

論文の内容の要旨

論文題目 Functional Maturation of Fetal Liver

(サイトカインと細胞密度による肝臓の機能的成熟)

氏名 小島 伸彦

肝臓は生命維持に必須の代謝機能を行う器官であり、ウィルスの感染などによる肝不全は個体存続の危機に繋がる。このような状況では肝臓移植が効果的な治療法であり技術も確立されているが、レシピエントに対するドナーの数は圧倒的に少なく、人工肝臓の開発はこのような状況を打開する目的で始まった。現在は単離した肝細胞を非生物的な足場に接着させたものや、細胞を凝集させたスフェロイドと呼ばれる細胞塊を反応装置内に充填したいわゆるハイブリッド人工肝臓が開発され、一部は臨床応用される段階にまで至っている。しかしながら、ブタなどの成体肝から単離した肝細胞はほとんど増殖せず肝機能も急速に低下するため、増殖相と分化相を人為的に操作できる次世代型ハイブリッド人工肝臓の開発が望まれている。そのためには肝細胞の増殖・分化に関する分子機構を十分に理解する必要がある。

個体発生において、胎生期の肝細胞は肝機能をほとんど発揮せず、旺盛な増殖能を有している。出生前後に急速に肝機能が誘導され、それと同時に増殖能は低下する。このような増殖相と分化相の切り替えは発生時に限らず、成熟した肝臓でも見受けられ、肝臓の部分的な切除などで肝再生が起こる際には肝細胞は一時的に増殖相に入り、元の肝重量にまで増殖した後に再び分化相に移行する。このように生体内においては状況に合わせて増殖と分化の調節が行われることが知られているが、これまで試験管内において肝分化を誘導する系が存在せず、詳細な解析が困難であった。

本研究では、近年報告された胎生肝細胞の分化誘導系に注目して、分化誘導した肝細胞の種々の肝機能獲得の有無、ならびに未分化な状態にある胎生肝細胞を分化・成熟させる機序について解析した。胎生 14.5 日目のマウスより単離した胎生肝細胞は、同時期に肝臓に存在する血球系細胞が産出する IL-6 ファミリーのサイトカイン：オンコスタチン M (OSM) などによって新生仔様の肝細胞へと分化・成熟する。胎生肝細胞は、この異種細胞間によるパラクライン的制御によって、上皮系細胞様の形態変化、肝分化マーカーとされる糖新生やアミノ酸代謝に関する代謝酵素の発現、肝機能の一つであるグリコーゲンの蓄積といった表現型を獲得する。

まず、OSM によって分化・成熟した肝細胞が人工肝臓に求められる機能を獲得しているかどうかを調べる目的で、アンモニアの除去やアルブミンの産生、脂質の蓄積等の肝機能について測定したところ、各肝機能を獲得していることが明らかとなった。また、OSM 以外の肝分化誘導因子の探索もおこない、高密度で細胞を播種することにより OSM と同様の分化・成熟が誘導されることを発見した。したがって肝分化には異種細胞間のみならず、同種細胞間の相互作用も重要であることが示された。人工肝臓の一つの指標であるアンモニア代謝のデータは成熟肝細胞と十分比較しうる値であり、胎生肝細胞のもつ接着性の高さや旺盛な増殖能を考慮すると、OSM や高細胞密度によって分化誘導をおこなった胎生肝細胞が人工肝臓のマテリアルとしての資質を十分備えていることが示唆された。

次に、IL-6 ファミリーのサイトカインに共通のレセプターサブユニットである gp130 の欠損マウスを用いた実験により、OSM による分化・成熟には gp130 が必須であるが、高細胞密度による分化誘導においては必要でないことが明らかとなった。さらに OSM による分化・成熟には gp130 の下流に存在する STAT3 の活性化の重要性が指摘されているが、細胞密度による分化・成熟では STAT3 の活性化も見られなかった。したがって、OSM と高細胞密度による分化誘導は、少なくとも初期段階は全く別の経路を用いてシグナルが伝達されていると考えられた。

