

## References

- Kudo M. Contrast harmonic imaging in the diagnosis and treatment of hepatic tumors. Tokyo: Springer; 2003.
- Wen YL, Kudo M, Zheng RQ, Ding H, Zhou P, Minami Y, et al. Characterization of hepatic tumors: value of contrast-enhanced coded phase-inversion harmonic angio. *AJR Am J Roentgenol*. 2004;182:1019–26.
- von Herbay A, Vogt C, Häussinger D. Late-phase pulse-inversion sonography using the contrast agent Levovist: differentiation between benign and malignant focal lesions of the liver. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;179:1273–9.
- Inoue T, Kudo M, Watai R, Pei Z, Kawasaki T, Minami Y, et al. Differential diagnosis of nodular lesions in cirrhotic liver by post-vascular phase contrast-enhanced US with Levovist: comparison with superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. *J Gastroenterol*. 2005;40:1139–47.
- Minami Y, Kudo M, Kawasaki T, Kitano M, Chung H, Maekawa K, et al. Transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: usefulness of coded phase-inversion harmonic sonography. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180:703–8.
- Numata K, Iozaki T, Ozawa Y, Sakaguchi T, Kiba T, Kubota T, et al. Percutaneous ablation therapy guided by contrast-enhanced sonography for patients with hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180:143–9.
- Minami Y, Kudo M, Chung H, Kawasaki T, Yagyu Y, Shimono T, et al. Contrast harmonic sonography-guided radiofrequency ablation therapy versus B-mode sonography in hepatocellular carcinoma: prospective randomized controlled trial. *AJR Am J Roentgenol*. 2007;188:489–94.
- Watanabe R, Matsumura M, Chen CJ, Kaneda Y, Ishihara M, Fujimaki M. Gray-scale liver enhancement with Sonazoid (NC100100), a novel ultrasound contrast agent; detection of hepatic tumors in a rabbit model. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:1272–7.
- Hagen EK, Forsberg F, Aksnes AK, Merton DA, Liu JB, Tornos A, et al. Enhanced detection of blood flow in the normal canine prostate using an ultrasound contrast agent. *Invest Radiol*. 2000;35:118–24.
- Yao J, Teupe C, Takeuchi M, Avelar E, Sheahan M, Connolly R, et al. Quantitative 3-dimensional contrast echocardiographic determination of myocardial mass at risk and residual infarct mass after reperfusion: experimental canine studies with intravenous contrast NC100100. *J Am Soc Echocardiogr*. 2000;13:570–81.
- Yanagisawa K, Moriyasu F, Miyahara T, Yuki M, Iijima H. Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by Kupffer cells. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33:318–25.
- Watanabe R, Matsumura M, Chen CJ, Kaneda Y, Fujimaki M. Characterization of tumor imaging with microbubble-based ultrasound contrast agent, Sonazoid, in rabbit liver. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:972–7.
- Kindberg GM, Tolleshaug H, Roos N, Skotland T. Hepatic clearance of Sonazoid perfluorobutane microbubbles by Kupffer cells does not reduce the ability of liver to phagocytose or degrade albumin microspheres. *Cell Tissue Res*. 2003;312:49–54.
- Watanabe R, Matsumura M, Munemasa T, Fujimaki M, Suematsu M. Mechanism of hepatic parenchyma-specific contrast of microbubble-based contrast agent for ultrasonography: microscopic studies in rat liver. *Invest Radiol*. 2007;42:643–51.
- Tanaka M, Nakashima O, Wada Y, Kage M, Kojiro M. Pathomorphological study of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma and hyperplastic nodular lesions in the liver. *Hepatology*. 1996;24:807–12.
- Forsberg F, Piccoli CW, Liu JB, Rawool NM, Merton DA, Mitchell DG, et al. Hepatic tumor detection: MR imaging and conventional US versus pulse-inversion harmonic US of NC100100 during its reticuloendothelial system-specific phase. *Radiology*. 2002;222:824–9.
- Nakano H, Ishida Y, Hatakeyama T, Sakuraba K, Hayashi M, Sakurai O, et al. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography equipped with late Kupffer-phase image obtained by sonazoid in patients with colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*. 2008;14:3207–11.
- Hatanaka K, Kudo M, Minami Y, Ueda T, Tatsumi C, Kitai S, et al. Differential diagnosis of hepatic tumors: value of contrast-enhanced harmonic sonography using the newly developed contrast agent, Sonazoid. *Intervirology*. 2008;51(Suppl 1):61–9.
- Numata K, Morimoto M, Ogura T, Sugimori K, Takebayashi S, Okada M, et al. Ablation therapy guided by contrast-enhanced sonography with Sonazoid for hepatocellular carcinoma lesions not detected by conventional sonography. *J Ultrasound Med*. 2008;27:395–406.
- Imai Y, Murakami T, Yoshida S, Nishikawa M, Ohsawa M, Tokunaga K, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance images of hepatocellular carcinoma: correlation with histological grading. *Hepatology*. 2000;32:205–12.
- International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*. 1995;22:983–93.
- Kudo M, Hatanaka K, Chung H, Minami Y, Maekawa K. A proposal of novel treatment-assist technique for hepatocellular carcinoma in the Sonazoid-enhanced ultrasonography: value of defect re-perfusion imaging. *Acta Hepatol Jpn*. 2007;48:299–301.
- Moriyasu F. Phase III multicenter clinical trial of Sonazoid in Japan for the characterization and the detection of focal liver lesions. *Hepatology*. 2004;40(Suppl 1):707A.
- Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Ueda K, Inoue K, et al. Assessment of Kupffer cells by ferumoxides-enhanced MR imaging is beneficial for diagnosis of hepatocellular carcinoma: comparison of pathological diagnosis and perfusion patterns assessed by CT hepatic arteriography and CT angioportography. *Hepatol Res*. 2003;27:196–204.
- Imai Y, Murakami T, Hori M, Fukuda K, Kim T, Marukawa T, et al. Hypervascular hepatocellular carcinoma: combined dynamic MDCT and SPIO-enhanced MRI versus combined CTHA and CTAP. *Hepatol Res*. 2008;38:147–58.
- Kono Y, Steinbach GC, Peterson T, Schmid-Schönbein GW, Mattrey RF. Mechanism of parenchymal enhancement of the liver with a microbubble-based US contrast medium: an intravital microscopy study in rats. *Radiology*. 2002;224:253–7.
- Huppertz A, Balzer T, Blakeborough A, Breuer J, Giovagnoni A, Heinz-Peer G, et al. Improved detection of focal liver lesions at MR imaging: multicenter comparison of gadoxetic acid-enhanced MR images with intraoperative findings. *Radiology*. 2004;230:266–75.
- Kim SK, Kim SH, Lee WJ, Kim H, Seo JW, Choi D, et al. Preoperative detection of hepatocellular carcinoma: ferumoxides-enhanced versus mangafodipir trisodium-enhanced MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;179:741–50.
- Giorgio A, Ferraioli G, Tarantino L, de Stefano G, Scala V, Scarano F, et al. Contrast-enhanced sonographic appearance of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: comparison with contrast-enhanced helical CT appearance. *AJR Am J Roentgenol*. 2004;183:1319–26.

