

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430086

研究課題名(和文) 肝再生・癌化過程における肝前駆細胞の細胞系譜とPdx-1遺伝子の役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of Pdx-1 gene in liver progenitor cells during liver regeneration and carcinogenesis.

研究代表者

小池 亨 (KOIKE, Toru)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：20377716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラット肝障害・癌発生時に増殖してくる肝前駆細胞(LPC)で発現するPdx-1遺伝子の役割を探るために、LPC株にてPdx-1遺伝子の過剰発現・ノックアウト(KO)実験を行った。またPdx-1遺伝子のKOにより発現変動する遺伝子を探るため、野生型株とのマイクロアレイによる遺伝子発現比較解析を行った。その結果、Pdx-1遺伝子はLPCの増殖制御には関与しないが、LPCの神経内分泌様表現型の発現、肝細胞への分化抑制に関与することが示唆された。またPdx-1発現細胞の遺伝的標識に向けて、ラットES細胞でのCRISPR/Cas9システムを用いたターゲティング技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Proliferation of liver progenitor cells (LPCs) accompanies on many types of liver injury when the replication of hepatocytes is blocked. Although there are enormous number of researches for the characterization of LPCs, their origin and their roles in liver regeneration is still on debate. We recently found that a subpopulation of liver progenitor cells, which situate in periportal area after GalN-induced rat liver damage, express Pdx-1 gene. To address the roles of Pdx-1 in LPCs during liver regeneration, we performed overexpression and gene knockout experiments of Pdx-1 using a LPC cell line. We found that the change of Pdx-1 expression does not alter LPC proliferation. We also performed microarray analysis to compare gene expression of wild type- and knockout- LPCs for the Pdx-1 gene. The data implies that Pdx-1 is involved in the expression of neuroendocrine phenotype of LPC, as well as the suppression of hepatocyte differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：肝臓 肝再生 肝前駆細胞 Pdx-1遺伝子 CRISPR/Cas9 ノックアウト マイクロアレイ ラットES細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝前駆細胞は、肝臓を構成する内胚葉系の上皮細胞である肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能性を持つ未分化な細胞である。この細胞は、ウイルス性肝炎や薬剤肝炎などの慢性肝炎や劇症肝炎といった「肝細胞の増殖が損なわれた肝障害」に際し、急速に肝臓内で増殖して肝再生に寄与する。一方で、その異常な増殖・分化制御が肝癌の発生に繋がると示唆されている。従って、肝前駆細胞は肝再生・肝癌発生病機構を理解する上で重要な位置づけにある細胞として着目されてきた<sup>1,2</sup>。

近年、肝臓のホメオスタシス・再生・癌化における細胞系譜解析が盛んに行われているが<sup>3,4,5</sup>、その中で肝前駆細胞のそれら生理現象への関与の程度や真の役割については、今なお議論的と成っている<sup>6,7</sup>。また、様々な肝前駆細胞マーカーの同定と、それらを用いた細胞単離と細胞の特性解析が進められているが<sup>8,9</sup>、障害肝で観察される肝前駆細胞はヘテロな細胞集団であり、より起源的な肝前駆細胞や肝幹細胞を規定する細胞分化マーカーやその細胞特性に関する統一的理解は得られていない。従って、肝前駆細胞の特性制御に関わる遺伝子やさらなる分子マーカーを見つけ、生体内でのそれらの発現、及びそれらを発現する肝前駆細胞の動態を詳細に解析するとともに、それら分子マーカーを用いて細胞を高精製度に単離し、肝前駆細胞の特性を理解して、その制御に関わる遺伝子群を同定していくことが必要とされていた。

我々は肝前駆細胞のより詳細な分子特性を明らかにすることを旨とし、ラット薬剤肝障害実験系を用いて肝前駆細胞で発現している転写因子を探索してきた。転写因子に着目することで、細胞特性制御に直接関わる因子が見つかる可能性があると考えたからである。そうした中で、膵臓の発生と機能維持での重要性が盛んに研究されてきた Pancreatic and duodenal homeobox-1 (PDX-1) 転写因子<sup>10</sup>が、ラットの肝内胆管、さらには薬剤障害肝で増殖した肝前駆細胞でも発現していることを本研究申請にあたり発見していた。また他のグループからは、肝障害誘導に応じて起こる肝内胆管の神経内分泌様の表現系獲得<sup>11</sup>における遺伝子発現制御に PDX-1 が関わることを示唆された<sup>12</sup>。さらに、肝外胆管や大型の肝内胆管周囲に存在する胆管周囲付属腺には、肝臓及び膵臓系譜の細胞に分化できる多能性の幹細胞/前駆細胞集団が存在し、それら一部の細胞で PDX-1 が発現していることも示された<sup>13</sup>。肝前駆細胞での *Pdx-1* 遺伝子の役割に関しては、一部の神経内分泌様の形質発現制御に関しての報告があるが<sup>11</sup>、その全体像は明らかになっておらず、肝再生や癌化でのその意義は明らかになっていない。