OSM と高細胞密度は異なる様式によって細胞内に分化誘導シグナルを入力しているにもかかわらずその表現型は似ており、シグナル伝達経路の後半では同じ経路を共有している可能性が考えられた。このように複数の分化誘導シグナル経路が存在することはシグナル伝達という観点から興味深いだけでなく、その解析は人工肝臓マテリアルの開発にも非常に重要であると考えられた。両分化誘導経路の共通分子を探索する目的で、肝細胞の分化誘導に関わる実行因子の一つと考えられる C/EBP α の欠損マウスから分離した胎生肝細胞を用いて実験をおこなった。野生型マウス由来の胎生肝細胞では通常と同様の分化誘導がみられたが、C/EBP α 欠損マウス由来の胎生肝細胞では OSM および高細胞密度培養による分化誘導が抑制された。また、C/EBP α 欠損胎生肝細胞にレトロウイルスベクターを用いて C/EBP α を強制発現させたところ、OSM や高細胞密度に非依存的な成熟誘導が観察され、十分量の C/EBP α が肝細胞分化を誘導する能力を有すること、ならびに少なくとも肝機能誘導に関しては C/EBP α タンパク質は胎生 14.5 日目まで必要とされない可能性が示唆された。これらの実験から OSM および高細胞密度による胎生肝細胞の分化には C/EBP α が必須であることが証明された (図 1)。

OSM と細胞密度がどのようにして C/EBP α の活性を調節しているのかを知るために C/EBP α の mRNA 量とタンパク質量を調べたが、顕著な変化は見られず、分化が誘導されない条件においても mRNA とタンパク質の発現が認められた。したがって、調節分子との結合や何らかの修飾等によって C/EBP α の転写活性

が賦与されている可能性を考え、C/EBP α 応答配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行って転写活性を測定した。対照ベクターと比較して明らかな転写活性の賦与が OSM と高細胞密度培養で観察され、マーカー発現などの分化誘導は C/EBP α の転写活性の上昇に起因することが示唆された。OSM による転写活性の賦与は NIH-3T3 細胞株でも確認されたが、高細胞密度による転写活性の上昇は観察されなかった。さらに、OSM による分化ではその下流の分子 STAT3 の活性化が重要だとされているが、NIH-3T3 の系においてドミナントネガティブ型の STAT3 を強制発現させると、やはり C/EBP α の転写活性が抑制された。したがって、OSM による C/EBP α 活性化は STAT3 を介したもので肝細胞に特異的なシグナル経路ではないが、高密度培養による C/EBP α 活性化には肝細胞特異的な分子が細胞密度を検知している可能性が考えられた。

本研究で得られた結果は、C/EBP α が複数のシグナル経路による肝細胞分化の誘導において必須であることを示しており、人工肝臓のマテリアルとして胎生肝細胞を利用する際に、この分子の制御が重要であることを示している。また、C/EBP α の活性制御は肝分化に関与する遺伝子の探索にも有用である。

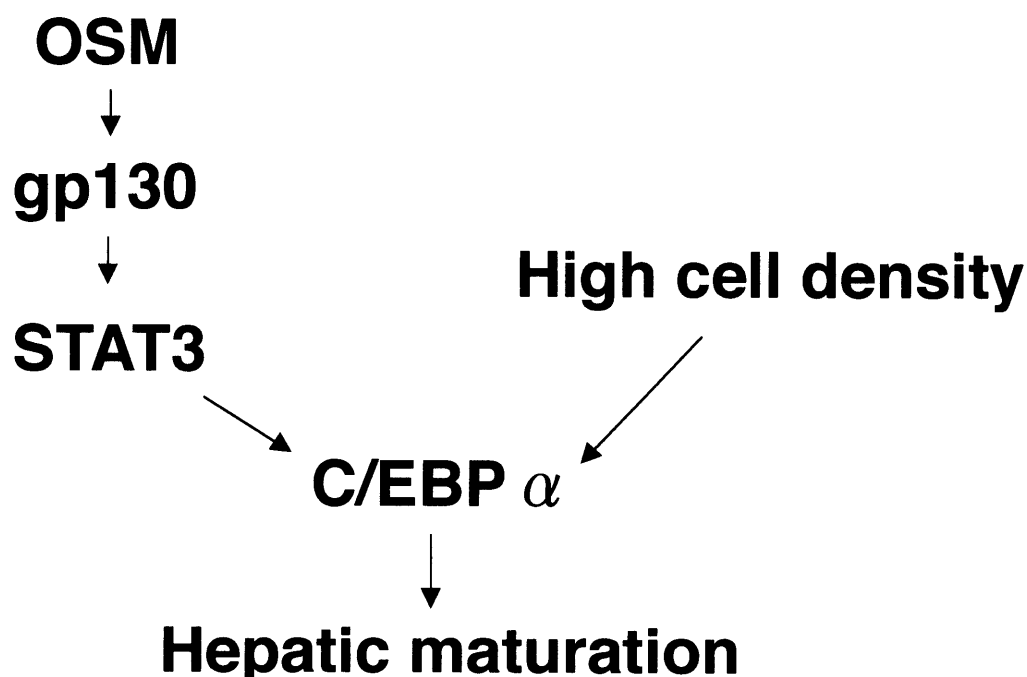


図 1 肝細胞の分化・成熟のシグナル経路