## Editorial

# Fish model leads to new findings in liver disease

See article in *Hepatology Research* 39: 633–644

**Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish**

Takashi Nakamura, Hiroshi Nishina

In liver research, rodent models have primarily been used to identify disease mechanisms, diagnostic criteria and therapies. Tissue-specific knockout systems have also recently been developed. On the other hand, small fish such as zebrafish (*Danio rerio*)<sup>1</sup> and medaka (*Oryzias latipes*) have been applied in new research models.<sup>2,3</sup> Medaka and zebrafish compare favorably to rodents as experimental animals for drug screening because medaka and zebrafish have a high reproductive rate, mature rapidly and cost little in terms of rearing space and daily maintenance due to their small size.

In a previous issue of the Journal, Nakamura *et al.* reported a comparative analysis of mice and medaka with regard to liver development findings.<sup>2</sup> In the field of liver development, mouse models were analyzed using a reverse genetic approach to identify phenotypic changes using specific gene targets.<sup>2</sup> Various genes, including *BMP4*, *Hhex*, *Xbp1*, *NF-κβ* and *c-jun*, were found to be important in the generation and differentiation of hepatoblasts, and new monoclonal antibodies have been found to be useful in monitoring lineage commitment during hepatocyte differentiation. Liv8/CD44 are particularly useful markers in understanding hepatoblast differentiation.<sup>4–6</sup>

On the other hand, medaka could be applied to forward genetic screening using N-acetyl-N-nitrosourea (ENU) treatment.<sup>2,3</sup> Previous forward ENU screening in Japan has established five groups of medaka liver mutants, while 19 medaka liver mutants have been established and their mutant genes are now being analyzed. In addition, 15 types of zebrafish liver mutants have been established.<sup>1</sup> The merit of forward

genetic screening is powerful because forward screening is an unbiased approach to identify genes essential for the process of liver development.<sup>1</sup> In zebrafish and medaka, specific gene analysis for early development through morpholine knockdown has been shown to be effective.<sup>7</sup> TILLING<sup>8</sup> and zinc finger nucleases have recently been developed to find target gene mutants in zebrafish and medaka.<sup>9</sup>

We believe that new systems for drug screening using medaka and zebrafish will greatly assist in the search for new candidate drugs. Previous research using medaka and zebrafish has focused on developmental biology, but there remains an urgent need for research concerning the mechanisms and treatment of liver disease. In Japan, the history of medaka research began with a hepatocellular carcinoma model developed in the 1980s.<sup>10</sup> Disease models such as liver tumors in zebrafish combined with ultrasonography<sup>11</sup> and a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) medaka model<sup>12</sup> have also recently been developed, and these models will be useful for drug screening.

We have proposed two drug screen methods using medaka and zebrafish. As shown in Figure 1(a), medaka and zebrafish liver mutants were used to screen new candidate compounds to reduce the deleterious effects of mutant genes in liver mutants. Embryos of liver mutants were bred on culture plates with various chemical compounds. Any specific chemical compounds that allow liver mutants to grow normally would thus be candidates to compensate for the effects of mutant genes. This drug screening system is specific for identifying candidate drugs for liver development. An alternative system is shown in Figure 1(b); wild-type and specific mutants showing liver disease,<sup>3</sup> and medaka and zebrafish with specific promoter transgenes are bred and raised on specific diets, such as high-fat, choline-deficient or N-nitrodiethylamine (DEN)-containing diets. Combination studies using liver mutants and TG

Correspondence: Shuji Terai, M.D., Ph.D., Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Minami Kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan. Email: terais@yamaguchi-u.ac.jp

