distortion (Fig. 5B,C). The tail distortion in D-HT mice was visible from postnatal day 3 and retained even in adulthood. About 83% (19/23) of adult D-HT mice showed the malformation. These phenotypes clearly indicate genetic interaction between *Cfr* and *Fgf18*, suggesting functional cooperation.

We further analyzed the genetic interaction between *Cfr* and *Fgf18* by crossing D-HT mice. As was the case for the offspring from mating of *Cfr*^{+/-} mice (Table 1), some *Cfr*^{-/-} neonates from mating of D-HT mice died after birth. Mortality among *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{+/-} mice was similar to that among *Cfr*^{-/-} mice, indicating that the lack of one *Fgf18* allele did not affect the viability of *Cfr*^{-/-} mice (data not shown). Likewise, skeletons of *Cfr*^{-/-} and *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{+/-} neonates showed no significant difference (Fig. 5D). Consistent with the finding that the complete loss of *Fgf18* resulted in perinatal death and skeletal abnormalities (Liu et al., 2002; Ohbayashi et al., 2002), *Cfr*^{+/-};*Fgf18*^{-/-}, *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} as well as *Fgf18*^{-/-} mice died at birth. *Fgf18*^{-/-} neonates showed slightly distorted ribs and the additional loss of one *Cfr* allele (*Cfr*^{+/-};*Fgf18*^{-/-}) enhanced the distortion of the ribs and caused curvature of the spine. In *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} double knockout neonates, the distortion of the ribs and curvature of the spine were much more severe than in *Cfr*^{+/-};*Fgf18*^{-/-} mice, although the number of ribs was normal and there was no fusion of the ribs (Fig. 5D). These results clearly indicate that *Cfr* and *Fgf18* play indispensable and overlapping roles in skeletal development.

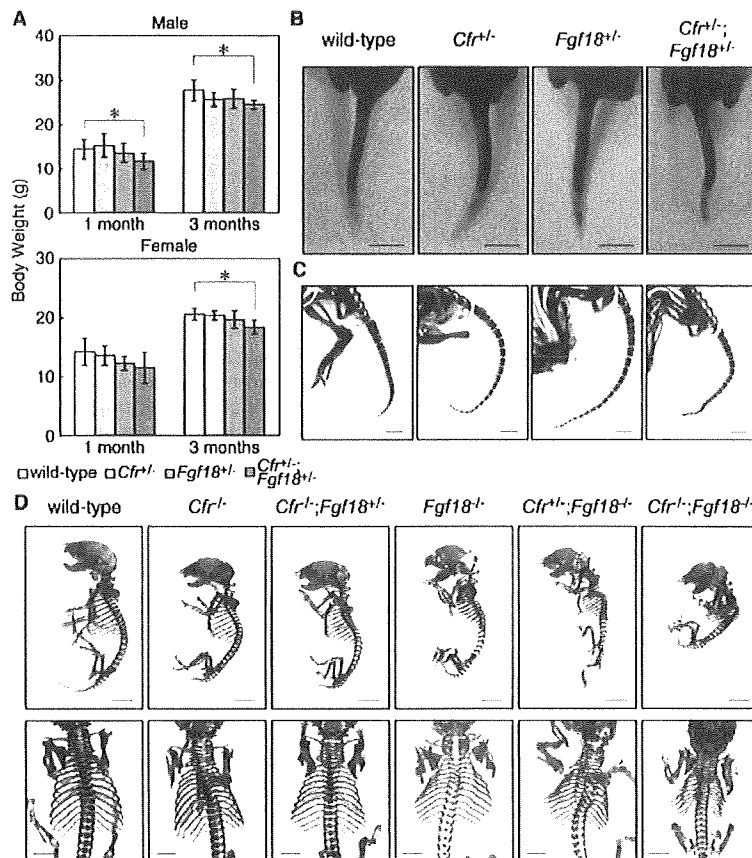


Fig. 5. Genetic interaction between *Cfr* and *Fgf18*. (A) Body weight of wild-type, *Cfr*^{-/-}, *Fgf18*^{-/-} and *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} (double heterozygous, D-HT) 1 and 3 month(s) old mice from the mating of *Cfr*^{-/-} and *Fgf18*^{-/-} mice with s.d. (wild-type, n=6; *Cfr*^{-/-}, n=7; *Fgf18*^{-/-}, n=8; D-HT, n=6 for male) (wild type, n=5; *Cfr*^{-/-}, n=9; *Fgf18*^{-/-}, n=6; D-HT, n=9 for female). *P*-value was calculated with Student's *t*-test, *, *P*<0.05. Other *P*-values between wild-type mice and mutant mice are more than 0.07. (B) Tail morphology of wild-type, *Cfr*^{-/-}, *Fgf18*^{-/-} and D-HT postnatal day 7 (P7) mice. D-HT mice developed distorted tails by P7, whereas the others had normal tails, indicating genetic interaction between *Cfr* and *Fgf18*. (C) Alcian Blue/Alizarin Red staining of the tails of P7 mice. Tail distortion in D-HT mice was evident, whereas tails were normal in other genotypes. (D) Skeletons of compound mutant neonates. *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} double heterozygotes were crossed to generate compound mutants. Skeletons of wild-type, *Cfr*^{-/-}, *Fgf18*^{-/-}, *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-}, *Fgf18*^{-/-}, *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} and *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} neonates were stained with Alcian Blue and Alizarin Red. Top row, whole skeletons; lower row, ribs and spines from behind. As in Fig. 3C,D, *Cfr*^{-/-} neonates showed tail distortion, and *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} neonates showed no obvious difference from *Cfr*^{-/-} neonates. *Fgf18*^{-/-} neonates showed slight distortion of the ribs, and *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} neonates showed enhanced distortion of the tail and curvature of the spine. In *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} double knockout neonates, the distortion of the ribs and curvature of the spine were much more severe than in *Cfr*^{-/-};*Fgf18*^{-/-} neonates. Scale bars: 2 mm in C and top row in D; 4 mm in lower row in D; 5 mm in B.

Physical interaction between *Cfr* and *Fgf18*, and enhancement of *Fgf18*-*Fgfr3c* signaling by *Cfr*

We examined the possibility that the genetic interaction of *Cfr* with *Fgf18* resulted from their physical interaction. To address this possibility, we prepared recombinant *Fgf18* protein with a GST tag (GST-*Fgf18*), and used the GST tag alone as a control (Fig. 7A). We also prepared culture supernatant of COS7 cells transfected with an expression vector for the *Cfr*-EC. The purified GST-*Fgf18* or GST tag was added to the supernatant, and *Cfr*-EC was immunoprecipitated. Western blot analysis revealed that GST-*Fgf18* was co-immunoprecipitated with *Cfr*-EC, whereas the GST tag was not (Fig. 7B). These results clearly indicate that *Fgf18* binds to *Cfr* and suggest that *Cfr* positively regulates *Fgf18* signaling through this physical interaction.

To further confirm this possibility, we utilized a Ba/F3 cell line expressing *Fgfr3c*, which proliferates depending on *Fgf18* (Ornitz et al., 1996). We chose *Fgfr3c* because it has the highest affinity for *Fgf18* (Zhang et al., 2006) and is expressed in prehypertrophic chondrocytes in developing limb skeletons, where *Cfr* is also expressed (Ohbayashi et al., 2002) (Fig. 4). We infected these cells with viruses containing *Cfr* cDNA or without cDNA as a control, and assessed their responses to *Fgf18* by WST-1 assay. Expression of *Cfr* enhanced the responses of Ba/F3 cells with *Fgfr3c* to *Fgf18* (Fig. 6A), indicating that *Cfr* positively regulates *Fgf18*-*Fgfr3c* signaling. By contrast, Ba/F3 cells expressing *Cfr* alone failed to respond to *Fgf18*, whereas they proliferated in response to IL-3 (Fig. 6B). Based on these results, we concluded that *Cfr* enhances *Fgf18*

signaling via *Fgfr3c* but does not directly activate the intracellular signaling. As it is well known that heparin or HSPG is required for FGF signaling via FGFRs (Spivak-Kroizman et al., 1994; Yayon et al., 1991), we examined the effect of heparin on the *Cfr* function. We monitored responses of Ba/F3 cells expressing both *Fgfr3c* and *Cfr* to *Fgf18* in the presence or absence of heparin and found that they failed to respond to *Fgf18* at all in the absence of heparin, demonstrating that heparin is required for the function of *Cfr* (Fig. 6C).

Inhibition of the interaction between *Cfr* and *Fgf18* by *Dlk*

The results described above demonstrate genetic, physical and functional interaction between *Cfr* and *Fgf18*. However, it still remained unknown how *Dlk* is involved in the interaction between *Cfr* and *Fgf18*.

As *Cfr* physically interacts with both *Fgf18* and *Dlk*, we examined whether the binding of *Dlk* to *Cfr* affects the binding between *Cfr* and *Fgf18*. For this purpose, *Cfr*-EC was expressed in COS7 cells together with *Dlk*-Fc or CD4-Fc as a control. GST-*Fgf18* fusion protein was then added to the culture supernatants and *Cfr*-EC was immunoprecipitated. Western blot analysis of the immunoprecipitates revealed that co-immunoprecipitation of *Fgf18* with *Cfr*-EC was severely blocked in the presence of *Dlk*-Fc, but not CD4-Fc (Fig. 7C). These results indicate that *Dlk* interferes with the binding of *Fgf18* to *Cfr*, resulting in interruption of the positive regulatory role of *Cfr* in *Fgf18* signaling.

