

肝発生過程における類洞構造の形成

榎本 克彦・森田 真守・王 群*・土井 優子
渡辺 斉・高橋 さつき・斎藤 謙

秋田大学医学部病理学第一講座

*白求恩医科大学病理解剖教研室

Analysis of Sinusoid Organization during the Development of Fetal Rat Liver

Katsuhiko Enomoto, Mamoru Morita, Wang Qun*, Yuko Doi
Hitoshi Watanabe, Satsuki Takahashi, Ken Saito

First Department of Pathology, Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

*Norman Bethune University of Medical Sciences

Abstract: The liver sinusoid is a specialized vascular system which consists of endothelial cells with the fenestration and lacking basal lamina. These characteristics are thought to facilitate the exchange of various metabolites between blood and hepatocytes. In this study, we immunofluorescently and immunoelectronmicroscopically examined organization of the liver sinusoid during the developmental stage of fetal rat liver using the SE-1 antibody, which we previously established as a monospecific antibody to the sinusoidal endothelial cells. The SE-1 antigen appeared in the liver at 15-days-old fetus. Immunoelectronmicroscopic study revealed that the primitive endothelial cells which colocalized with a cluster of hematopoietic cells are positive for SE-1 in the liver of 14-days-old fetus. Since the intimate correlation between the preexisted large vessels (vitellin veins) and the SE-1 positive small vessels was not observed, it is suggested that the organization of liver sinusoid may occur in a manner of vasculogenesis in which the primitive mesenchymal cells differentiate into the vessels and hematopoietic cells. On the other hand, we found that the Factor VIII related antigen was positive at large vessels in the liver of 15-days-old fetus and also positive at the endothelial cells of hepatic portal and central veins in 17-days-old fetus. Therefore, we suggest that the hepatic portal and central veins are originated from the preexisted vitellin veins in a manner of angiogenesis.

Key words: fetal liver, sinusoid organization, SE-1 antibody.

はじめに

肝は、生体の物質代謝において中枢的役割を演じていることはよく知られている。糖や脂質、蛋白などの生体内高分子は主に血流を介して肝に集まり、そこでさまざまに代謝され、代謝物の一部は胆汁に分泌されるが多くはふたたび血流を介して他臓器へ運ばれる。このような物質の移動の場は肝類洞であり、そこをおおう類洞内皮細胞 (SEC) は、したがって、その機能に適した形態、すなわち、1) 有窓性の細胞質と 2) 基

底膜の欠落という特徴を有している¹⁾²⁾。しかしながら、このように肝機能に密接に関わる類洞構造が胎生期にどのようにして形成されるかということは、意外なことにほとんど報告されていない。

そこで、本稿では、Ohmura, Enomoto ら³⁾ が作製した成熟ラット肝 SEC を特異的に認識するモノクローナル抗体および Factor VIII 関連抗原 (Fa VIII) に対する抗体を用い、われわれの研究室で胎生期のラット肝を経時的に観察した結果を述べ、さらに肝の血管形成のメカニズムについて、現時点でのわれわれの考え

についても概説したい。

I. ラット胎仔肝における SE-1 抗原と Fa VIII の発現

発生初期肝の血液供給は、左右の卵黄囊静脈 (vitelline vein) とおよびそれらが吻合する血管網に依存するとされている。胎生 13 日目のラット肝を観察すると Fig. 1 に示すようにかなり大きな血管腔 (卵黄囊静脈に相当すると思われる) とシート状の未熟な肝細胞とわずかな血球系細胞が認められるのみで、成熟ラット肝にみられるような類洞構造は明らかではない。胎生 13 日目のラット肝を免疫染色で検索した結果、SE-1, Fa VIII いずれの発現も認めなかった。SE-1 抗原の発現は胎生 15 日目に短い線状の陽性所見として認められた。Fig. 2 に示すように陽性蛍光は胎生が進むにつれ発現が強くなり、また線状の陽性所見は伸長した。出生直前の 21 日目肝では、ほぼ成熟ラット肝に類似する陽性所見がみられた。このことを定量的に検索するため陽性蛍光の長さを胎齢ごとに計測すると、胎齢の増加に伴い短い陽性蛍光 (<32 μm) が減少し、長い陽性蛍光 (>64 μm) が増加することが明らかとなった (Fig. 3)。以上から、SEC 特異的な SE-1 抗原の発現、すなわち類洞の形成は胎生 15 日以前にはじまっているものと考えられた。