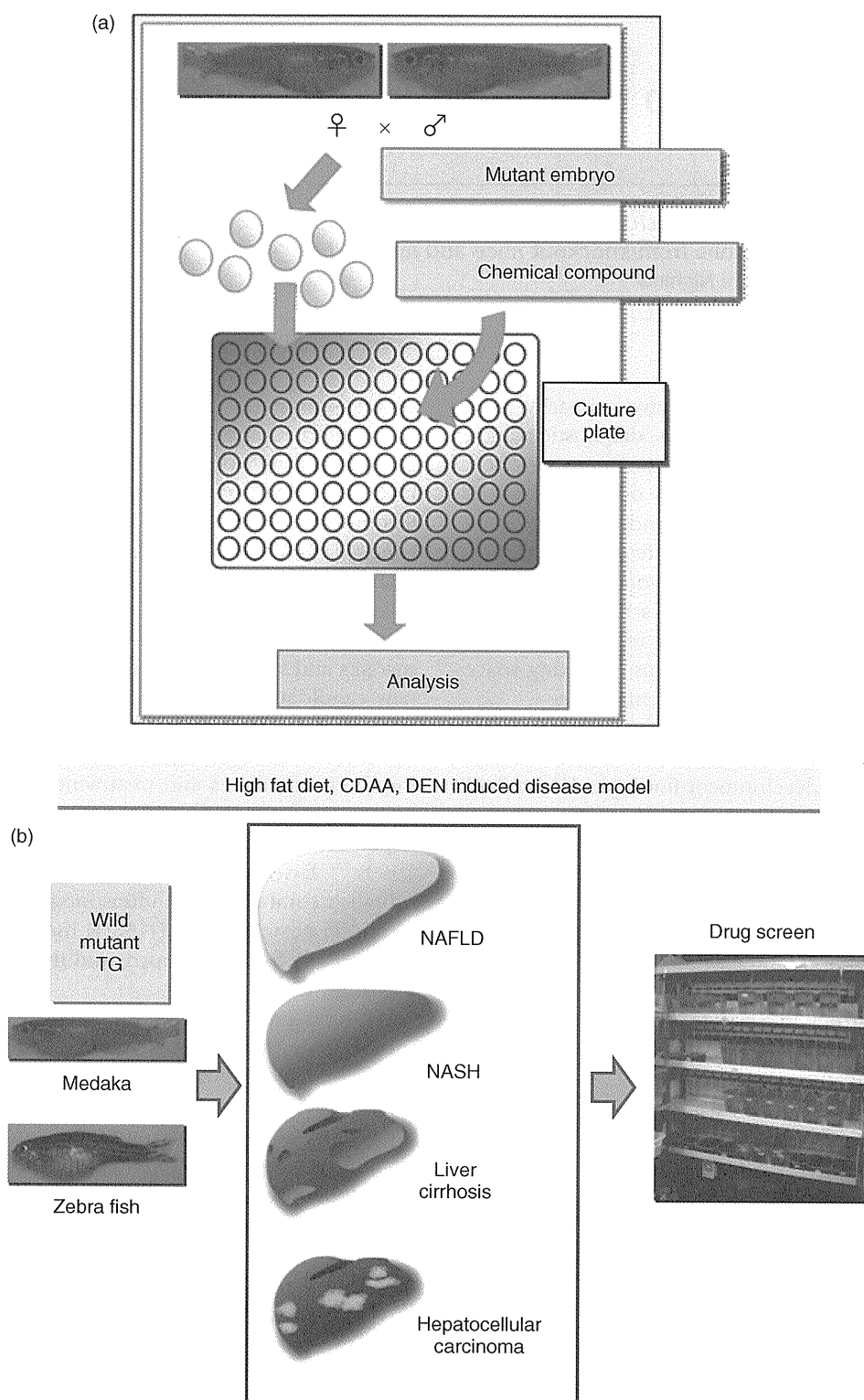


Figure 1 Drug screening using medaka and zebrafish. NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

fish with specific diets are thus useful. Using this system, candidate drugs for NASH, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma will be developed. Sequencing of the medaka and zebrafish genome has been completed and techniques for producing transgenic and knockout animals have been established.<sup>1,13,14</sup> Thus, an increasing number of genetic mechanisms can now be analyzed more efficiently.

At present, new approaches should be developed in order to incorporate the new techniques in medaka and zebrafish research. Fish models will readily allow new findings to be translated into clinical research.

Shuji Terai

Department of Gastroenterology and Hepatology,  
Yamaguchi University Graduate School of Medicine,  
Yamaguchi, Japan

## REFERENCES

- 1 Chu J, Sadler KC. New school in liver development: Lessons from zebrafish. *Hepatology* 2009; 50 (10):1–8.
- 2 Nakamura T, Nishina H. Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish. *Hepatology Res* 2009; 39:633–644.
- 3 Watanabe T, Asaka S, Kitagawa D *et al.* Mutations affecting liver development and function in Medaka, *Oryzias latipes*, screened by multiple criteria. *Mech Dev* 2004; 121: 791–802.
- 4 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-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 2002; 250: 332–347.
- 5 Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 2003; 116: 1775–1786.
- 6 Ohata S, Nawa M, Kasama T *et al.* Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 817–23.
- 7 Hogan BM, Verkade H, Lieschke GJ, Heath JK. Manipulation of gene expression during zebrafish embryonic development using transient approaches. *Methods Mol Biol* 2008; 469: 273–300.
- 8 Moens CB, Donn TM, Wolf-Saxon ER, Ma TP. Reverse genetics in zebrafish by TILLING. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008; 7:454–459.
- 9 Doyon Y, McCammon JM, Miller JC *et al.* Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 702–708.
- 10 Masahito P, Ishikawa T, Sugano H *et al.* Spontaneous hepatocellular carcinomas in lungfish. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 291–298.
- 11 Goessling W, North TE, Zon LI. Ultrasound biomicroscopy permits *in vivo* characterization of zebrafish liver tumors. *Nat Methods* 2007; 4: 551–553.
- 12 Matsumoto T, Terai S, Kuwashiro S, Fujisawa K, Hamamoto Y, Sakaida I. The development of new drug screening system using steatohepatitis medaka fish model induced by high-fat diet. *Hepatology* 2007; 46 (4):756A.
- 13 Kasahara M, Naruse K, Sasaki S *et al.* The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 2007; 447: 714–719.
- 14 Matsumoto Y, Oota H, Asaoka Y *et al.* Medaka: a promising model animal for comparative population genomics. *BMC Res Notes* 2009; 2: 88.