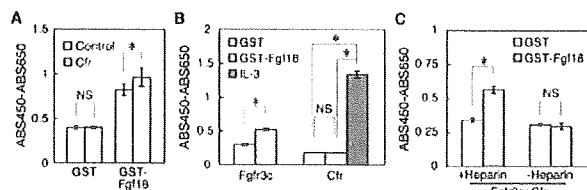


Fig. 6. Effects of Cfr in Fgf18 signaling in Ba/F3 cells. Ba/F3 cells were cultured in various conditions in 96 wells and the extent of proliferation was monitored by WST-1 assay. Absorbance at 450 nm subtracted by basal absorbance at 650 nm with s.d. is shown. We prepared eight wells for each condition. *P*-value was calculated with Student's *t*-test: *, *P*<0.01; NS, *P*>0.2. (A) Ba/F3 cells expressing Fgfr3c were infected with viruses carrying cDNA of *Cfr*, and we monitored proliferation in the presence of 500 ng/ml GST-Fgf18 or GST. As a control, Ba/F3 cells expressing Fgfr3c infected with viruses carrying no cDNA sequence were used. The cells with *Cfr* responded more strongly to Fgf18 than control cells. (B) Ba/F3 cells without FGFRs were infected with viruses carrying *Cfr* cDNA, and we monitored cell proliferation in the presence of 500 ng/ml GST-Fgf18 or GST, or 2 ng/ml IL-3. As a control for the activity of GST-Fgf18, we monitored responses of Ba/F3 cells with Fgfr3c to GST-Fgf18 at the same time. Ba/F3 cells with only *Cfr* could not respond to Fgf18, suggesting that *Cfr* does not directly activate the intracellular signaling. (C) Ba/F3 cells with both Fgfr3c and *Cfr* were activated by 500 ng/ml GST-Fgf18 in the presence or absence of 5 μ g/ml heparin. The same concentration of GST was added as a control. The cells could not respond to Fgf18 in the absence of heparin.

DISCUSSION

Cfr is a unique FGF-binding protein that binds FGFs via its long extracellular domain, but has a very short intracellular peptide of 13 amino acid residues without any known motifs for signaling. Therefore, it seems unlikely that *Cfr* directly activates the intracellular signaling pathways, which is in fact supported by the results using Ba/F3 cells expressing *Cfr* (Fig. 6B). Although *Cfr* seems to have no paralog in either mice or humans, it is evolutionally conserved and present even in *Caenorhabditis elegans* (data not shown), suggesting that *Cfr* is a fundamental component of the FGF signaling pathway. However, its physiological role remained unknown.

In this study we generated a *Cfr*-deficient mouse line and found that these mice exhibit perinatal lethality, growth retardation, distorted tails and cleft palates (Fig. 3). Another *Cfr*-deficient mouse line generated independently from this study shows the same phenotypes (H. Okae and Y. Iwakura, personal communication), supporting our results. Interestingly, among various *Fgf*-deficient mice reported so far, *Fgf18*-deficient mice exhibit phenotypes very similar to those of *Cfr*-deficient mice, such as perinatal death, growth retardation, tail distortion and cleft palate. Given this striking similarity, we considered that there is a functional link between *Cfr* and Fgf18. To address the genetic interaction of *Cfr* with *Fgf18*, double heterozygous mice were generated by mating *Cfr*^{+/-} mice with *Fgf18*^{+/-} mice. Although neither *Cfr*^{+/-} nor *Fgf18*^{+/-} mice showed any phenotype, the double heterozygous mice exhibited tail distortion after birth, suggesting genetic interaction (Fig. 5B,C). The phenotype is also strikingly similar to that of *Fgfr3*-deficient mice, which also exhibit tail distortion after birth (Deng et al., 1996). Because it has been well established that Fgf18 transmits its signal via Fgfr3c (Davidson et al., 2005), these observations further support the idea that *Cfr* is positively involved in Fgf18 signaling. Furthermore, co-immunoprecipitation assays

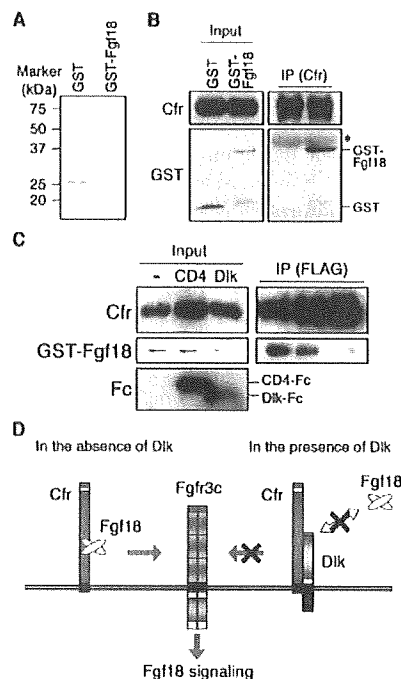


Fig. 7. The physical interaction between Cfr and Fgf18, and the effect of Dlk on that interaction. (A) Coomassie Brilliant Blue staining of GST and GST-Fgf18 purified from *E. coli*. (B) Interaction of *Cfr* with Fgf18. *Cfr*-EC was expressed in culture supernatant from COS7 cells, and GST-Fgf18 or GST was added to the supernatant. Then, *Cfr*-EC was precipitated with anti-*Cfr* serum and protein G Sepharose. GST-Fgf18, but not GST, was co-precipitated with *Cfr*-EC. *, non-specific band. (C) Interaction of *Cfr* with Fgf18 in the presence of Dlk. *Cfr*-EC together with Dlk-Fc or CD4-Fc were expressed in the culture supernatant from COS7 cells, and GST-Fgf18 was added to the supernatant. Then, FLAG-tagged *Cfr*-EC was precipitated with anti-FLAG M2 agarose. Dlk-Fc inhibited the interaction between *Cfr* and Fgf18, whereas CD4-Fc had no such effect. These results indicate that Dlk interrupts the physical interaction of *Cfr* with Fgf18. (D) A model of regulation of the Fgf18 signaling pathway by *Cfr* and Dlk. In the absence of Dlk, the extracellular domain of *Cfr* binds Fgf18 and positively regulates Fgf18 signaling. In the presence of Dlk, by contrast, Dlk binds to *Cfr* to inhibit the interaction between *Cfr* and Fgf18. Thus, the positive regulation of Fgf18 signaling by *Cfr* is disrupted by Dlk. Expression of *Cfr* and Dlk at the appropriate time modulates the strength of the signaling by Fgf18 and thereby contributes to normal developmental processes.

clearly demonstrated that *Cfr* binds Fgf18 (Fig. 7B), and Ba/F3 cells expressing Fgfr3c with or without *Cfr* provided direct evidence for the positive regulatory role of *Cfr* in the Fgf18-Fgfr3c signaling pathway (Fig. 6A). This is the first report on the physiological functions of *Cfr* and the first evidence for the existence of a novel regulatory component of the Fgf18 signaling pathway. Fgfr3c is known to be expressed in proliferating and prehypertrophic chondrocytes to control their proliferation. Co-expression of *Cfr* with Fgfr3c in prehypertrophic chondrocytes supports the idea that *Cfr* plays a role in Fgfr3c signaling in those cells (Fig. 4). Because it has been well established that deregulation of the Fgf18-Fgfr3c signaling pathway leads to achondroplasia (Horton et al., 2007), it would be intriguing to investigate whether *Cfr* is also involved in human skeletal diseases.

Because Cfr has been shown to bind Fgf1, Fgf2, Fgf3 and Fgf4 (Burrus et al., 1992; Kohl et al., 2000), it may play a role in their signaling as well. In addition, the deletion of one *Cfr* allele in *Fgf18*-deficient mice augmented the skeletal abnormality of *Fgf18*-deficient mice and the deletion of both *Cfr* alleles in *Fgf18*-deficient mice resulted in a much more severe phenotype (Fig. 5D), suggesting that Cfr is involved in not only Fgf18 signaling but also other signaling pathways. However, as *Fgf4*-deficient mice die very early in their embryonic development (Feldman et al., 1995), and their phenotype is totally different from that of *Cfr*-deficient mice, Fgf4 is unlikely to be a physiological ligand for Cfr. By contrast, *Fgf3*-deficient mice show growth retardation and distorted tails, and some of them die perinatally similarly to *Cfr*-deficient mice, although their phenotypes are different from those of *Cfr*-deficient mice, e.g. inner ear defects in *Fgf3*-deficient mice (Mansour et al., 1993). Therefore, it is possible that Cfr contributes to Fgf3 signaling. Because *Fgf1*-deficient and *Fgf2*-deficient mice show rather mild phenotypes or no phenotype (Dono et al., 1998; Miller et al., 2000), it is hard to speculate about any possible involvement of Cfr in their signaling based on phenotypes. While there is currently no information as to the binding of Cfr to other FGFs, Cfr may contribute to signaling by some of them. In particular it would be interesting to investigate whether Cfr contributes to signaling by the FGFs that play a role in skeletal development, such as Fgf9 (Hung et al., 2007).