さらに、多くの蛍光染色切片を観察すると、陽性蛍光は卵黄囊静脈の遺残と思われる大きな血管腔との直接的なつながりがはっきりしないことから、卵黄囊静脈の内皮が肝実質内に伸展して類洞が形成する可能性は少ないものと考えられた。また、Fig. 3 に示したように短い線状の陽性蛍光は、胎齢が進むにつれ長くなることから、実質内に出現した初期の類洞構造は次第に伸長、吻合しながら成熟肝に認められるような類洞構造を形成するものと思われる⁴⁾。

一方、Fa VIII は胎生 14 日目肝は陰性であったが胎生 15 日目の卵黄囊静脈の遺残と思われる比較的大きな血管腔の内皮に発現が認められた。胎生 16-17 日目の肝は、多数の血球系細胞がみられ肝内造血が最も盛んな時期である。同時に胆管様の構造も認められるようになり、肝の血管構築も門脈、中心静脈の区別が明瞭になってくる。このような門脈や中心静脈の内皮は Fa VIII 陽性を示した。したがって、門脈や中心静脈は胎生初期に認められる卵黄囊静脈に由来することが強く示唆される。

II. 免疫電顕による SE-1 抗原, Fa VIII の局在

以上述べた蛍光抗体法による観察に基づき、抗原発現細胞の形態やその局在をさらに詳しく検索するため

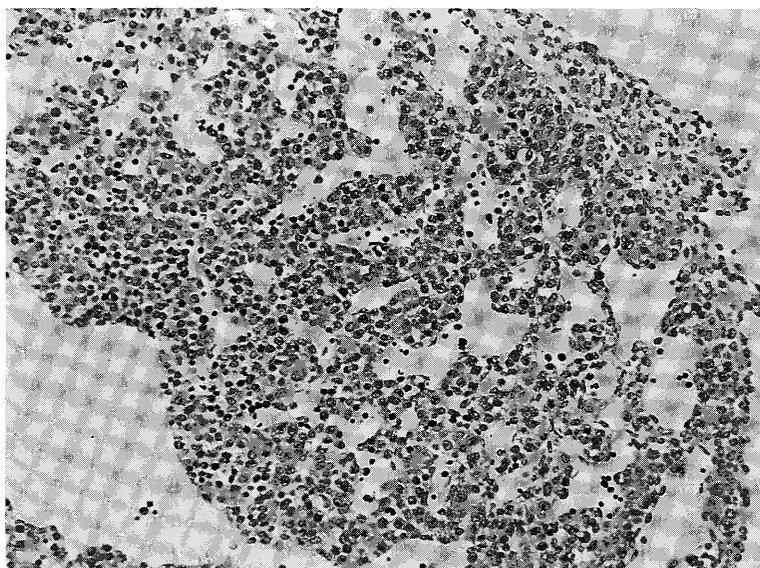


Fig. 1 胎生13日目のラット胎仔肝。未熟な肝実質細胞が索状構造を示している。拡張した空隙は卵黄囊静脈の血管網と考えられる。HE染色, 20倍。

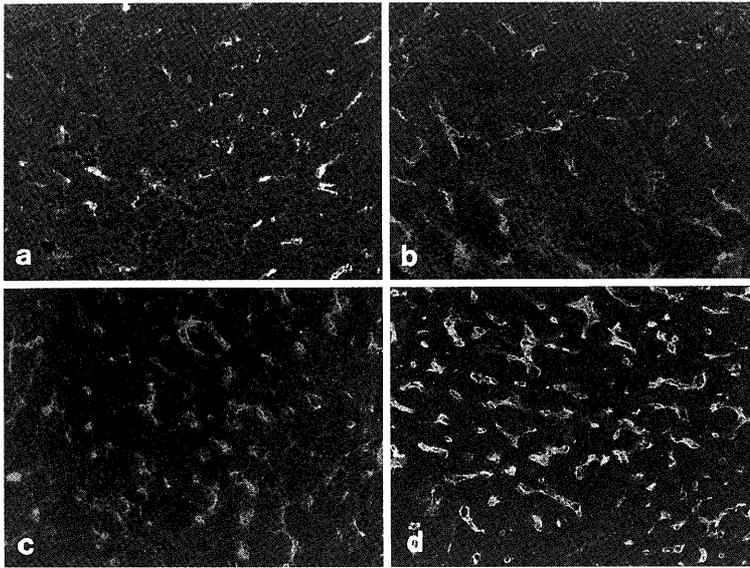


Fig. 2 蛍光抗体法によるラット胎仔肝のSE-1抗原の発現変化。胎齢15日目(a), 17日目(b), 19日目(c), 21日目(d)のラット胎仔肝。胎齢が進むにつれSE-1抗原の発現増加がみられ、21日目ではほぼ成熟ラット肝と同様の発現となる。