*Pdx-1* 遺伝子の役割については、遺伝子改変マウスの解析を中心に研究が進められた

結果、膵臓や十二指腸上皮の発生と膵β細胞の機能維持に必須であることが示されている<sup>10</sup>。しかし肝臓での役割についてはほとんど解析されてこなかった。また、*Pdx-1* 遺伝子がヒトを含めた様々な上皮系の癌細胞で発現していることや、その発現と癌の悪性度との正の相関が示唆されている。しかし *Pdx-1* 遺伝子の細胞癌化の分子制御への関与は明らかになっていない<sup>14,15,16,17</sup>。肝前駆細胞の肝癌発生への関与が示唆されていることから、肝前駆細胞での *Pdx-1* 遺伝子の発現がなんらかの形で肝癌・胆管癌の発生に関わっている可能性が考えられる。従って、肝前駆細胞における *Pdx-1* 遺伝子の制御下にある遺伝子の同定とその機能の解明が、肝癌発症の新たな分子機構の解明に繋がる可能性があると考えられた。

こうした研究開始当初の背景をもとに、本研究では肝前駆細胞における *Pdx-1* 遺伝子の役割と、肝再生・癌化における *Pdx-1* を発現する肝前駆細胞の細胞系譜に着目して以下の研究を遂行した。

## 2. 研究の目的

(1) 肝臓における PDX-1 の発現解析：マウス・ラットの肝臓の発生・再生過程における PDX-1 の発現・発現細胞の動態の詳細を明らかにするために、正常発生肝臓及び薬剤障害肝標本に対して PDX-1 の免疫組織化学的な解析を行う。

(2) 肝前駆細胞株を用いた *Pdx-1* 遺伝子の機能解析：肝前駆細胞での *Pdx-1* 遺伝子の機能を明らかにするために、肝前駆細胞株を用いてその *Pdx-1* 遺伝子発現を改変し（過剰発現・ノックアウト）、その細胞特性への影響を解析する。

(3) *Pdx-1* 遺伝子制御下にある遺伝子の網羅的探索：肝前駆細胞にて *Pdx-1* 遺伝子が制御に関わる細胞特性とその分子機構を探るため、野生型と *Pdx-1* 遺伝子ノックアウト肝前駆細胞における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に比較解析する。

(4) *Pdx-1* 遺伝子発現細胞の遺伝的標識：ラット生体内にて *Pdx-1* 発現細胞を標識し、肝臓の発生・再生過程におけるその細胞系譜を追跡することを目標とし、*Pdx-1* プロモーター活性に依存して細胞を遺伝的に標識するシステムを確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 肝臓における PDX-1 の発現解析：実験には Wistar, Fischer ラット、及び C57BL/6 マウスを用いた。

① ラット及びマウスの様々な発生ステージの胚や肝臓・胆道系での PDX-1 の発現を、免疫組織化学的に解析した。適宜、肝細胞・胆管・

細胞増殖マーカーを合わせて染色した。さらに、RT-PCRでもその発現を適宜確認した。  
② ラットにはD-ガラクトサミンを腹腔内注射して肝障害を誘導した。またマウスにはDDCを給餌して肝障害を誘導した。肝障害誘導後、様々なタイムコースにて肝臓組織片をサンプリングし、①と同様に免疫組織化学染色、RT-PCRにて解析した。

(2) 肝前駆細胞株を用いた*Pdx-1*遺伝子の機能解析：WB-F344肝前駆細胞株を実験に用いた。

① 肝前駆細胞株におけるPDX-1の発現を免疫染色により解析した。その際、様々な細胞密度条件、及びシングルクローン化した細胞でもPDX-1の発現解析を行った。

② 肝前駆細胞株へのプラスミドを用いた遺伝子導入条件の検討を行った。GFP強制発現プラスミドを用いて、エレクトロポレーション、PEI法、市販の遺伝子導入試薬にて遺伝子導入効率を検討した。

③ 効率の良い遺伝子の安定導入株の作製(ゲノムDNAへの遺伝子発現コンストラクトの組み込み)に向けて、トランスポゾンシステムを用いた遺伝子導入系を検討した。遺伝子導入効率はGFPの発現や薬剤耐性獲得効率で測った。さらにTet-ONシステムを用いた誘導的遺伝子発現系を検討した。