We identified Cfr as a Dlk-binding molecule (Fig. 1). Dlk is well known as preadipocyte factor 1 (Pref-1), an inhibitor of adipogenesis (Smas and Sul, 1993). In addition to preadipocytes, Dlk has also been reported to affect *in vitro* differentiation of various cell types such as osteoblasts (Abdallah et al., 2004), hematopoietic progenitors (Moore et al., 1997), thymocytes (Kaneta et al., 2000) and B-cell progenitors (Bauer et al., 1998). However, the mechanism by which Dlk functions still remains largely unknown. To reveal its functions, attempts were made to identify Dlk-binding molecules with the yeast two-hybrid system, resulting in several candidates such as growth arrest specific gene 1 (Baladron et al., 2002; Nueda et al., 2008). Because the extracellular domain of Dlk alone exerts its biological activities (Mei et al., 2002; Ohno et al., 2001; Smas et al., 1997), we used the extracellular domain of Dlk to search for its binding partners displayed on the cell surface and identified Cfr.

Because Dlk binds to Cfr, we investigated whether Dlk has any effect on the binding between Cfr and Fgf18 and revealed that Dlk blocks the binding (Fig. 7C). If the physical interaction of Cfr with Fgf18 is necessary for Cfr to positively regulate Fgf18 signaling, Dlk is likely to abrogate the positive role of Cfr in the signaling. We noticed that the phenotypes of *Cfr*-deficient mice are similar to those of *Dlk*-transgenic mice: e.g. both mice show growth retardation throughout their life and tail distortion (Lee et al., 2003). As loss of *Cfr* and forced expression of *Dlk* resulted in similar phenotypes, it is likely that Cfr and Dlk function in opposite ways. This is consistent with the result that Dlk inhibits the physical interaction between Cfr and Fgf18. Based on these results, we propose a model for the roles of Cfr and Dlk in Fgf18 signaling (Fig. 7D): i.e. in the absence of Dlk, binding of Cfr to Fgf18 positively regulates the signaling, and Dlk blocks the interaction between Cfr and Fgf18 by binding to Cfr, interrupting the positive regulatory role of Cfr in Fgf18 signaling. If this model is correct, the levels and timing of the expression of Cfr and Dlk would modulate Fgf18 signaling, fulfilling normal developmental processes. Recently, it was reported that Dlk regulates mesenchymal cell fate, such as chondrocyte, osteoblast and adipocyte lineages, through Sox9 (Wang and Sul,

2009). It is well known that Fgf18 also regulates chondrocyte and osteoblast development. Therefore, it is tempting to speculate that Fgf18 signaling is involved in the mechanism of cell-fate determination.

Recent studies have revealed that the FGF signaling via FGFRs is finely tuned by FGF-binding molecules other than FGFRs, such as HSPGs, Klothos and Fgfr11 (Kurosu et al., 2007; Kurosu et al., 2006; Spivak-Kroizman et al., 1994; Suzuki et al., 2008b; Trueb et al., 2003; Urakawa et al., 2006). These molecules significantly contribute to normal developmental processes mediated by the FGF signaling pathways. This study has revealed, for the first time, *in vivo* roles of another FGF-binding molecule, Cfr, and unexpected links among Dlk, Cfr and FGF signaling, and provides evidence for the presence of a novel regulatory mechanism of the FGF signaling pathway.

Acknowledgements

We thank Drs T. Itoh, N. Tanimizu and E. Saijou, and Mr S. Saito for helpful discussions and technical assistance. We thank Ms K. Suzuki for preparing anti-Dlk antibody. We are also grateful to Drs A. Nakano, H. Okae, Y. Iwakura (the University of Tokyo), N. Mizushima, Y. Ogawa (Tokyo Medical and Dental University), J. Kanno, S. Kitajima, Y. Takahashi (National Institute of Health Science), N. Ohbayashi (Tohoku University) and T. Okubo (Okazaki Institute for Integrative Biosciences) for helpful advice and support. We thank Drs D. M. Ornitz (Washington University) and N. Iah (Kyoto University) for providing us with cDNAs of FGFRs and Fgf18, respectively. Y.M. is a recipient of a JSPS Research Fellowship for Young Scientists.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/137/1/159/DC1>

References

- Abdallah, B. M., Jensen, C. H., Gutierrez, G., Leslie, R. G., Jensen, T. G. and Kassem, M. (2004). Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 841-852.
- Baertschi, S., Zhuang, L. and Trueb, B. (2007). Mice with a targeted disruption of the Fgfr11 gene die at birth due to alterations in the diaphragm. *FEBS J.* **274**, 6241-6253.
- Baladron, V., Ruiz-Hidalgo, M. J., Bonvini, E., Gubina, E., Notario, V. and Laborda, J. (2002). The EGF-like homeotic protein dlk affects cell growth and interacts with growth-modulating molecules in the yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 193-204.
- Bauer, S. R., Ruiz-Hidalgo, M. J., Rudikoff, E. K., Goldstein, J. and Laborda, J. (1998). Modulated expression of the epidermal growth factor-like homeotic protein dlk influences stromal-cell-pre-B-cell interactions, stromal cell adipogenesis, and pre-B-cell interleukin-7 requirements. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5247-5255.
- Burrus, L. W. and Olwin, B. B. (1989). Isolation of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factor from embryonic chick. *J. Biol. Chem.* **264**, 18647-18653.
- Burrus, L. W., Zuber, M. E., Lueddecke, B. A. and Olwin, B. B. (1992). Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5600-5609.
- Davidson, D., Blanc, A., Filion, D., Wang, H., Plut, P., Pfeffer, G., Buschmann, M. D. and Henderson, J. E. (2005). Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 20509-20515.
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. and Leder, P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* **84**, 911-921.
- Dono, R., Texido, G., Dussel, R., Ehmke, H. and Zeller, R. (1998). Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* **17**, 4213-4225.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I. and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 139-149.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., DeChiara, T. M. and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* **267**, 246-249.
- Haque, T., Nakada, S. and Hamdy, R. C. (2007). A review of FGF18: its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. *Histol. Histopathol.* **22**, 97-105.
- Horton, W. A., Hall, J. G. and Hecht, J. T. (2007). Achondroplasia. *Lancet* **370**, 162-172.

- Hung, I. H., Yu, K., Lavine, K. J. and Ornitz, D. M. (2007). FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev. Biol.* **307**, 300-313.
- Kaneta, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A. G. and Takahama, Y. (2000). A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J. Immunol.* **164**, 256-264.
- Kohl, R., Antoine, M., Olwin, B. B., Dickson, C. and Kiefer, P. (2000). Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor alters secretion and intracellular routing of fibroblast growth factor 3. *J. Biol. Chem.* **275**, 15741-15748.
- Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Baum, M. G., Schiavi, S., Hu, M. C., Moe, O. W. et al. (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J. Biol. Chem.* **281**, 6120-6123.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K. P., Klier, S. A. and Kuro-o, M. (2007). Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* **282**, 26687-26695.
- Lee, K., Villena, J. A., Moon, Y. S., Kim, K. H., Lee, S., Kang, C. and Sul, H. S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.* **111**, 453-461.
- Liu, Z., Xu, J., Colvin, J. S. and Ornitz, D. M. (2002). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* **16**, 859-869.
- Mansour, S. L., Goddard, J. M. and Capocchi, M. R. (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development* **117**, 13-28.
- Mei, B., Zhao, L., Chen, L. and Sul, H. S. (2002). Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem. J.* **364**, 137-144.
- Miller, D. L., Ortega, S., Bashayan, O., Basch, R. and Basilico, C. (2000). Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2260-2268.
- Miyaoka, Y., Tanaka, M., Naiki, T. and Miyajima, A. (2006). Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 37913-37920.
- Moon, Y. S., Smas, C. M., Lee, K., Villena, J. A., Kim, K. H., Yun, E. J. and Sul, H. S. (2002). Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5585-5592.
- Moore, K. A., Pytowski, B., Witte, L., Hicklin, D. and Lemischka, I. R. (1997). Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4011-4016.
- Nueda, M. L., Garcia-Ramirez, J. J., Laborda, J. and Baladron, V. (2008). dlk1 specifically interacts with insulin-like growth factor binding protein 1 to modulate adipogenesis of 3T3-L1 cells. *J. Mol. Biol.* **379**, 428-442.
- Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N. and Takada, S. (2002). FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* **16**, 870-879.
- Ohno, N., Izawa, A., Hattori, M., Kageyama, R. and Sudo, T. (2001). dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-independent effect. *Stem Cells* **19**, 71-79.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, 15292-15297.
- Raghuveer, R., Ruiz-Hidalgo, M., Jia, Y., Ettinger, R., Rudikoff, E., Riggins, P., Farnsworth, R., Tesfaye, A., Laborda, J. and Bauer, S. R. (2008). Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev.* **17**, 495-507.
- Smas, C. M. and Sul, H. S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725-734.
- Smas, C. M., Chen, L. and Sul, H. S. (1997). Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 977-988.
- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M. A., Dikic, I., Ladbury, J. E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. and Lax, I. (1994). Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* **79**, 1015-1024.
- Suzuki, K., Tanaka, M., Watanabe, N., Saito, S., Nonaka, H. and Miyajima, A. (2008a). p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology* **135**, 270-281 e3.
- Suzuki, M., Uehara, Y., Motomura-Matsuzaka, K., Oki, J., Koyama, Y., Kimura, M., Asada, M., Komi-Kuramochi, A., Oka, S. and Imamura, T. (2008b). betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1006-1014.
- Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T. and Miyajima, A. (2003). Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J. Cell Sci.* **116**, 1775-1786.
- Tanimizu, N., Saito, H., Mostov, K. and Miyajima, A. (2004). Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk+ hepatoblasts. *J. Cell Sci.* **117**, 6425-6434.
- Trueb, B., Zhuang, L., Taeschler, S. and Wiedemann, M. (2003). Characterization of FGFR1, a novel fibroblast growth factor (FGF) receptor preferentially expressed in skeletal tissues. *J. Biol. Chem.* **278**, 33857-33865.
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S. and Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* **444**, 770-774.
- Wang, Y. and Sul, H. S. (2009). Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab.* **9**, 287-302.
- Wiedemann, M. and Trueb, B. (2000). Characterization of a novel protein (FGFR1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics* **69**, 275-279.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. and Ornitz, D. M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841-848.
- Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umehori, H., Mohammadi, M. and Ornitz, D. M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* **281**, 15694-15700.
- Zhou, Z., Zuber, M. E., Burrus, L. W. and Olwin, B. B. (1997). Identification and characterization of a fibroblast growth factor (FGF) binding domain in the cysteine-rich FGF receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 5167-5174.

