

## 論文内容の要旨

論文題目      マウス肝類洞内皮細胞の網羅的遺伝子発現解析とマーカー  
遺伝子の発現  
( Global gene expression analysis and development of  
the liver sinusoidal endothelial cell )

氏名            野中 秀紀

### 緒言

肝臓は代謝、解毒などを担う肝細胞（肝実質細胞）と、それらを支持する非実質細胞によって極めて特徴的な細胞構築がなされている。非実質細胞は、類洞と呼ばれる肝臓特異的な血管を構成しており、血管内皮細胞の類洞内皮細胞、周皮細胞の星細胞、肝在住マクロファージであるクッパー細胞などが含まれる（図 A）。肝組織形成機構の解明は、単に生物学的な興味の対象であるばかりでなく、再生医療への応用も期待でき意義深い。肝臓が新たに構築される際には肝細胞が分化増殖するだけでなく、非実質細胞も分化増殖をする。更にこれらが協調的に進行することで、高度に組織化された臓器形成が可能となる。従って、肝組織形成の機構を包括的に理解するためには、それぞれの細胞種がどのような振る舞いを示すのかを詳細に解析する必要がある。本研究では、肝臓の発生や再生過程において、個々の細胞種、特に肝類洞内皮細胞がどのような挙動を示すのかについて明らかにすることを目的に解析を行った。

### 結果と考察

#### 肝再生過程における OSM の作用機序について

IL-6 ファミリーサイトカインの一つである Oncostatin M (OSM)は肝発生、肝再生に重要な因子である。OSM 受容体(OSMR)欠損マウスでは急性肝障害や部分肝切除による肝再生が顕著に遅延する。しかし、OSM 産生細胞や OSM が作用する細胞については不明であった。そこでまず始

めに、肝再生過程における OSM の作用機序を解明する事を目的として以下の解析を行った。肝再生過程で OSM を発現する細胞は非実質細胞中の CD45 陽性血液細胞であった。一方、OSMR の発現は、肝細胞及び非実質細胞中の CD45 陽性細胞の一部と CD45 陰性細胞で認められた。OSM は *in vitro* において非実質細胞に作用し、マトリックスメタロプロテアーゼの阻害因子である TIMP-1 の発現を誘導した。また、肝類洞内皮細胞では OSM の刺激により形態変化が誘導された。OSM と同じファミリーに属する IL-6 の遺伝子欠損マウスは OSMR 欠損マウスと同様、肝再生に異常を示す。しかし TIMP-1 の発現誘導活性や形態変化の誘導活性は OSM と比べると顕著に低かった。以上の結果から、OSM は肝障害・再生の過程において (1) CD45 陽性の血液細胞より産生され、肝実質細胞、非実質細胞両者にわたる様々な細胞に作用すること、(2) 肝類洞内皮細胞はその標的細胞の一つであること、また (3) IL-6 とは異なる活性を持つことが示された。

### SAGE による肝類洞内皮細胞の遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析は、生命現象を解析するための有効な手段である。現在までに肝再生や肝臓の病態モデルにおける遺伝子発現解析の前例はあるが、これらは全て肝臓全体のサンプルを用いたものであった。様々な細胞種で構成される肝臓で、それぞれの動態や機能を理解するためには、各細胞集団ごとに遺伝子発現解析を行う必要がある。本研究では、肝再生過程において OSM が作用する細胞の一つである肝類洞内皮細胞に着目し、SAGE (Serial analysis of gene expression) 法による遺伝子発現解析を行った。正常肝および四塩化炭素投与後 24 時間経過した障害肝より肝類洞内皮細胞を分離し、SAGE ライブラリーを作製した。各ライブラリーから約 1,600 クローンの配列を決定した結果、正常肝 32,867 タグ、障害肝 37,493 タグの発現プロファイルを得た。障害肝で発現が増加する遺伝子には、細胞増殖を負に制御する遺伝子 (Cdkn1a, Irf1) などが存在した。一方、障害肝で発現が減少する遺伝子には、細胞増殖を正に制御する遺伝子 (Kdr, Nr1) や蛋白の細胞内輸送に関わる遺伝子 (Gosr2, Aplb1 など) が存在した。これら遺伝子群の発現変動から肝障害時には、肝類洞内皮細胞の増殖能や異物取込み能が一過性に低下していることが考えられた。本研究で同定した肝障害時に発現が変動する遺伝子の中には、肝臓全体の RNA では検出が困難なものも多数認められたことから、限定された細胞集団における遺伝子発現解析の有効性が確認された。

