

## Downregulation of miR122 by grainyhead like-2 restricts the hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells.

Development 2014; 141(23): 4448-4456 doi: 10.1242/dev.113654

Tanimizu N, Kobayashi S, Ichinohe N, Mitaka T.

**要旨** 肝臓の組織幹細胞は、肝細胞と胆管上皮細胞に分化可能な細胞である。我々は、転写因子 grainyhead like-2 が、microRNA122 の発現を抑制することによって、肝幹細胞の分化能を制御していることを明らかにした。

### 1. 肝臓における組織幹細胞研究

成体の組織・臓器には、種々の構成細胞を持続的に供給する能力を持った組織幹細胞が存在していると考えられている。小腸、皮膚など、細胞のターンオーバーが非常に速い臓器では、組織幹細胞が機能していることが証明されている。胎仔肝臓には、肝芽細胞と呼ばれる肝幹細胞が存在しており、発生の過程で肝細胞と胆管上皮細胞を供給している。一方、成体の肝臓では、重篤な障害時に誘導されるオーバル細胞と呼ばれる細胞が肝幹細胞であると考えられ、研究が行われてきた<sup>1)</sup>。最近の研究で、正常および障害肝から EpCAM, CD133 などの発現を指標にして肝幹細胞が分離され、それらの細胞はクローナルな増殖能を持ち、肝細胞と胆管上皮細胞に分化可能であることが示されている<sup>2)</sup>。

### 2. 肝幹細胞の分化能の変化

我々は、胎生後期 (E17) から成体 (11W) までの肝臓から EpCAM(+)細胞を分離し、*in vitro* でクローナルな培養を行うことで、増殖・分化能を解析した。本条件では、ALB(+)肝細胞と CK19(+)胆管上皮細胞を含む大型のコロニー (以下 Bipotential コロニー) を形成する細胞を肝幹細胞 (Liver stem/progenitor cells 以下 LPC) として Retrospective に同定することができる。

新生仔の EpCAM (+) 細胞は、Bipotential コロニーを効率良く形成するが、発生が進むにしがたい、その頻度は急速に減少し、生後6週以降になると、Bipotential コロニーは稀にしか出現しなかった。さらに、ALB(+)細胞の割合を比較したところ、新生仔 EpCAM(+)細胞由来のコロニーを構成する細胞のうち約 60% 程度が ALB(+)であるのに対し、成体 EpCAM(+)細胞由来のコロニーには、ALB(+)細胞が数%しか含まれていないことが明らかになった (図 A)。すなわち、肝細胞への

分化が限定されていた。

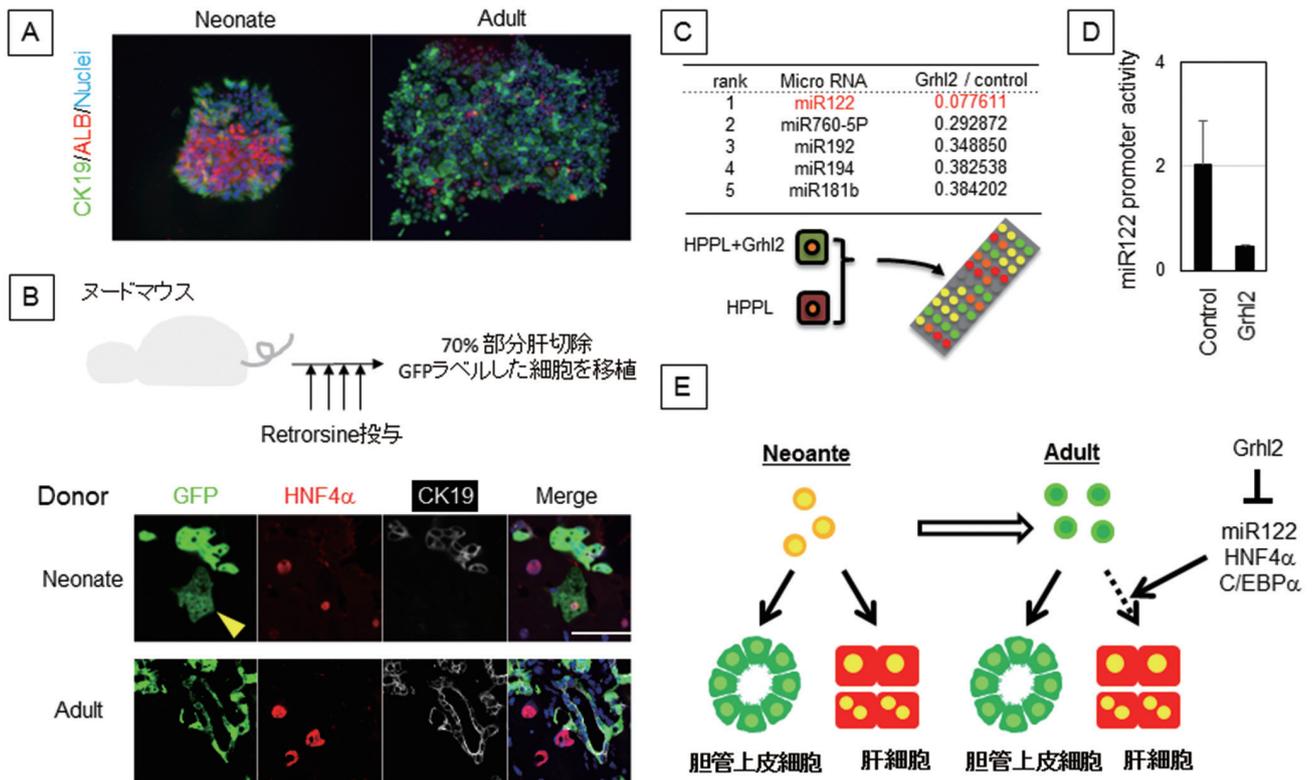
以上の結果から、肝臓の発生が進むと、肝幹細胞の数が減少するだけでなく、その分化能にも大きな変化が生じていることが明らかになった。