# 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

「肝胆臓」 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]

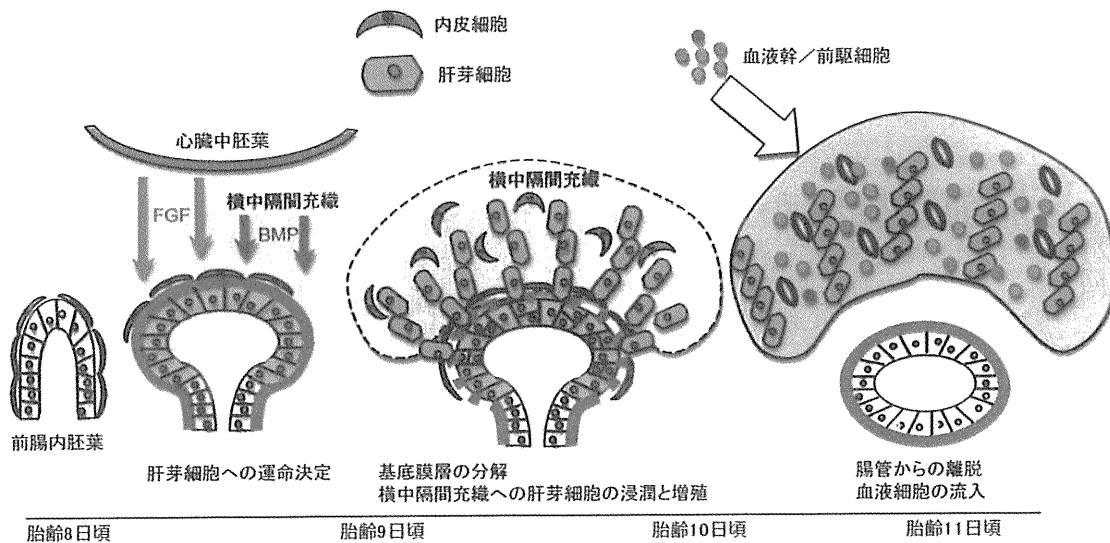


図1 肝発生に関わる細胞群

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<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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

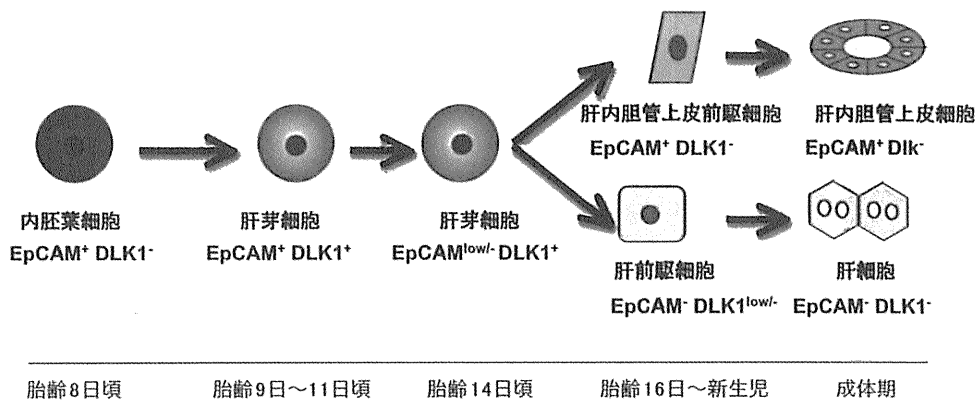


図2 肝発生過程における肝芽細胞の分化

肝芽細胞は肝細胞と胆管上皮細胞へと分化する。EpCAM<sup>+</sup>DLK1<sup>-</sup>前腸内胚葉細胞はEpCAM<sup>+</sup>DLK1<sup>+</sup>の肝芽細胞へと分化し、EpCAM<sup>low/-</sup>DLK1<sup>+</sup>肝芽細胞を経て、最終的にEpCAM<sup>+</sup>DLK1<sup>-</sup>胆管上皮細胞またはEpCAM<sup>-</sup>DLK1<sup>-</sup>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 を発現しない細胞画分(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<sup>4)</sup>。一方、Kubotaらは胎齢13日のラット胎仔肝臓からRT1A<sup>-</sup> OX18<sup>low</sup> ICAM-1<sup>+</sup>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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。また、Reidらはヒト胎児肝臓のEpCAM<sup>+</sup>細胞のうち、約95%が肝芽細胞であることを報告している<sup>8)</sup>。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<sup>+</sup>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)<sup>9)</sup>。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<sup>10, 11)</sup>。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-