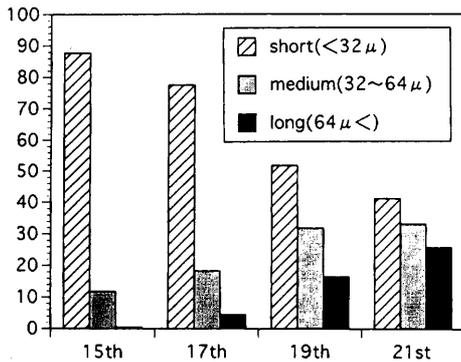


Fig. 3 胎仔肝の発達に伴うSE-1陽性シグナルの長さの変化。SE-1陽性シグナルの長さを任意にshort, medium, longの3タイプに分けそれらの占める割合をグラフにした。胎齢が進むにつれ、短いシグナルが減少し長いシグナルが増加しているのがわかる。

免疫電顕を行った。その結果、胎生14日目のラット肝には細胞膜にSE-1弱陽性を示す腫大した核を有する未熟な内皮細胞と思われる細胞が肝実質内に存在することが明らかとなった。このような細胞は、血球系細胞の集簇部位に認められ、小さな腔(血管腔)を形成

していた(Fig. 4)。15日目では、腔の構造がより明らかとなりSE-1の発現もより強く認められるようになった。このように抗原の発現が胎齢の増加とともに強くなる現象はFa VIIIでもみられ、15日目肝では卵黄囊静脈と思われる大きな血管腔内皮の細胞膜に弱陽性を示したFa VIIIは16日目になると内皮の細胞質内に顆粒状にはっきりと認められるようになった(Fig. 5)。

先に述べたように、胎生17日目以降は肝血管構築の基本がほぼできあがり、類洞内皮はSE-1抗原を、門脈や中心静脈の内皮はFa VIIIを発現するようになる。興味深いのは類洞と中心静脈の境界部分の内皮である。この部位では互いの内皮は隣接しているにもかかわらず、肝細胞と直接的に接している類洞内皮はSE-1陽性であり、基底膜を有し肝細胞と直接の接触がない中心静脈内皮はFa VIII陽性を示す。したがって、SE-1抗原の発現には肝細胞との直接的な相互作用が必要のように思われる。