④ 上記②、③のシステムを用いて、肝前駆細胞株への*Pdx-1*遺伝子の過剰発現・誘導的過剰発現を行った。遺伝子導入された細胞を薬剤選択し、バルク細胞株、及びシングルクローン株を単離した。

⑤ 肝前駆細胞株での*Pdx-1*遺伝子発現を抑制するために、CRISPR/Cas9 ダブルニッカーゼシステムを用いた挿入・欠失、及び相同組換え修復機構を利用したターゲティングによる*Pdx-1*遺伝子の破壊を試みた。遺伝子破壊の成否はT7エンドヌクレアーゼIアッセイ、及びPCRにより確認した。また、相同組換え修復により遺伝子破壊した細胞から*Pdx-1*ノックアウト(KO)シングルクローンを複数単離した。

⑥ *Pdx-1*遺伝子過剰発現株・破壊株における細胞増殖・コロニー形成能を解析した。

(3) *Pdx-1*遺伝子制御下にある遺伝子の網羅的探索：*Pdx-1*遺伝子の制御下にある遺伝子群を探るため、肝前駆細胞の野生型(WT)株と(2)-⑤で作製した*Pdx-1*遺伝子KO株から全RNAを抽出し、Agilent SurePrint G3 Rat GE マイクロアレイ 8x60K Ver. 2.0にて遺伝子発現の比較解析を行った。発現に差の見られた遺伝子の一部については、RT-PCRにて肝前駆細胞株(WT, KO)及びラット正常肝臓と障害肝臓サンプルで発現の確認を行った。

(4) *Pdx-1*遺伝子発現細胞の遺伝的標識：

① *Pdx-1*プロモーター活性に応じて*Cre*遺伝子を発現させて遺伝的標識を行うコンストラクトの設計に向けた前段階として、ラット*Pdx-1*プロモーターを含む上流11kbpをクロー

ニングして*GFP*遺伝子を連結し、プロモーターの活性を測定するコンストラクトを作製した。その際、遺伝子導入効率を上げるためにトランスポゾンシステムも適用した。このコンストラクトを、*Pdx-1*遺伝子を発現する肝前駆細胞株に導入して*GFP*の蛍光を観察することで、プロモーターの有効性を確認した。

② *Pdx-1*プロモーター活性に応じて*Cre*遺伝子を発現させる別のストラテジーとして、ラットES細胞の*Pdx-1*遺伝子座に*Cre*遺伝子を組み込むことを想定し、その前段階として上記(2)-⑤に記したCRISPR/Cas9システムを用いた相同組換えにより、薬剤耐性カセットをラットES細胞の*Pdx-1*遺伝子座に組み込むことを試みた。相同組換えの成否はPCRにより確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 肝臓におけるPDX-1の発現解析：(図1)

① ラット・マウス共に肝臓発生初期から肝外胆道系でのPDX-1の発現が確認された。また出生前後からは太い肝内胆管でも発現が観察された。一方、ラットでは肝葉末梢部の小さな肝内胆管でも生後後数週間頃までには発現していたが、マウスでは発現が検出されなかった。なお、解析の過程でラットの始原生殖細胞でのPDX-1の発現を新たに発見した。

② ラットD-ガラクトサミン障害肝では、胆管に加えて細胆管反応で増生した肝前駆細胞にてPDX-1の発現が観察された。障害4日から6日目では、門脈域から肝実質部に向かって放射状にPDX-1陽性肝前駆細胞が並ぶ様子も観察された。PDX-1の発現は細胞増殖マーカーの発現とは必ずしも一致せず、一方、肝細胞分化マーカー(HNF4 $\alpha$ )との共発現は観察されずに排他的な発現であった。またマウスDDC障害肝では、肝内で拡張した胆管を構成する胆管上皮細胞にてPDX-1の発現が陽性であったが、ラットとは異なりPDX-1陽性の肝前駆細胞が肝実質部に浸潤していく様子は観察されなかった。

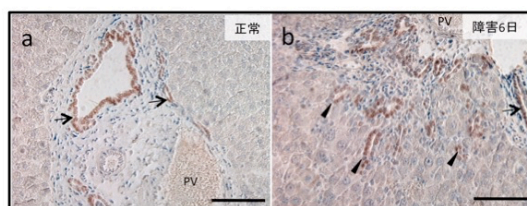


図1. ラット肝臓におけるPDX-1の発現。  
a. 正常肝臓. b. ガラクトサミン障害6日目. 胆管・細胆管(矢印)及び障害肝の实质部に浸潤していく肝前駆細胞(矢印)の核での陽性シグナル(茶)が見られる。スケールバー：100 $\mu$ m.