### 肝類洞内皮細胞マーカー遺伝子の同定とモノクローナル抗体の作成

肝類洞内皮細胞の分離・識別は、比重の差や、一般的な内皮細胞のマーカーである PECAM-1 や VE-Cadherin の発現を指標に行われてきた。しかし、これらの方法では、肝類洞内皮細胞と他の内皮細胞を厳密に区別できない。肝類洞内皮細胞に特異的なマーカーがあれば、より厳密に肝類洞内皮細胞を分離することが可能となるばかりか、肝類洞内皮細胞の発生、分化についても、その発現を指標に議論できるようになると期待される。そこで、先の SAGE の結果を利用して肝類洞内皮細胞マーカー遺伝子の同定を試みた。Web 上に公開されているマウス各臓器や細胞株由来の SAGE ライブラリーと、本研究で作成した肝類洞内皮細胞の SAGE ライブラリーを比較し、

肝類洞内皮細胞のライブラリーで多く発現するが、その他のライブラリーでは発現が少ない、あるいは認められない、という条件を満たすタグを抽出した。得られた 23 個のタグのうち 11 個は既に、肝類洞内皮細胞を含む内皮細胞で多く発現していると報告のあるものであり、本スクリーニングの有効性が確認された。残りのうち 4 個は、まだ十分に解析されていない遺伝子であり、新たな肝類洞内皮細胞マーカー遺伝子候補として注目している。

既知の遺伝子の中には、肝類洞内皮細胞の特徴の一つであるヒアルロン酸の取込みに関わる膜蛋白質、Stabilin-2 (Stab2) が存在した。マウス Stab2 のクローニングはごく最近であり、細胞分離に使用可能な抗体などの報告はなかった。そこで肝類洞内皮細胞の分離や識別に使用可能な抗マウス Stab2 モノクローナル抗体の作製を行った。得られた抗体は、フローサイトメトリー、免疫組織染色、ウェスタンブロットに使用可能であり、更に本抗体による肝類洞内皮細胞の分離は PECAM-1 を指標にしたときと比べ純度が高かった。成体マウス肝臓における Stab2 の発現は、類洞領域においてのみ認められ門脈や中心静脈では認められない。よって、本抗体により「肝類洞内皮細胞とその他の内皮細胞を厳密に識別する」ことが可能となった。

### 肝類洞の構築と肝類洞内皮細胞マーカー遺伝子の発現

肝類洞内皮細胞が、肝発生過程のどの時期に他の内皮細胞とは異なる特徴を獲得するかは、これまでほとんど明らかにされていなかった。そこで Stab2 の発現を指標に、肝発生過程における肝類洞の分化、成熟の様子を観察した。肝原基は、胎齢 8 日目の内胚葉前腸領域が隣接する心臓からのシグナルを受けることで形成される。肝芽細胞へと運命決定を受けた細胞が増殖するためには、Flk-1/ PECAM-1 陽性の内皮細胞からのシグナルが必要であることが既に報告されている。その後、出生時までの肝臓は造血器官として機能する。この時期の門脈や中心静脈は、その周囲に胆管や肝動脈などが存在せず未発達であり、出生後にこれらの構造が完成する。まず、肝原基において Stab2 陽性細胞が出現する時期の同定を免疫組織染色により行った。その結果、Stab2 陽性細胞