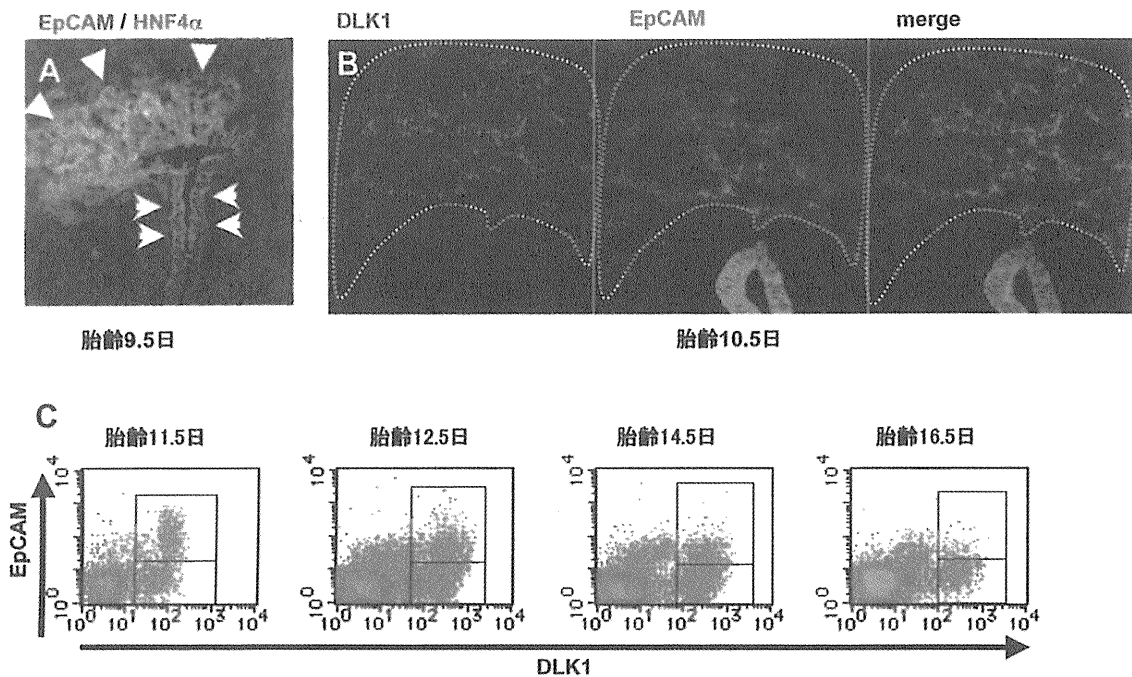


図3 肝芽細胞におけるEpCAMとDLK1の発現

- A: 胎齢9.5日の肝芽におけるEpCAMとHNF4  $\alpha$  の免疫組織染色。HNF4  $\alpha$  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  $\alpha$  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<sup>12,13)</sup>(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  $\beta$  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  $\beta$  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<sup>14)</sup>。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  $\beta$  が胆管マーカーであるggt4やintegrin  $\beta$  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  $\beta$  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AI-

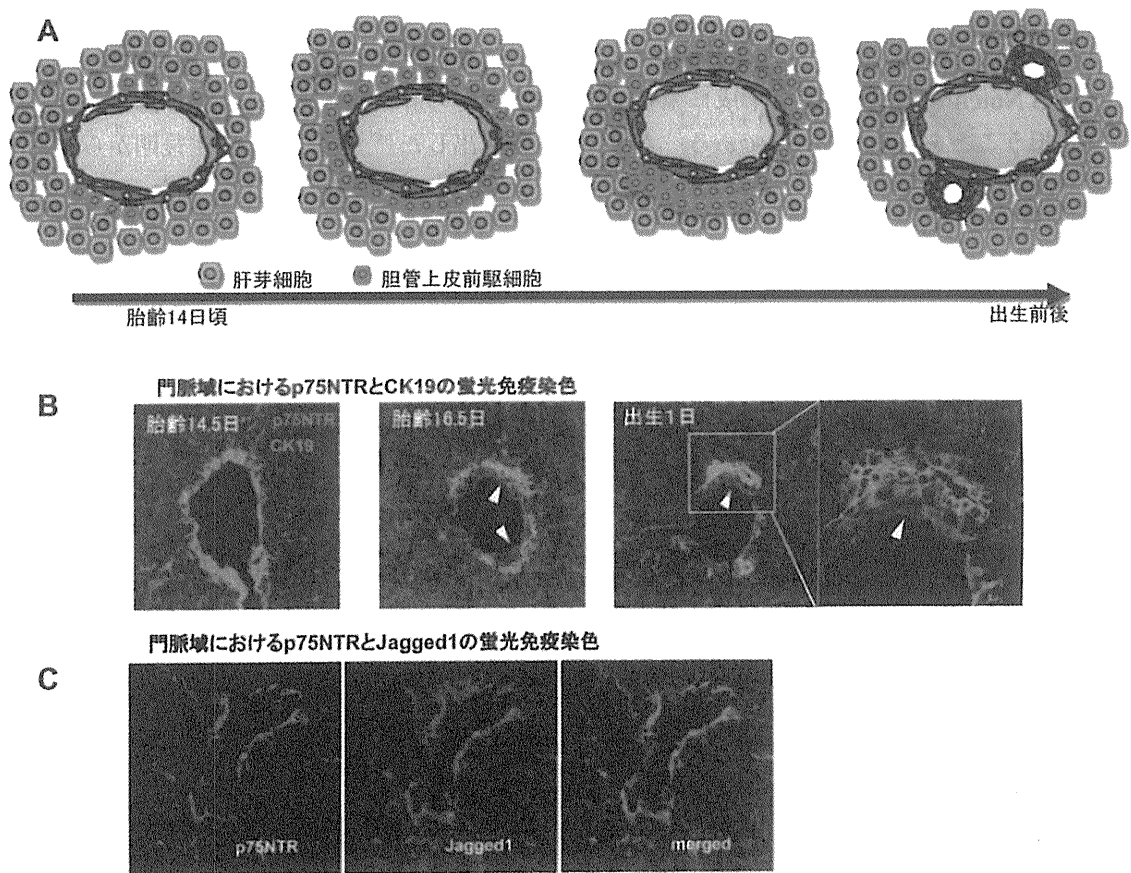


図4 肝発生過程における胆管の形成

- 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<sup>15)</sup>。最近、StangerらはFoxa3プロモーターまたは $\alpha$ -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<sup>16)</sup>。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しうることを示唆する。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<sup>17)</sup>、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<sup>18)</sup>。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<sup>19)</sup>。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<sup>20,21)</sup>。