### 3. 生体内での分化・成熟

胎仔期および成体の EpCAM(+)細胞の分化能を生体内でも検討するために、細胞移植実験を行った。ヌードマウスに肝細胞増殖を阻害する作用を持つ Retrorsine を投与した後に 70% 部分肝切除を行い、 $1 \times 10^6$  個の細胞を脾臓経由で移植した。6週間後にレシピエント肝を解析したところ、新生仔由来の EpCAM(+)細胞を移植した場合には、HNF4 $\alpha$  (+)肝細胞として生着している細胞と、CK19(+)胆管上皮細胞として生着している GFP(+)ドナー細胞が検出された。一方、成体の細胞は、生着率が非常に低く、また、生着した細胞は CK19(+)胆管上皮細胞に分化していた。以上の結果も、成体の EpCAM(+)細胞は肝細胞への分化能が低いことを示している (図 B)。

### 4. 成体肝と新生仔肝の比較

肝幹細胞の分化能を規定している分子メカニズムを明らかにするために、新生仔および成体マウスの肝臓から分離した EpCAM(+)細胞の遺伝子発現プロファイルを Microarray 解析によって比較した。その結果、転写因子 Hes1, HNF1 $\beta$ , Grhl2, Sox9 などの発現が、成体の EpCAM(+)細胞で高いことが明らかになった。特に、Grhl2 は、肝細胞分化を阻害する作用があることがわかった<sup>3)</sup>。Grhl2 の下流で肝細胞分化を制御するメカニズムを明らかにするために、前駆細胞株にコントロールベクターもしくは Grhl2 発現ベクターを導入し miRNA microarray 解析を行った (図 C)。その結果、Grhl2 発現細胞で肝細胞分化に関わる miR122 が抑制



- A. 新生仔の EpCAM<sup>+</sup> 細胞は、ALB (+) 肝細胞を多く含むコロニーを形成する。  
 B. ノードマウスに移植を行うと、新生仔 EpCAM (+) 細胞は CK19 (+) 胆管上皮細胞と HNF4 $\alpha$  (+) 肝細胞 (黄矢頭) として生着するが、成体 EpCAM (+) 細胞は CK19 (+) 胆管上皮細胞として生着する。  
 C. Grhl2 強制発現細胞ではコントロール細胞とを比較して、miR122 の発現が低下している。  
 D. Grhl2 は miR122 のプロモーター活性を抑制する。  
 E. 成体の EpCAM +細胞には、転写因子 Grhl2 が強く発現していて、肝細胞分化に必要な HNF4 $\alpha$ 、C/EBP $\alpha$ 、miR122 の発現が抑制されているため、肝細胞への分化が起こらない。

されており、Grhl2 は miR122 のプロモーター活性を阻害することが明らかになった (図 D)。

## 5. 肝幹細胞を利用した再生医療の可能性

重篤な肝疾患においては、機能が低下した肝細胞を補うことが必要である。肝臓移植は有効な治療法であるが、ドナー数が絶対的に不足している。LPC は、その代わりとなりうる細胞移植の細胞ソースとして期待されるが、我々の実験結果が示すように、LPC を増幅して用いても効率良く肝細胞を補完することは難しいと考えられる。ドナー細胞を移植後に肝細胞として分化させる、あるいは Ex vivo で大量の肝細胞を作出するためには、LPC の肝細胞分化を抑制するメカニズムを遮断することが必要であろう。また、肝臓内在性で肝細胞に分化可能な前駆細胞を同定して用いることも有効

な手段となる可能性があると考えて研究を行っている。

## 6. 参考文献 (5 編程度)

- Farber, E. Cancer Res. 1956; 16: 142-148.
- Miyajima, A. et al. Cell Stem Cell 2014; 14: 561-574.
- Tanimizu, N. et al. J. Cell Sci. 2013; 126: 5239-5246.

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所組織再生学部門

准教授 谷水 直樹

略歴

平成 11 年 京都大学農学研究科終了

平成 16 年 米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校 ポスドク

平成 19 年 東京大学分子細胞生物研究所 助教

平成 21 年 札幌医科大学がん研究所分子病理病態学部門 講師

平成 26 年 同フロンティア医学研究所組織再生学部門 准教授