肝前駆細胞から肝細胞，胆管上皮細胞への分化

田 中 稔 宮 島 篤

「肝胆膵」 第59巻 第4号 別刷

(2009年10月)

アークメディア

肝前駆細胞から肝細胞、胆管上皮細胞への分化

田中 稔* 宮島 篤*

索引用語：肝芽細胞，肝幹細胞，オーバル細胞，細胞間相互作用

1 はじめに

iPS細胞の作製技術は、器官・組織の再生医療、疾患の原因究明や治療薬の探索などへの応用が大いに期待される画期的なものであり、すでにiPS細胞から心筋や角膜などを誘導し再生医療に利用する試みなど盛んに行われている。しかし、肝臓や膵臓など複数の異なる細胞種からなる臓器では、その形成および恒常性維持には各種構成細胞による相互作用が重要であり、iPS細胞から機能的な細胞を誘導するためには解決すべき多くの課題がある。肝機能の大部分を担うのは肝実質細胞(肝細胞)であるが、それ以外の非実質細胞が存在して初めて肝臓はその機能を恒常的に維持できる。iPS細胞や組織幹細胞などの未分化な細胞集団から効率よく機能細胞へと分化させるためには、実際の発生過程に倣って分化誘導することが有効と考えられる。そのため、肝臓の発生機構をよく理解することが必要となるが、実質細胞のみならず非実質細胞も視野に入れた理解が重要と考えられ

る。

本稿では、マウスの肝細胞、胆管上皮細胞が分化・成熟していく過程について、特に細胞外の液性因子や膜タンパク質を介した細胞間相互作用による制御機構に重点を置き、われわれがこれまで行ってきた研究結果を交え概説する。また、最近明らかとなった成体の肝幹/前駆細胞に関する知見についても紹介する。

2 細胞表面マーカー分子による肝芽細胞の同定

肝臓の発生は、心臓原基に近接する前腸内胚葉上皮の一部が肥厚・突出することに始まり、横中隔間充織に向かって浸潤した細胞が肝芽を形成する(図1)。肝臓は実質細胞である肝細胞以外に、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、肝星細胞、血液細胞などの非実質細胞と呼ばれるさまざまな細胞群によって構成されている。そのため、発生過程における増殖や分化は、さまざまな細胞群が産生するサイトカインなどの液性因子や細胞膜タンパク質を

Minoru TANAKA *et al*: Mechanisms of differentiation of liver progenitor cells into hepatocytes and cholangiocytes

*東京大学分子細胞生物学研究所 [〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1]

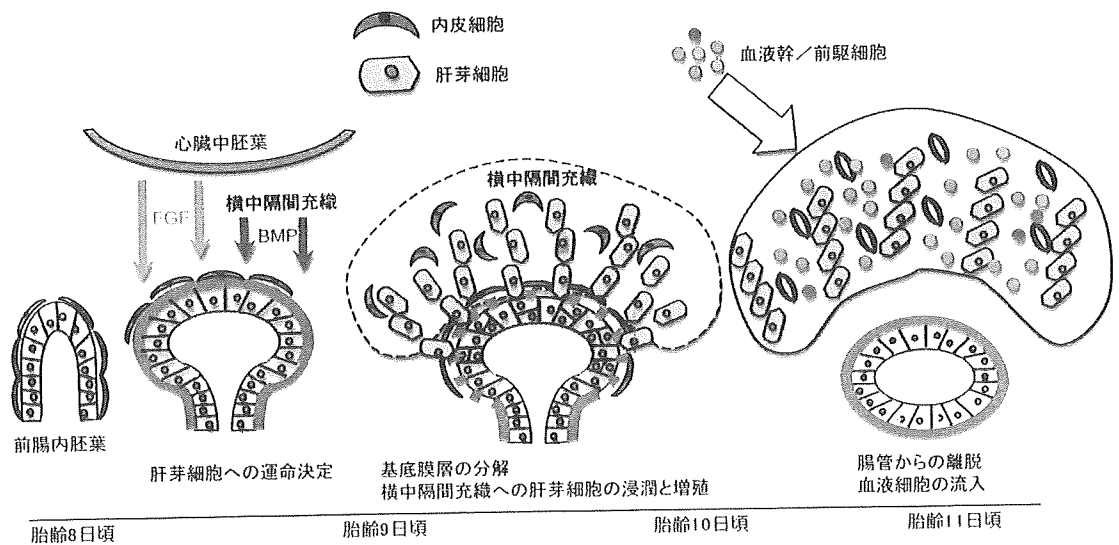


図1 肝発生に関わる細胞群

マウスでは胎齢8日頃に前腸内胚葉細胞は心臓中胚葉からのFGFシグナルや横中隔間充織からのBMPシグナルを受け、肝芽細胞へと運命決定される。その後、肝芽細胞を取り囲む基底膜が分解され、肝芽細胞は横中隔間充織へと浸潤し増殖しながら肝細胞索を形成するが、この過程には肝芽に隣接する内皮細胞が重要な役割を担う。やがて、肝臓は腸管から分離し、大動脈・生殖隆起・中腎(AGM)領域や胎盤から流入してきた血液細胞を増やすための造血器として機能する。

介した細胞間相互作用、細胞-細胞外基質相互作用などにより制御されていると考えられる。例えば、前腸内胚葉上皮の肝芽への分化には心臓中胚葉からのFGFシグナルや横中隔間充織からのBMPシグナルが重要とされている^{1,2)}。また、内皮細胞に発生異常のある *flk1* KO マウスの解析から、肝芽細胞の増殖や横中隔間充織への浸潤には管腔形成する以前の内皮細胞が重要な役割を担うことが明らかとなっている³⁾。胎児期の肝臓は成体肝臓で見られるような代謝能はほとんどなく、大静脈・生殖隆起・中腎(AGM)領域や胎盤より肝臓に移ってきた血液幹/前駆細胞を増やすための造血器として機能する。増殖した血液細胞もまた、後述するようにサイトカインなどを産生することで、肝前駆細胞における代謝酵素等の遺伝子発現を誘導し、代謝器官として分化・成熟するために寄与する。このように、肝臓は肝芽の発生から、造血器官

としての胎児期を経て、多くの代謝機能を獲得する成体期に至るまで劇的に変化する臓器である。

肝発生において、肝細胞と胆管上皮細胞は肝芽細胞と呼ばれる共通前駆細胞から分化してくることが知られている(図2)。肝芽細胞は旺盛な増殖能と二分化能を有することから胎児期の肝幹/前駆細胞であると考えられている。血液学が細胞表面マーカー分子を用いて血液幹/前駆細胞を分類することで発展してきたように、肝臓学の分野においても、マーカー分子を用いて肝芽細胞を分離しようとする試みがなされてきた。近年、細胞表面タンパク質をマーカー分子としたセルソーターによる細胞分離や *in vitro* 培養法の開発により、胎児期の肝芽細胞や成体期の肝幹/前駆細胞の性状が明らかになりつつある。Suzukiらはセルソーターを用いたクローナルな解析とH-CFU-C (hepatic colony-forming

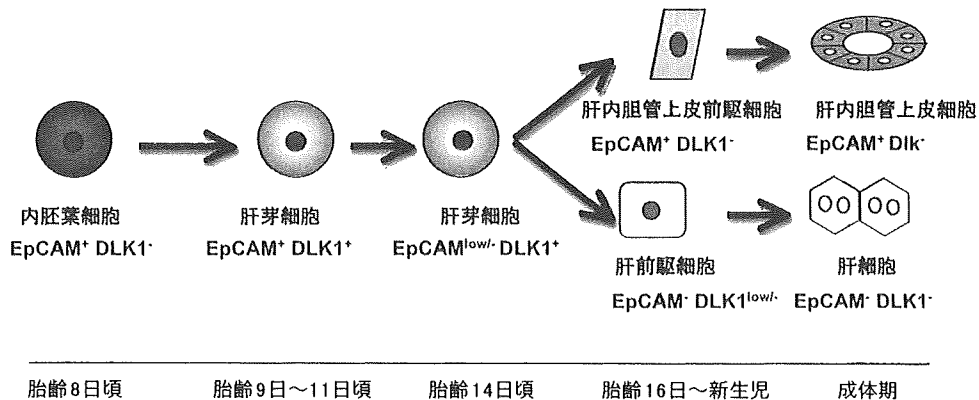


図2 肝発生過程における肝芽細胞の分化

肝芽細胞は肝細胞と胆管上皮細胞へと分化する。EpCAM+DLK1-前腸内胚葉細胞はEpCAM+DLK1+の肝芽細胞へと分化し、EpCAM^{low}-DLK1+肝芽細胞を経て、最終的にEpCAM+DLK1-胆管上皮細胞またはEpCAM-DLK1-肝細胞へと分化、成熟する。