III. 胎仔肝における類洞形成のメカニズム

血管の形成は個体発生や器官形成の上からも極めて重要であるばかりでなく、組織修復や腫瘍などの病態

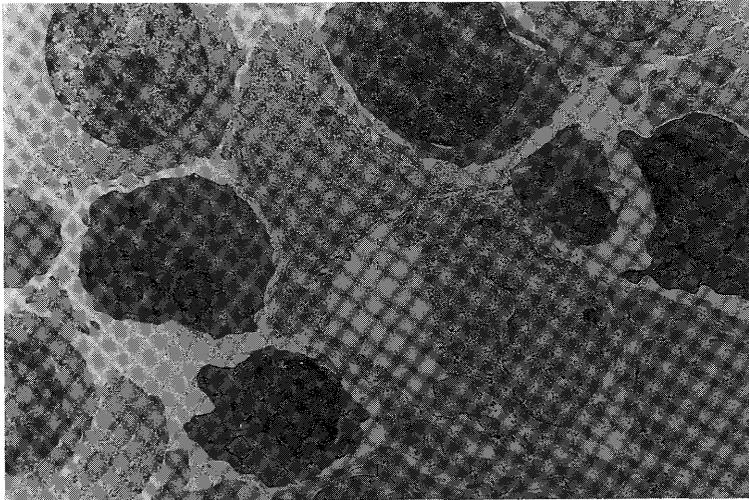


Fig. 4 胎齢 14 日目ラット肝に認められた SE-1 陽性を示す未熟な血管内皮細胞の免疫電顕像。血球系細胞に囲まれ小さな血管腔を形成している。

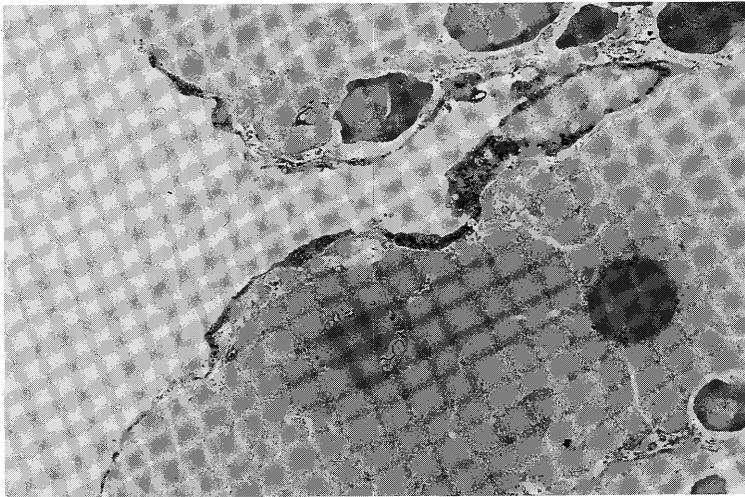


Fig. 5 Fa VIII 関連抗原の免疫電顕像。16 日目ラット胎仔肝では比較的大きな血管腔の内皮細胞の細胞質内に顆粒状に Fa VIII の陽性像を認める。

の発生にとっても重要な意味を持っている。血管の形成機構については、まだ十分に明らかにされていないが、最近になっていくつかの血管内皮増殖因子とその受容体チロシンキナーゼが同定され、それらの機能解析も進んでいる^{5),6)}。発生に伴う初期の血管形成は、未分化な間葉系の細胞から血球系の細胞と血管内皮細胞が分化し、血球系細胞をとり囲むように血管が形成されるとされている。このような血管形成は vas-

culogenesis と呼ばれ、腫瘍血管の新生などでみられるような既存の血管から出芽、分岐するような血管形成の形である angiogenesis とは区別されている。さらに、両者は異なる増殖因子と受容体により制御されていることが示されている⁷⁾。

肝発生における血管形成にどのような血管内皮増殖因子が関与しているのかについてはまだはっきりしない。しかし、Yamane ら⁸⁾はラット肝では肝実質細胞が

VEGF mRNA を発現し、類洞内皮はその受容体キロシンキナーゼである Flk-1 および Flt-1 mRNA を発現していることを報告している。したがって、胎仔肝の血管形成においても VEGF とその受容体が関与している可能性は極めて高いと考えられる。今回の検索で、われわれは 14 日目の胎仔肝実質内に SE-1 陽性の未熟な血管内皮が血球系細胞とともに存在することを見出した (Fig. 4)。前述したように、vasculogenesis は未分化な間葉系細胞から血球系と血管内皮が分化して血管が形成される過程である。肝は胎仔期には造血臓器としての機能を営んでいることも考え合わせると、胎仔肝における類洞の形成は vasculogenesis という過程をとり、VEGF とその受容体により制御されている可能性が高いとわれわれは考えている。また、門脈や中心静脈の形成と分化は既存の卵黄囊静脈との関連が強いことから、angiogenesis のメカニズムによるものと考えられる。

肝の血管系は機能血管系 (門脈) と栄養血管系 (肝動脈) を含んでおり複雑な構造を有している。このような構築は VEGF など内皮増殖因子ばかりでなく、肝細胞や星細胞などの他の細胞との接着、また細胞外基質との接着などによっても制御されていることが想定される。肝血管形成メカニズムの解明は、肝障害や肝硬変・肝癌の病態解明にも有用であり今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Motta PM (1984) The three-dimensional microanatomy of the liver. *Arch. Histol. Jpn.* **47**: 1-30
- 2) Wisse E, DeZanger RB, Charels K, Von Der Smissen P, Mccuskey RS (1985) The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* **5**: 683-692
- 3) Ohmura T, Enomoto K, Satoh H, Sawada N, Mori M (1993) Establishment of a novel monoclonal antibody, SE-1, which specifically reacts with rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 1253-1257
- 4) Enomoto K, Morita M, Doi Y, Watanabe H (1997) Analysis of sinusoid organization in the fetal liver using the sinusoidal endothelial cell specific antibody, SE-1. In: Wisse E, Knook DL, Balabaud C (eds) *Cell of the Hepatic Sinusoid. The Kupffer Cell Foundation, Netherlands*, pp 92-93
- 5) Merenmies J, Parada LF, Henkemeyer M (1997) Receptor tyrosine Kinase signaling in vascular development. *Cell Growth Diff.* **8**: 3-10
- 6) Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**: 671-674
- 7) Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277**: 48-50
- 8) Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, Shibuya M (1994) A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* **9**: 2683-2690