*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<sup>22)</sup>。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<sup>23)</sup>。*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

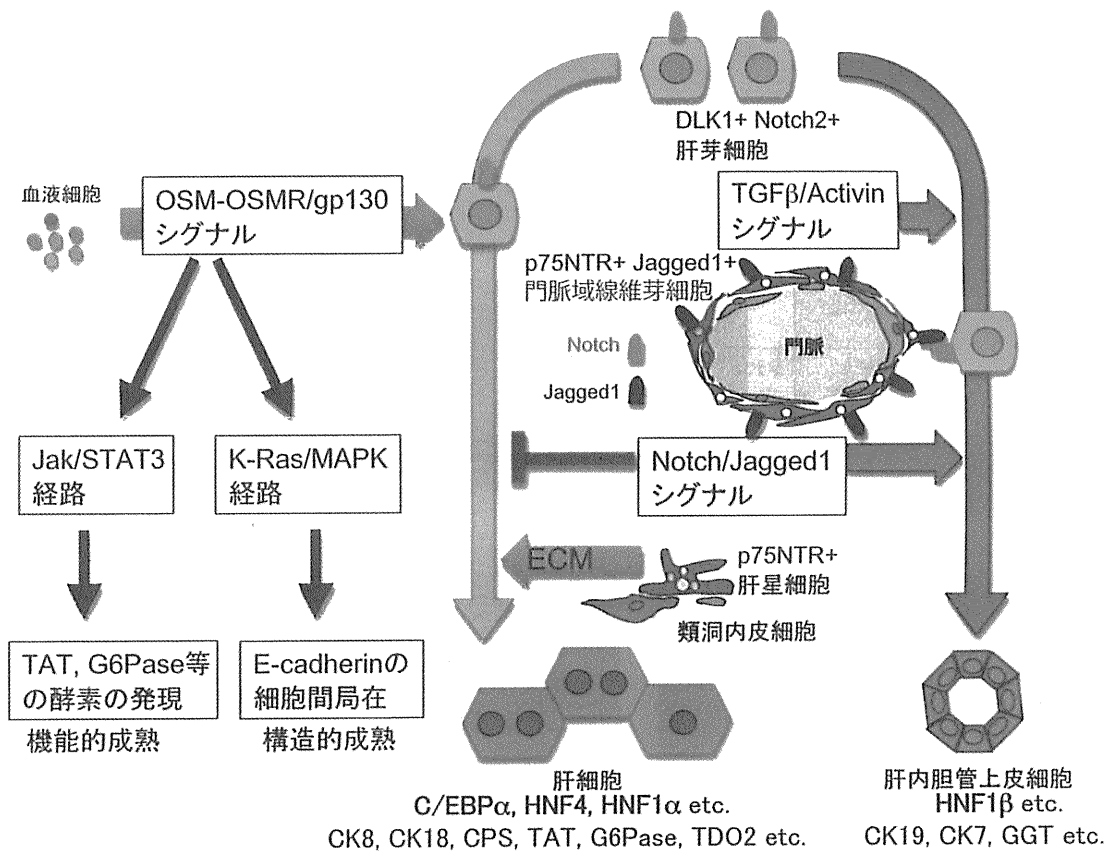


図5 肝芽細胞の胆管上皮細胞または肝細胞への分化に関与する細胞間相互作用の模式図

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<sup>24)</sup>。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<sup>25-27)</sup>。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<sup>28)</sup>。