unit in culture) と呼ばれる *in vitro* でのコロニー形成能を指標として、胎齢13.5日のマウス胎仔肝臓の非血球画分(CD45-, TER119-)のうち、CD49f (Integrin $\alpha 6$)とCD29 (Integrin $\beta 1$)を発現し、c-kitを発現しない細胞分画(c-kit- CD49f+ CD29+ CD45- TER119-)に、高い増殖能と肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有する肝芽細胞が含まれることを示した⁴⁾。一方、Kubotaらは胎齢13日のラット胎仔肝臓からRT1A⁻ OX18^{low} ICAM-1⁺細胞を単離し、その中に肝芽細胞が含まれることを報告している⁵⁾。われわれも胎齢14.5日のマウス肝臓からDelta-like 1 homolog (DLK1)に対する抗体を用いて細胞分離を行い、DLK1が肝芽細胞のマーカー分子であることを示した⁶⁾。さらに近年、Faustoらはヒト胎児肝臓から樹立した多分化性前駆細胞ではEpithelial cell adhesion molecule (EpCAM)が発現することを報告している⁷⁾。また、Reidらはヒト胎児肝臓のEpCAM⁺細胞のうち、約95%が肝芽細胞であることを報告している⁸⁾。最近、われわれはマウスにおいては、EpCAMの発現は肝芽が形成される肝発生初期から胎齢11日頃までのDLK1⁺肝芽細胞で

は認められるものの、その後、急速にその発現は低下し、胎齢16日頃の胆管上皮前駆細胞で再び強く発現してくるを見出している(図2, 図3)⁹⁾。胎齢14日頃のマウス肝芽細胞では、ほとんどEpCAMは発現していないことから、ヒトとマウスの肝芽細胞ではマーカー分子の発現時期や発現様式が幾分か異なるものと考えられる。これと同様に、サイトケラチン(CK) 19はヒト肝芽細胞で発現しているが、マウスやラットの肝芽細胞ではほとんど発現は見られない^{10, 11)}。CK19もEpCAMも成体肝臓では肝細胞には発現せず、胆管上皮細胞に共通して発現する分子であることは、ヒトとマウスの肝芽細胞の性状の違いを知る上でも興味深い点である。

3 肝芽細胞の胆管上皮細胞への分化

肝細胞で産生される胆汁は肝細胞間に形成される毛細胆管を通り、門脈周囲に存在する肝内胆管から肝外胆管を経て、十二指腸へと輸送される。肝内胆管を形成する上皮細胞は、前述したように肝芽細胞より分化してくるが、胎生後期に門脈に近接する肝芽細胞が胆管上皮細胞系譜への運命決定を受け、duc-

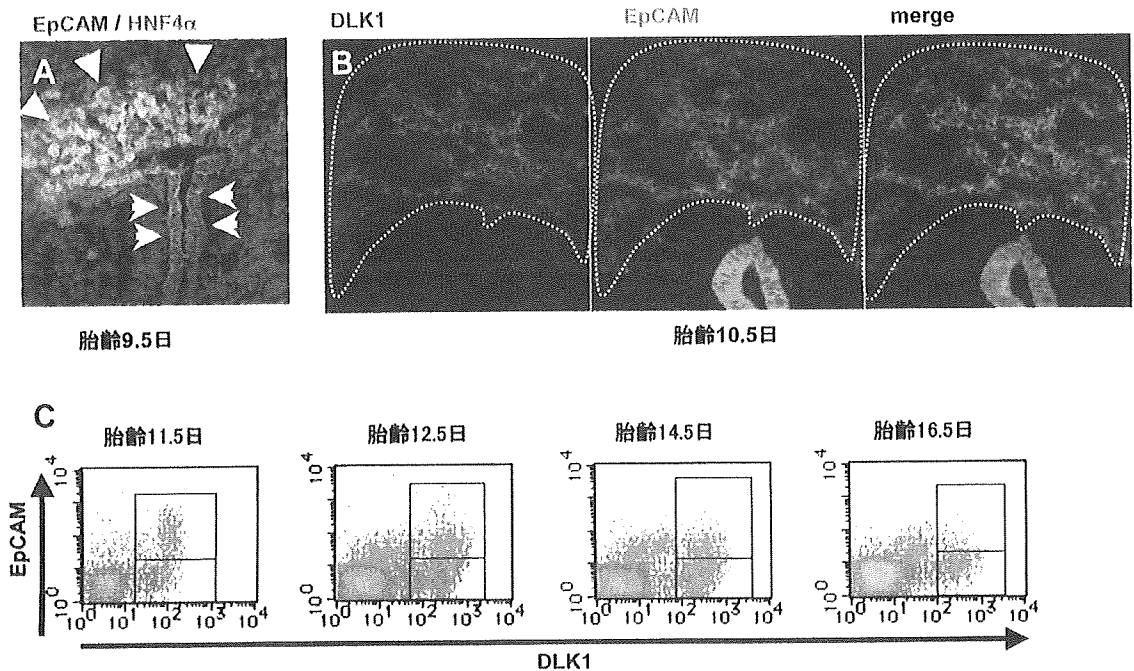


図3 肝芽細胞におけるEpCAMとDLK1の発現

- A: 胎齢9.5日の肝芽におけるEpCAMとHNF4 α の免疫組織染色。HNF4 α 陰性の前腸内胚葉細胞(矢印)と肝芽細胞へと運命決定されたHNF4 α 陽性細胞(矢頭)の双方でEpCAMは発現している。
- B: 胎齢10.5日の肝原基におけるEpCAMとDLK1の免疫組織染色。肝細胞索を形成しながら増殖する肝芽細胞(点線部)ではEpCAMとDLK1が共発現している。
- C: 胎齢11.5日以降の肝臓細胞のフローサイトメトリー解析。胎齢11.5日肝臓ではDLK1+肝芽細胞にEpCAMの強い発現が認められるが、発生が進むにつれてその発現は急速に減少する。

tal plateと呼ばれる細胞層を形成した後、やがて管腔構造を形成する^{12, 13)}(図4)。この門脈周囲での胆管上皮細胞への分化に関わるシグナルについては、肝内胆管形成に異常を来たす遺伝子変異マウスの解析からいくつか明らかとなっている。LemaigreらはOnecut transcription factorであるHNF6とOC-2のダブルノックアウトマウスにおいて、胎齢15.5日の肝臓ではすべての肝芽細胞が肝芽/肝前駆細胞と胆管上皮細胞のマーカーを共発現するHybrid cellへと分化していることを見出した。さらに、activin/TGF β シグナルをモニターできるレポーターマウス(EGFPの上流に12個のSmad結合部位を導入したトランスジェニックマウス)とこのマウスとを交配

することにより、野生型マウスではductal plateで強いactivin/TGF β シグナルが認められ、門脈域から実質領域に離れるに従いシグナルが低下する勾配を形成しているのに対し、ダブルノックアウトマウスでは実質領域にまでシグナルが広がっていることを報告している¹⁴⁾。また、胎齢12.5日肝臓のexplantを用いた培養系において、activinやTGF β が胆管マーカーであるggt4やintegrin β 4の発現を誘導し、胆管特異的サイトケラチンの発現を濃度勾配様に誘導したことから、activin/TGF β シグナルが肝芽細胞の胆管上皮細胞への運命決定に必要であると結論づけている。