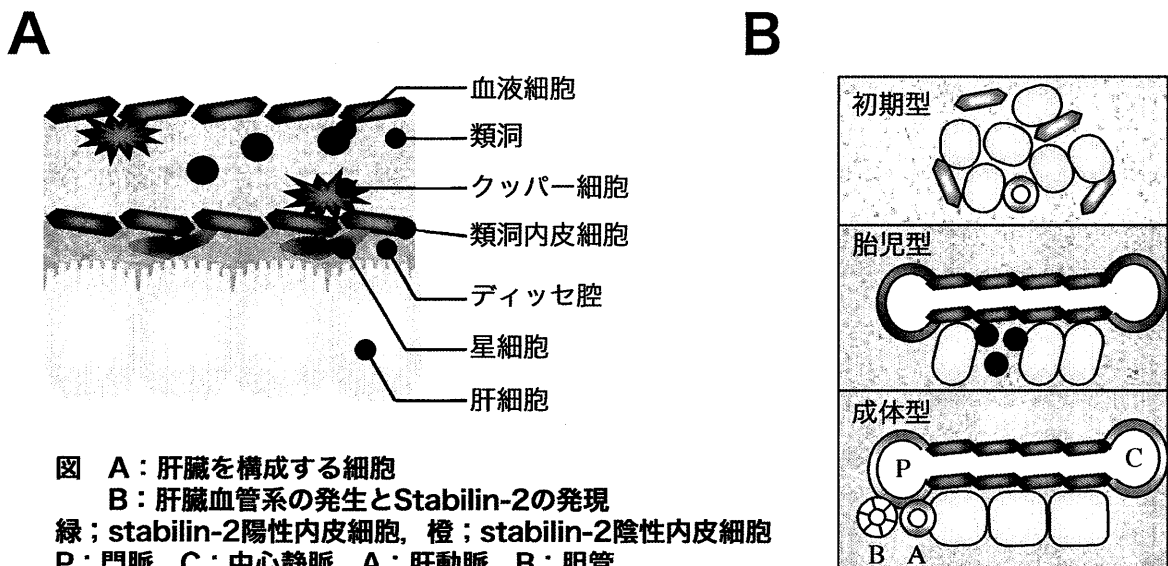


図 A: 肝臓を構成する細胞  
 B: 肝臓血管系の発生とStabilin-2の発現  
 緑; stabilin-2陽性内皮細胞, 橙; stabilin-2陰性内皮細胞  
 P; 門脈, C; 中心静脈, A; 肝動脈, B; 胆管

胞は胎齢 10 日目, 36 体節期以降に出現することが明らかとなった。肝芽細胞の増殖を促す胎齢 8 ~9 日目の内皮細胞には Stab2 が発現していないことから, この時期の内皮細胞は肝類洞内皮細胞へと運命決定をうける以前の内皮細胞であると考えられる。その後の胎児肝臓における Stab2 の発現は, 成体肝とは異なり類洞にも "大きな" 血管にも認められた。"大きな" 血管における Stab2 の発現は出生後, 胆管や肝動脈などが形成されるにつれて消失していた。次に Stab2 陽性細胞が内皮細胞であるという点について, CD45, PECAM-1 の発現とアセチル化 LDL の取込み能を指標に検討した。胎齢 13 日目の胎児肝臓における Stab2 陽性細胞は CD45 陰性/PECAM-1 陽性細胞の一部であり, CD45 陰性/PECAM-1 陽性/Stab2 陰性細胞はアセチル化 LDL の取込み能を有しないのに対し, CD45 陰性/PECAM-1 陽性/Stab2 陽性細胞のほとんどがアセチル化 LDL の取込み能を有していた。したがって, 胎児期における Stab2 陽性細胞は内皮細胞であり, Stab2 は胎児期においても肝類洞内皮細胞を分離・同定する良いマーカーとなることが明らかとなった。また, Stab2 陽性細胞における他の細胞表面抗原の発現を検討した結果, CD34 は胎児期においてのみ発現が認められたのに対し, FcR や c-Kit の発現は成体期で発現が増加することが明らかとなった。以上の結果から, 肝臓の血管系は Stab2 陰性の初期型, 全ての血管が Stab2 陽性となる胎児型, そして門脈や中心静脈での Stab2 の発現が消失する成体型の分化形態が存在し, 肝類洞内皮細胞においてもその細胞表面抗原の発現が大きく変化することが示された (図 B)。

## 結言

本研究は, OSMR 欠損マウスの表現系を手がかりに, OSM の肝再生過程における詳細な作用機序を明らかにすることを目的に開始された。その過程において, OSM の作用細胞の一つが肝類洞内皮細胞である事を同定し, 肝類洞内皮細胞の網羅的遺伝子発現解析を行うことで肝再生過程での動態を示唆する結果を得た。またその結果をもとに, 肝類洞内皮細胞の研究ツールとして肝類洞内皮細胞のマーカー遺伝子 Stab2 を同定し, そのモノクローナル抗体を作製した。更に Stab2 の発現を指標にすることで, 今までほとんど明らかにされていなかった肝類洞および肝類洞内皮細胞の肝発生過程における挙動を明らかにした。肝類洞内皮細胞は肝発生, 肝再生, 免疫応答など様々な局面においてその重要性が示唆されている。しかしこれら先行研究は, 細胞の分離が不十分であり真に肝類洞内皮細胞の機能を示しているとは言い難い。今後は, 本研究で作製した抗体を用いることでこのような問題点を克服し, 肝類洞内皮細胞の分化や, 生理的な機能における特殊性を議論できるようになると考えている。