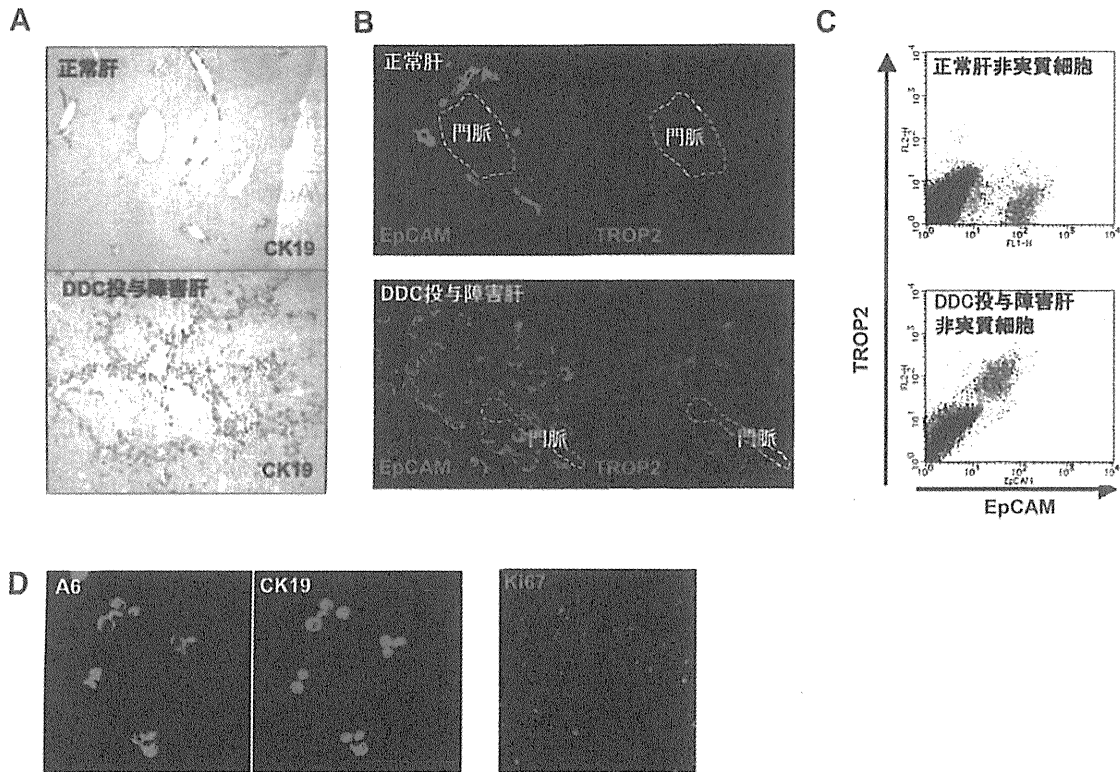


図6 マウスオーバル細胞のマーカ分子と性状解析

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<sup>29,30)</sup>、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<sup>31)</sup>。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

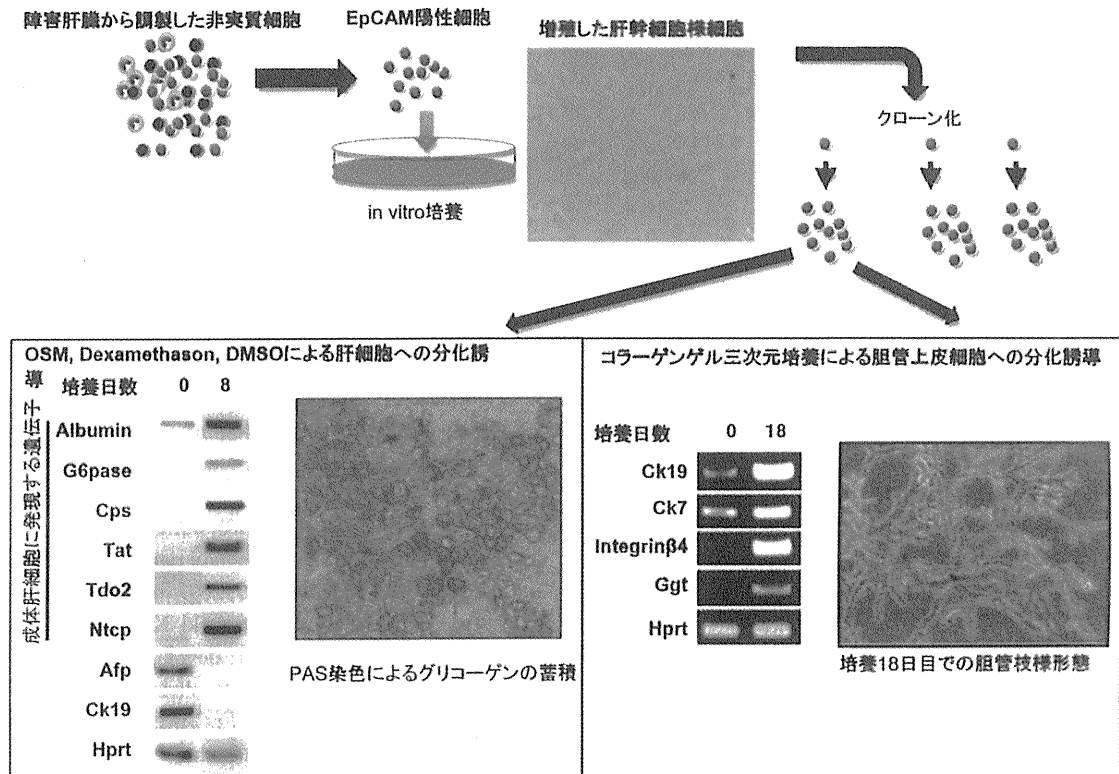


図7 DDC投与マウス障害肝から単離したEpCAM陽性細胞の*in vitro*培養と肝幹細胞様細胞の性状解析  
 クローン化した細胞は培養条件によって、肝細胞または胆管上皮細胞に特徴的な遺伝子発現や形態を示す細胞へと分化した。

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<sup>30)</sup>(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<sup>8,30)</sup>。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*培養系で比較した。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<sup>32)</sup>。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) Everts 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 : FoxI1 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。

### 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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。こ

の分化誘導系を使って、肝細胞分化の分子機構の解析が可能となり、STAT3 が TAT などの肝酵素の発現促進や D1 cyclin の発現抑制、K-Ras による細胞接着構造の形成など細胞内シグナル分子の機能解析が進んだ<sup>7-9</sup>。