一方、ヒトの常染色体優性疾患であるAl-

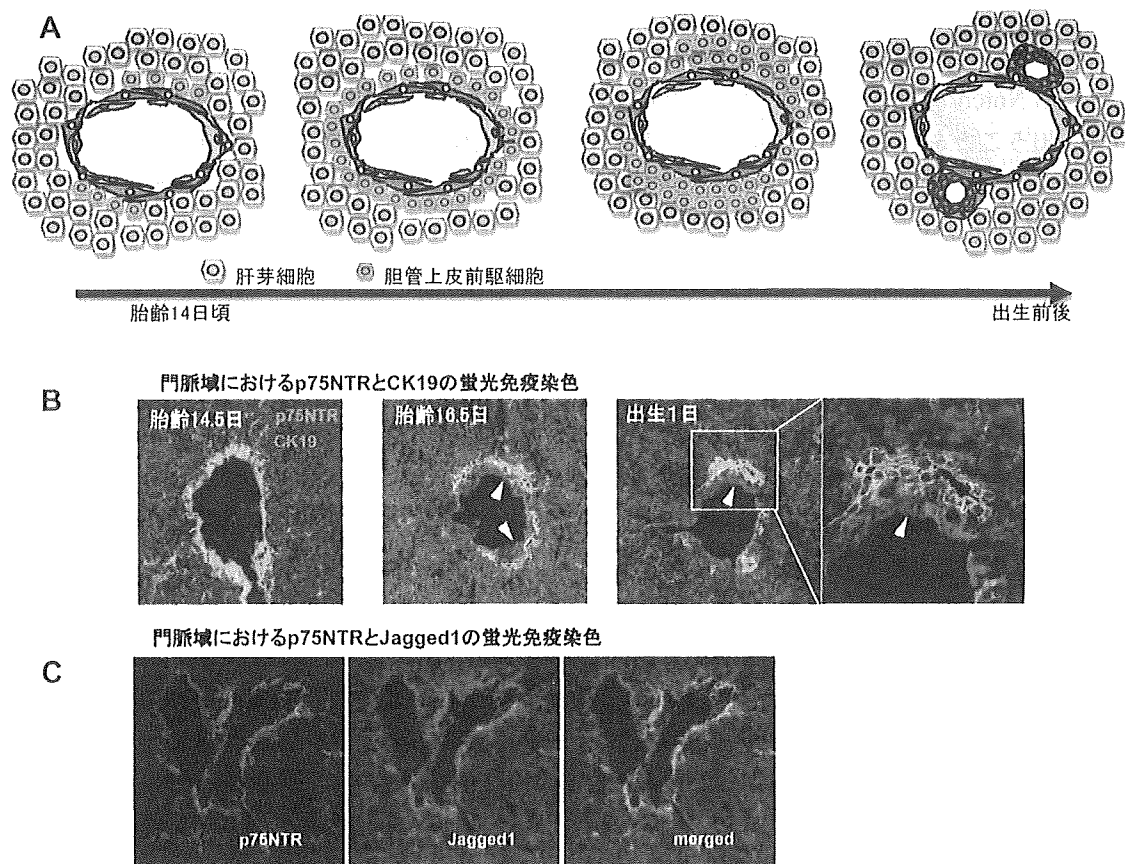


図4 肝発生過程における胆管の形成

- A: 肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化モデル。門脈域では胎齢14日以降に肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化が誘導され、ductal plateと呼ばれるCK19陽性の胆管上皮前駆細胞からなる細胞層が形成される。その後、ductal plateは二層となる部分が現れ、やがて管腔構造を有する胆管が構築される。
- B: 胆管形成過程におけるp75NTRとCK19の免疫組織染色。p75NTR陽性細胞(赤)とCK19陽性細胞(緑)は接して存在する(矢頭)。
- C: 門脈域線維芽細胞におけるp75NTRとJagged1の免疫組織染色

lagile syndromeは心臓、眼、骨格、腎臓の異常とともに、胆管形成不全による胆汁うっ滞を引き起こし、その原因遺伝子としてはJagged1が知られている。Jagged1はNotchのリガンドであり、マウスにおいてはJagged1のnull alleleとNotch2のhypomorphic alleleのダブルヘテロマウスが肝内胆管の形成不全を含むAllagile syndromeに特徴的な発生異常を示したことから、Notchシグナルが肝内胆管の分化に重要な役割を果たすことが示唆されていた。実際、DLK1陽性の肝芽

細胞を用いた*in vitro*培養系でNotchシグナルの活性化フォームである細胞内領域(Notch intracellular domain; NICD)を強制発現させると、胆管上皮細胞への分化が促進され、肝細胞への分化が抑制された¹⁵⁾。最近、StangerらはFoxa3プロモーターまたは α -fetoproteinエンハンサーAlbuminプロモーター制御下でCreリコンビナーゼを発現させるマウスを用いて、異なる肝発生ステージの肝芽細胞でNICDを発現させるマウスを作製して解析した結果、門脈から離れた実質細胞領域

に異所性のC19陽性の胆管様構造が形成されることを報告している¹⁶⁾。これは*in vivo*においてもNotchシグナルが胆管形成に重要な役割を担うことを強く示すものである。さらに興味深いことに、出生後にAlbumin産生細胞でNICDを誘導したマウスにおいても、同様の異所性の胆管様構造が認められている。これは出生後の分化した肝細胞もNotchシグナルの活性化により、リプログラミングのプロセスを介して、胆管細胞へと再び分化することを示唆する。Nishikawaらもラット成熟肝細胞が胆管様細胞へと直接形質転換する可能性を示しており¹⁷⁾、今後、肝障害時の線維化に伴う細胆管増生とNotchシグナルとの関連性が注目される。

肝内胆管は門脈に近接して形成されることから、肝芽細胞は門脈内皮細胞や門脈周囲の間充織細胞との細胞間相互作用により胆管上皮細胞へと分化誘導されていることが予想される。しかし、肝発生過程におけるこれらの細胞の性状についてはよく分かっていなかった。最近、われわれはマウス胎仔肝臓において、肝星細胞と門脈域線維芽細胞の前駆細胞に共通して発現するマーカー分子としてp75NTRを同定した¹⁸⁾。興味深いことに、Jagged1を発現するのはp75NTR陽性門脈域線維芽細胞であり、胆管上皮前駆細胞に隣接して存在することを明らかにした(図4)。このように、肝芽細胞から胆管上皮細胞への分化、成熟には細胞外からの複数のシグナルによって制御されていると考えられる。

4 肝芽細胞の肝細胞への分化

胎生中期以降になると、前述したように肝臓は造血器官として機能しており、流入してきた血液細胞が産生するサイトカインがパラクリン的に肝芽細胞に作用し、肝細胞への分

化・成熟を促す。われわれは、血液細胞により産生されたオンコスタチンM (OSM)が肝芽細胞の肝細胞への分化を強く誘導することを見出した¹⁹⁾。肝細胞は胎生後期から出生にかけて、G6Pase, CPS, TATなどの代謝酵素を発現するようになり、代謝器官としての機能的成熟を果たす。これらの代謝酵素をまだ発現していない胎齢14.5日の肝臓細胞を用いて*in vitro*培養系を構築し、OSMを添加すると代謝酵素の発現誘導や、グリコーゲンの蓄積、アンモニアの分解といった機能的成熟と、デスモソームなどの細胞間結合装置の発達、Adherens junctionの形成といった構造的成熟が認められた。また、OSMの細胞内シグナルのうち、このような機能的成熟にはJak/Stat3を介する経路が主に関与し、構造的成熟にはK-Ras/MAPKを介する経路が主に関与することが明らかとなっている^{20,21)}。

*in vitro*分化誘導系におけるOSMの作用に加えて、培養後期にEHSゲルを重層することにより、出生後の成熟した肝細胞にしか発現しないTryptophan-2,3-dioxygenase (Tdo2)の発現も誘導され、より一層の成熟化が進行する。EHSゲルの主成分は細胞外基質の1つであるラミニンであり、インテグリンを介した肝細胞の成熟化機構が存在することが示唆される²²⁾。また、Suzukiらも肝芽細胞が肝細胞へ分化・成熟していく過程のサイトカインと細胞外基質の必要性について、詳細に解析している²³⁾。*in vivo*においてEHSゲルに相当する役割を担う細胞は不明であるが、肝星細胞は類洞内皮細胞と肝細胞の間のDisse腔と呼ばれる部位に存在し、肝細胞と接する位置にあることや、細胞外基質の産生能を有する細胞であることから考えると、肝星細胞が肝細胞の成熟化に関与している可能性が高い。Mitakaらはラット成体肝臓に存在する

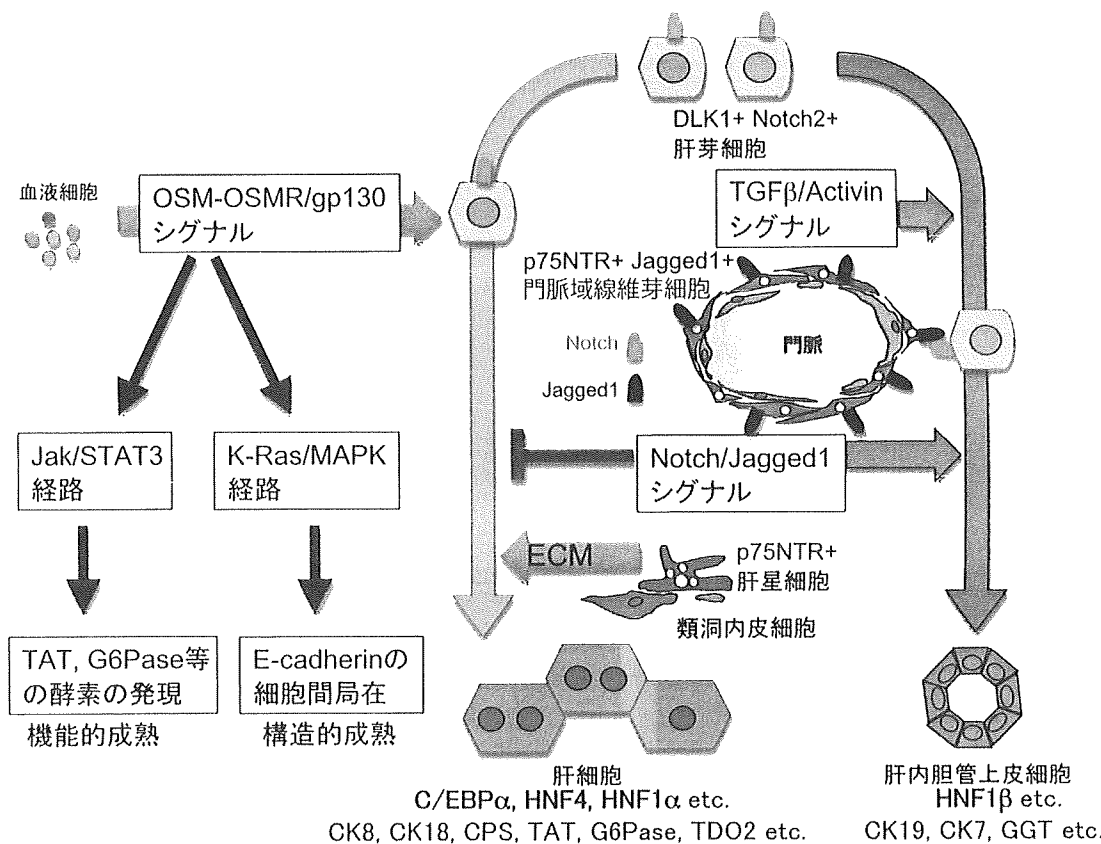


図5 肝芽細胞の胆管上皮細胞または肝細胞への分化に関する細胞間相互作用の模式図

small hepatocytesと呼ばれる未分化肝前駆細胞の *in vitro* 培養系において、肝星細胞の産生する細胞外基質が肝細胞への成熟化に重要な役割を果たすことを報告している²⁴⁾。このように、未分化な肝芽細胞の分化・成熟化に関わるサイトカインや、膜タンパク質、細胞外基質といった細胞間相互作用が明らかとなってきた(図5)。肝発生の研究から蓄積されてきた知見はES細胞や体性幹細胞など他の未分化な細胞集団から肝細胞へと *in vitro* で分化・成熟化させようとする試みへと応用されている。これまでに、FGF, BMP, HGF, OSMなどのサイトカインと細胞外基質を組み合わせることにより、マウスやヒトのES細胞や体性幹細胞から肝細胞へと分化誘