以上、ラットでの胆管上皮、及び肝障害時に門脈付近から増生して肝実質部に浸潤する肝前駆細胞でのPDX-1の発現が明らかになった。またラットとマウスでは、末梢部の胆管、及び本研究で用いた肝障害誘導系で出現する





現・誘導的過剰発現, さらにはCRISPR/Cas9 - 相同組換え修復による*Pdx-1*遺伝子の破壊株の作製に成功した。しかし, 肝前駆細胞の細胞増殖への影響は観察されず, これは障害肝組織にてPDX-1の発現が細胞増殖マーカーの発現と必ずしも一致しないことを裏付ける結果となった。

(3) *Pdx-1*遺伝子制御下にある遺伝子の網羅的探索: 肝前駆細胞のWT株と*Pdx-1*遺伝子KO株における遺伝子発現を, マイクロアレイにて比較解析を行った。GO解析を行った結果, *Pdx-1*遺伝子のKOによって下方制御された遺伝子は器官や組織・細胞の発生に関わるものが特に多いことがわかった。また, 神経内分泌系に関わると予想されるGOにも変動がみられた。一方, *Pdx-1*遺伝子のKOによって上方制御されたGOは, 分泌やケミカルホメオスタシスといった肝細胞の分化を想起させるものが挙がっていた。(表1) 発現変動の見られた遺伝子を個別に見ても, 神経内分泌様の特性に関わる遺伝子や未分化性の維持に関わると予想される遺伝子が*Pdx-1*のKOにより下方制御されている傾向が観察された。これら遺伝子の発現をRT-PCRにて解析したところ, 肝前駆細胞WT株, KO株間での発現変動が確認されただけでなく, ラット正常肝臓と障害肝臓のサンプル間でも肝前駆細胞の増殖パターンと一致する発現変動を見せる遺伝子が観察された。(図4)

表1. マイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析で変動がみられたGO.

発現	分泌	シグナル伝達	神経内分泌関連?	肝細胞機能?
Pdx-1 KO株にて下方制御されたGO (WT>KO)				
GO:0007166	細胞表面受容体連鎖シグナル伝達			
GO:0048513	臓器発生			
GO:0048522	細胞プロセスの正の調節			
GO:0007399	神経系の発生 *			
GO:0048468	細胞発生			
GO:0009888	組織発生			
GO:0048545	ステロイドホルモンへの応答			
GO:0009887	器官形態形成			
GO:0007417	中枢神経系の発生 *			
GO:0000902	細胞形態形成			
Pdx-1 KOで上方制御されたGO (WT<KO)				
GO:0007166	細胞表面受容体連鎖シグナル伝達			
GO:0007165	シグナル伝達			
GO:0050890	認知			
GO:0007242	細胞内シグナル伝達カスケード			
GO:0048468	細胞発生			
GO:0048878	ケミカルホメオスタシス *			
GO:0016192	小胞媒介輸送 *			
GO:0051046	神経パルスの伝達			
GO:0051046	分泌調節 *			
GO:0051094	発達過程の正の調節			

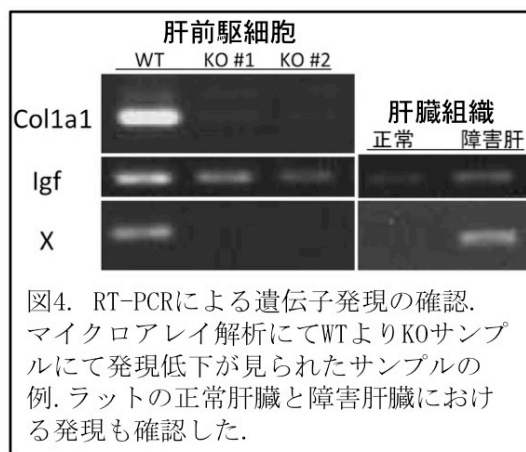


図4. RT-PCRによる遺伝子発現の確認。マイクロアレイ解析にてWTよりKOサンプルにて発現低下が見られたサンプルの例。ラットの正常肝臓と障害肝臓における発現も確認した。

以上の解析から, *Pdx-1*遺伝子は神経内分泌様の特性発現や未分化性の維持に関わる遺伝子の発現に関わっており, そのことが肝細胞への分化を抑制していることが推察された。

(4) *Pdx-1*遺伝子発現細胞の遺伝的標識:

- ① マウスとラットの*Pdx-1*上流域の塩基配列を比較したところ, 上流11kbpまで高い相同性が観察された。そこで上流11kbpをクローニングしてGFPレポーターコンストラクトを作製し, トランスポゾンシステムを用いて肝前駆細胞株に導入した。肝前駆細胞の*Pdx-1*遺伝子の発現に同調してGFPの発現が観察されることを期待していたが, GFP陽性の細胞が極めて少なく, このコンストラクトの*Pdx-1*プロモーターとしての有効性を確認できなかった。
- ② 上記(4)-①の代替法として, ラットES細胞の*Pdx-1*遺伝子座にCRISPR/Cas9システムを用いた相同組換え修復機構を用いて遺伝子を挿入するための条件検討を行った。研究成果(2)-⑤で肝前駆細胞に用いたコンストラクトを用いて, ラットES細胞にも薬剤耐性カセットを*Pdx-1*遺伝子座に組み込むことを試みた。PCRにより確認したところ, ターゲティングが起こっていることが確認された。

以上, *Pdx-1*遺伝子発現細胞を追跡するためのレポーターを組込んだラットの作製には至らなかったが, ラットES細胞でのターゲティングには成功しており, 今後は内在性*Pdx-1*プロモーター活性を利用して細胞標識を行うストラテジーにて*Pdx-1*陽性肝前駆細胞の細胞系譜解析が可能になると考えている。

<引用文献>

- ① Fausto, N. *Hepatology* **39**, 1477-1487 (2004)
- ② Knight, B. et al. *Bioessays* **27**, 1192-1202 (2005)
- ③ Furuyama, K. et al. *Nat. Genet.* **43**, 34-41 (2011)
- ④ Carpentier, R. et al. *Gastroenterology* **141**, 1432-1438 (2011)
- ⑤ Sekiya, S. & Suzuki, A. *J. Clin. Invest.* **122**, 3914-3918 (2012)
- ⑥ Miyajima, A. et al. *Cell Stem Cell.* **14**, 561-574 (2014)

- ⑦ Itoh, T. *Hepatology*, doi: 10.1002/hep.28661. (2016)
- ⑧ Dorrell, C. *et al. Genes Dev.* **25**, 1193-1203 (2011)
- ⑨ Kamiya, A. & Inagaki, Y. *Hepatol. Res.* **45**, 29-37(2015)
- ⑩ Kaneto, H. *et al. Rev Diabet Stud.* **4**, 209-225 (2007)
- ⑪ Alvaro, D. *et al. Gastroenterology*, **132**, 415-431(2007)
- ⑫ Marizioni, M. *et al. J. Hepatol.* **53**, 663-670(2010)
- ⑬ Cardinale, V. *et al. Hepatology.* **54**, 2159-2172(2011)
- ⑭ Ballian, N. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5823-5826 (2008)
- ⑮ Jonmarker, S. *et al. APMIS.* **116**, 491-498 (2008)
- Liu, S.H. *et al. Cancer* **117**, 723-733 (2011)
- ⑰ Igarashi, S. *et al. Histopathology* **61**, 266-276 (2012)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 山内 仁史, 末永 昂大, 塩尻 信義, 小池 亨: 「ラット肝上皮細胞株における *Pancreatic and duodenal homeobox 1* 遺伝子の機能解析 (Analysis of the role of *Pancreatic and duodenal homeobox 1* gene in liver progenitor cells.)」第38回日本分子生物学会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

② 小池 亨, 塩尻 信義: 「肝前駆細胞におけるPDX-1の発現 (Expression of PDX-1 in the Liver Progenitor Cells.)」日本動物学会第86回大会, 2015年9月19日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

③ Naohiro Abe, Nobuyoshi Shiojiri, Toru Koike: 「The roles of *Pancreatic and duodenal homeobox 1* gene in liver progenitor cells (肝前駆細胞株における *Pancreatic and duodenal homeobox 1* 遺伝子の役割)」第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

[図書] (計 1 件)

① 玉井 美保, 小池 亨, 田川 陽一 (2014) 「肝組織の培養における条件の設定とシステム開発」動物細胞培養, (株)技術情報協会, 第2章 第8節 [14] pp431-435.

#### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

小池 亨 (KOIKE, Toru)  
静岡大学・理学部・講師  
研究者番号: 20377716

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

塩尻 信義 (SHIOJIRI, Nobuyoshi)  
静岡大学・理学部・教授  
研究者番号: 70162568

田川 陽一 (TAGAWA, Yoh-ichi)  
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授  
研究者番号: 70262079

#### (4) 研究協力者

阿部 尚弘 (ABE, Naohiro)  
末永 昂大 (SUENAGA, Koudai)  
山内 仁史 (Yamauchi, Masashi)