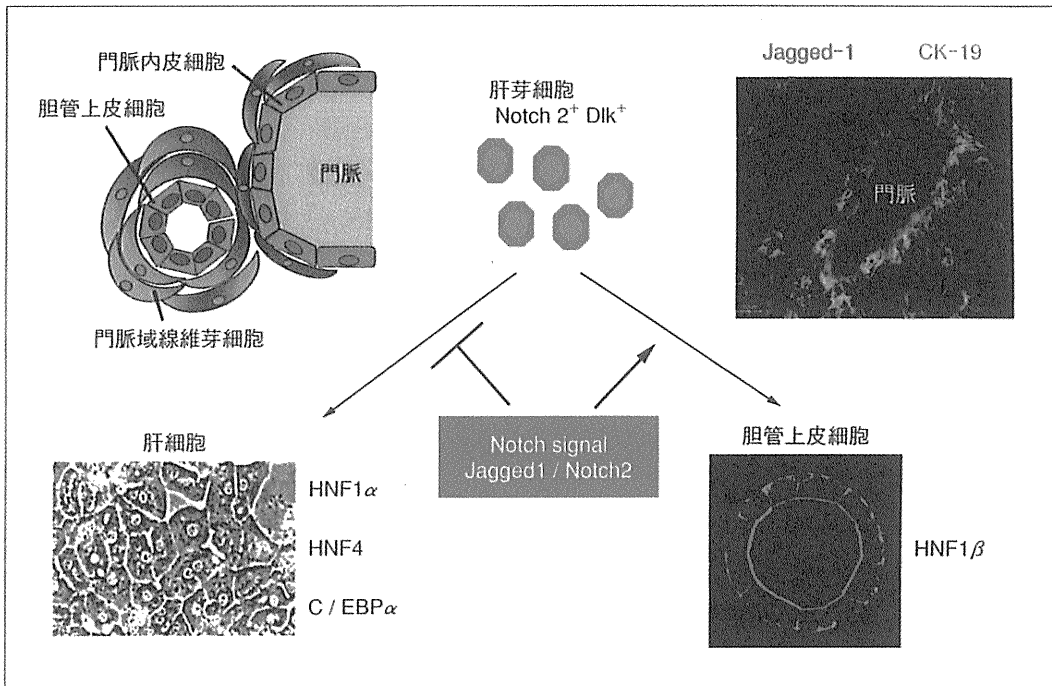
肝細胞の多くの代謝関連酵素の発現は出生時に劇的に誘導される。C/EBP $\alpha$  欠損マウスは出生後に低血糖と高アンモニア血症を伴って死亡することから、これらに関与する酵素発現に C/EBP $\alpha$  が必須である<sup>10</sup>。一方、C/EBP $\alpha$  は胎生肝臓にも発現しており、C/EBP $\alpha$  の発現のみでは代謝酵素の発現は説明されない。我々は、糖新生に必須の PEPCK の発現は C/EBP $\alpha$  と Foxo1 の協調的な作用を必要とすることが明らかにした<sup>11</sup>。Foxo1 は出生直前に発現誘導される。また、Foxo1 の活性はインスリンにより負の制御を受けているが、インスリンレベルは出生前に高く、出生により激減することから、Foxo1 はこのインスリンの変化を感知して糖新生を行うことが示唆される。

アンモニアの分解に関与する CPS1 の発現も C/EBP $\alpha$  依存的であるが、胎児肝臓には YB-1 が発現しており、それが C/EBP $\alpha$  による CPS1 の発現を制御していることも明らかになった。成体肝臓では YB-1 の発現は抑制されているが、肝障害により YB-1 発現が誘導され、それに伴い CPS1 が低下して高アンモニア血症になる<sup>12</sup>。このように、複数の転写因子の共同作用の様子が徐々に明らかにされてきた。

### 胆管形成

肝芽細胞は増殖して肝細胞と胆管上皮細胞へと分化するが、胆管は門脈周囲にのみ形成される。Allagile syndrome は肝内胆管の形成不全を伴い、その原因遺伝子が Jagged1 であることから、胆管形成への Notch シグナルの関与が示唆されていた<sup>13</sup>。肝芽細胞には Notch2 が発現しており、Jagged1 は門脈周囲に発現すること、分離した Dlk 陽性細胞に Notch の活性化型である Notch 細胞内ドメインを強制発現すると、胆管分化が促進され肝細胞分化が抑制された<sup>14</sup>。一方、門脈域の Jagged1 陽性細胞は p75NTR 陽性の間葉系細胞である<sup>15</sup>。したがって、Notch2 を発現する Dlk 陽性の肝芽細胞が Jagged1 を発

図1 肝幹細胞の分化



胎児肝臓の肝芽細胞は Dlk 陽性で Notch2 を発現している。門脈域の p75NGF 陽性の線維芽細胞は Jagged1 を発現している。肝芽細胞で Notch を活性化すると肝細胞への分化が抑制され胆管上皮細胞への分化が促進される。

HNF：肝細胞核結合因子、C/EBPα：CCAAT / エンハンサー結合タンパク質 α

現する門脈域の線維芽細胞の作用により、肝細胞への分化が抑制されて胆管上皮への分化が誘導されると考えられる (図1)。

### 類洞壁細胞

肝類洞は肝臓に特有の毛細血管系であり、類洞壁を構成する内皮細胞は基底膜を持たず有窓構造 (fenestrae) を有し、遺伝子発現のプロファイルも他の内皮細胞とは異なるユニークな内皮細胞である。この細胞には、ヒアルロン酸受容体である Lyve-1 と Stabilin-2 (Stab2) が発現するが、E9.5 日の肝芽でもすでにこれらの発現が認められる。E14 日の肝類洞内皮細胞は CD34 陽性 FcγR 陰性であるが、成体では CD34 陰性 FcγR 陽性となる。類洞内皮細胞はリンパ管や血管内皮細胞などに比べて強い endocytosis 活性を有する (図2)<sup>16)</sup>。