導する系が数多く報告されている²⁵⁻²⁷⁾。詳細については、落合の稿を参照されたい。

5 成体肝幹/前駆細胞の同定と分化誘導

肝臓は肝切除や障害に対して再生能の高い臓器として知られている。この肝再生は分化した肝細胞が細胞分裂することにより完了することから、成体肝臓における幹細胞の存在や意義については否定的な意見が多かった。しかしながら、ラットを用いた実験で、薬剤により通常の肝細胞分裂による再生ができない条件下で肝障害を起こした場合、オーバル細胞と呼ばれる小型の細胞が門脈域で増殖し、肝再生に寄与する可能性が示された²⁸⁾。

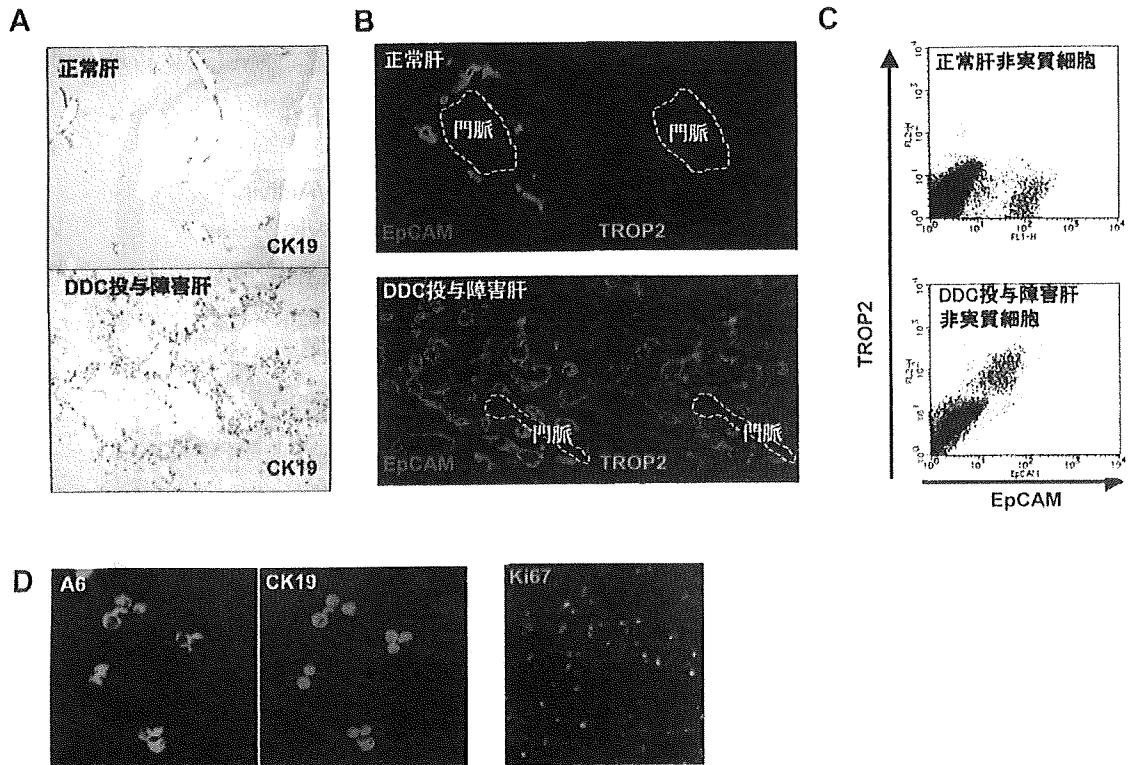


図6 マウスオーバル細胞のマーカ分子と性状解析

マウスに3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC)を投与すると肝臓でオーバル細胞が誘導される。
 A: DDC投与マウス障害肝でのオーバル細胞の誘導と抗CK19抗体によるオーバル細胞の免疫染色
 B, C: 免疫染色法(B)およびフローサイトメトリー (C)によるオーバル細胞でのEpCAMとTROP2の発現解析
 D: DDC投与肝臓より純化したEpCAM陽性細胞のサイトスピン染色。EpCAM陽性細胞はオーバル細胞マーカーであるA6やCK19陽性であり、Ki67陽性の増殖性の細胞を多く含んだ。

また、ヒトの慢性肝障害においても、同様の形態を示す細胞が出現することが知られている。オーバル細胞は胎児肝抗原であるAFPや、肝細胞と胆管上皮細胞に発現する分子を共に発現したことから、重篤な肝障害時の肝再生に寄与する肝幹/前駆細胞であると考えられるようになり、その由来や性状についてこれまで数多くの論文が発表されている。しかしながら、その多くは免疫組織化学的観察に基づくものがほとんどであり、その実体については長い間不明であった。その由来については、肝細胞索と胆管の境界領域にあたるcanal of Heringであるとする説と骨髄である

とする説が唱えられているが、最近の報告では骨髄説は否定的である。オーバル細胞についても、OV-6, c-Kit, A6などのマーカー分子を用いた細胞分離がこれまでに報告されている。最近、Dabevaらとわれわれのグループで、それぞれラットとマウスのオーバル細胞にEpCAMが発現していることを報告しており^{29,30)}、障害肝臓からのオーバル細胞の分離に成功している(図6)。Suzukiらもマウス障害肝臓から単離したCD45-TER119-CD133+細胞中に、同様の細胞が含まれることを報告している³¹⁾。オーバル細胞と胆管上皮細胞では発現する分子に共通点が多く、EpCAMや

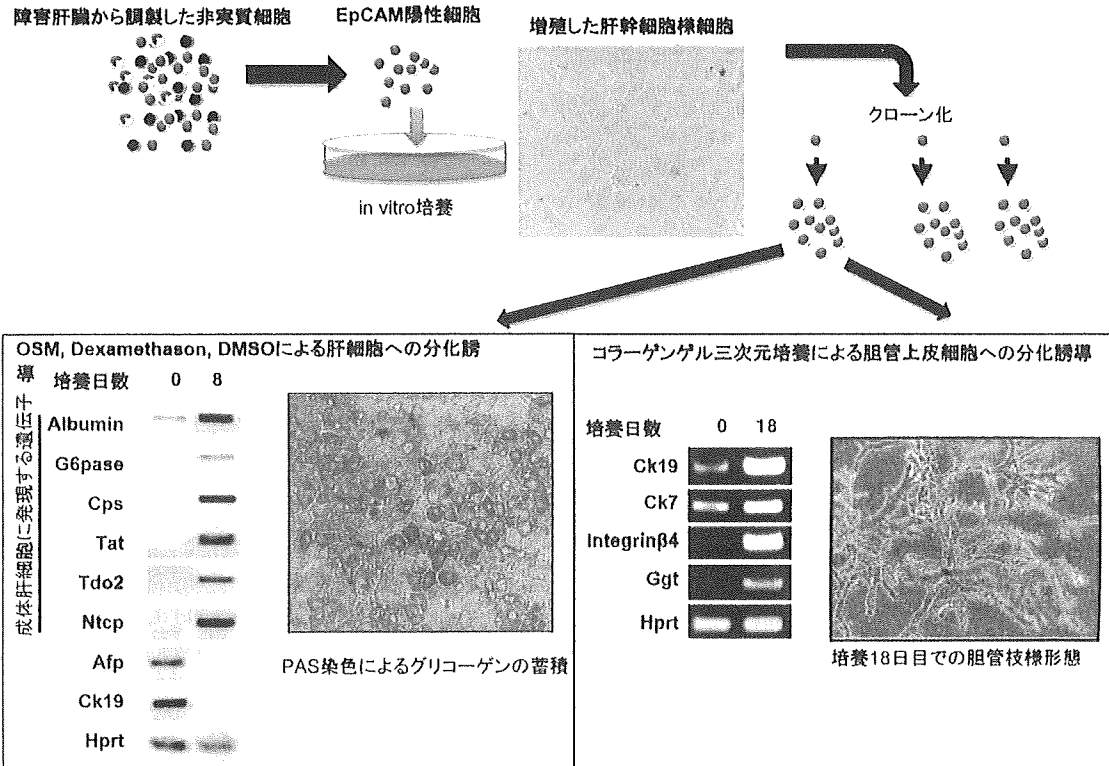


図7 DDC投与マウス障害肝から単離したEpCAM陽性細胞の*in vitro*培養と肝幹細胞様細胞の性状解析
 クローン化した細胞は培養条件によって、肝細胞または胆管上皮細胞に特徴的な遺伝子発現や形態を示す細胞へと分化した。

CD133も正常胆管細胞ですでに発現している分子である。われわれは正常胆管上皮細胞では発現しない新規オーバル細胞マーカー分子としてTROP2を報告した³⁰⁾(図6)。また、障害肝臓から単離したEpCAM陽性細胞中に、クローナルに自己複製し二分化能を有する肝幹細胞様の細胞が含まれていることも示した(図7)。一方、ヒトとマウスの正常肝臓のEpCAM陽性細胞中にも肝幹細胞の性質を示す細胞が含まれていることが報告された^{8,30)}。さらに、われわれは障害前後の肝臓からEpCAM陽性細胞を単離し、*in vitro*培養系と比較した。その結果、肝幹細胞の性質を示すコロニーの数は肝障害によって、それほど増加していないことが明らかとなった。以

上の結果から、増殖中のオーバル細胞の大部分は幹細胞というよりはむしろ増殖が制限された肝前駆細胞であると結論づけた。正常肝臓に存在する肝幹細胞がオーバル細胞の元になっているのか現在のところ不明であるが、今後、さらなるマーカー分子の同定により両者の関係が明らかとなることが期待される。最近、FoxL1の発現を指標にしたLineage-tracingにより、肝障害に伴いFoxL1を発現する細胞が門脈域より出現し、やがて肝細胞へと分化し肝再生に寄与することが報告されている³²⁾。今後、オーバル細胞や肝幹/前駆細胞のさらなる性状解析や、増殖・分化機構の解明により、さまざまな幹細胞からの効率的な肝細胞・胆管上皮細胞への分化誘導系が

開発されることが期待される。

6 おわりに

肝細胞や胆管上皮細胞の分化・成熟に重要な役割を担うC/EBPやHNFを始めとする転写因子群についてはスペースの関係で割愛したが、肝発生過程において肝芽細胞の内外で起こっている現象はこの10年ほどの間に急速に明らかになってきている。しかし、非実質細胞の発生や肝形成における機能に関しては、まだまだ不明な点が多く残されている。最近、われわれは肝臓の表面を覆う肝中皮細胞は胎生期には肝細胞増殖に関わるサイトカインを多数発現していることを見出し、肝芽細胞の増殖に寄与するという結果を得ている(論文投稿中)。今後、非実質細胞も含めた細胞間相互作用という視点から肝臓の細胞社会を俯瞰した研究を続けることで、各細胞が本来有する能力を最大限に引き出せるような分化誘導法の確立や機能維持の仕組みを明らかにしたいと考えている。このような基礎的研究を通して、肝疾患の治療や人工肝臓の開発などに貢献できるとすれば、この上ない幸せである。

文 献

- 1) Jung J, Zheng M, Goldfarb M et al : Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284 : 1998-2003, 1999
- 2) Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL et al : Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15 : 1998-2009, 2001
- 3) Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J et al : Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294 : 559-563, 2001
- 4) Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S et al : Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 156 : 173-184, 2002
- 5) Kubota H, Reid LM : Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 12132-12137, 2000
- 6) Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H et al : Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116 : 1775-1786, 2003
- 7) Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C et al : Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 9912-9917, 2006
- 8) Schmelzer E, Zhang L, Bruce A et al : Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204 : 1973-1987, 2007
- 9) Tanaka M, Okabe M, Suzuki K et al : Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech Dev* 126 : 665-676, 2009
- 10) Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N : Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 51 : 2611-2620, 1991
- 11) Stosiek P, Kasper M, Karsten U : Expression of cytokeratin 19 during human liver organogenesis. *Liver* 10 : 59-63, 1990
- 12) Lemaigre FP : Development of the biliary tract. *Mech Dev* 120 : 81-87, 2003
- 13) Tanimizu N, Miyajima A : Molecular mechanism of liver development and regeneration. *Int Rev Cytol* 259 : 1-48, 2007
- 14) Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewicz N et al : Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors *Genes Dev* 19 : 1849-1854, 2005
- 15) Tanimizu N, Miyajima A : Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci* 117 : 3165-3174, 2004
- 16) Zong Y, Panikkar A, Xu J et al : Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 136 : 1727-1739, 2009
- 17) Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H et al : Transdif-

- ferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells in vitro. *Am J Pathol* 166 : 1077-1088, 2005
- 18) Suzuki K, Tanaka M, Watanabe N et al : p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology* 135 : 270-281, 2008
 - 19) 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
 - 20) Ito Y, Matsui T, Kamiya A et al : Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 32 : 1370-1376, 2000
 - 21) Matsui T, Kinoshita T, Morikawa Y et al : K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *Embo J* 21 : 1021-1030, 2002
 - 22) Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T et al : Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology* 35 : 1351-1359, 2002
 - 23) Suzuki A, Iwama A, Miyashita H et al : Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130 : 2513-2524, 2003
 - 24) 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
 - 25) Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K et al : Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 36 : 22-29, 2002
 - 26) Yamamoto H, Quinn G, Asari A et al : Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 37 : 983-993, 2003
 - 27) Cai J, Zhao Y, Liu Y et al : Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45 : 1229-1239, 2007
 - 28) Evarts RP, Nagy P, Marsden E et al : A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8 : 1737-1740, 1987
 - 29) Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H et al : Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 47 : 636-647, 2008
 - 30) Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M et al : Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136 : 1951-1960, 2009
 - 31) Suzuki A, Sekiya S, Onishi M et al : Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48 : 1964-1978, 2008
 - 32) Sackett SD, Li Z, Hurtt R et al : Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 49 : 920-929, 2009

* * *

● 幹細胞の臨床応用

肝臓の発生・分化機構

東京大学分子細胞生物学研究所 教授

宮 島 篤

要 旨

肝臓は代謝の中心を担う生命に必須の臓器である。血液を除くと肝臓を構成する細胞種は肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、星細胞、線維芽細胞など比較的少ない。しかし、それらの発生・分化については十分理解されていない。我々は、細胞膜抗原の発現により肝臓を構成する細胞を厳密に同定・分離する方法を開発し、培養系を使って肝臓の発生・分化機構の解析を行っている。本小論ではその現状を紹介する。

はじめに

肝臓は代謝、解毒、胆汁産生、血清タンパク質産生などさまざまな機能を担う生命活動の維持に必須の臓器であるが、胎児期には主要な造血組織であり、出生前後で機能的に劇的な変貌を遂げる。また、肝臓は巨大な臓器であるが、血液を除けば、肝臓を構成する細胞種は肝細胞、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、星細胞、線維芽細胞など比較的少ない。しかし、肝臓研究では依然として実質細胞と非実質細胞という表現が使われているように、個々の細胞の性状は必ずしも十分に解明されてはいない。我々は、肝臓構成細胞を細胞膜抗原の発現により厳密に同定・分離して性状を解析することが肝臓の発生・分化機構を

キーワード：肝細胞，胆管，細胞膜抗原，モノクローナル抗体，セルソーター

理解するうえで重要であると考えて、肝臓構成細胞の分離と初代培養系の開発を手がけてきた。以下、肝臓の構成細胞の分離と初代培養系により明らかになった肝分化機構の概要を述べる。

肝 幹 細 胞

肝幹細胞は肝臓の上皮系細胞である肝細胞と胆管上皮細胞に分化する能力を持った増殖性の細胞と考えられている。胎児期の肝幹細胞と見なされている肝芽細胞は前腸上皮細胞から心臓由来の線維芽細胞増殖因子 (FGF) および横中隔間充織由来の骨形成タンパク質 (BMP) の作用により発生して、内皮細胞の助けを借りて増殖し肝芽を形成する¹⁾。我々は、初期の肝芽に発現する細胞膜タンパク質として Dlk を同定した²⁾。Dlk は上皮増殖因子 (EGF) リピートを持つ I 型細胞膜タンパク質で、ノックアウトマウスでも肝臓は形成されることから、肝臓における機能は依然として不明である³⁾。Dlk はマウスの E9.5 日の肝臓に強く発現しており、肝臓での発現は分化に伴い減少し出生後には検出されない。モノクローナル抗体を用いて分離した Dlk 陽性細胞には *in vitro* で高い増殖と肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を併せ持つ細胞が含まれており、継代培養可能な幹細胞様の細胞株を樹立することも可能である⁴⁾。

肝 細 胞 分 化

インターロイキン (IL)-6 ファミリーのサイトカイン受容体の共通サブユニットである gp130 を欠損したマウスの肝臓は tyrosine aminotransferase (TAT) の発現やグリコーゲンの蓄積が認められないことから、IL-6 ファミリーサイトカインの機能が肝臓の分化成熟には重要であると考えられる。我々は、胎児肝臓の初代培養系に IL-6 ファミリーの Oncostatin M (OSM) を加えると肝分化が強く誘導されることを見いだした⁵⁾。これにより、胎児期の未分化肝細胞を TAT, G6Pase などを発現する出生時期の肝細胞へと分化を誘導することが可能となったが、この培養系にさらに細胞外マトリックスである EHS ゲルを添加することで tryptophan oxygenase (TO) などを発現する成体肝細胞へと分化誘導することが可能となった⁶⁾。こ