

Original

肝障害時における胆管増生と
血管新生の 3 次元の構造解析

阿部弘昭¹⁾, 鈴木悠地¹⁾, 村嶋亜紀²⁾,
柿坂啓介¹⁾, 宮坂昭生¹⁾, 佐々木登希夫¹⁾,
木村英二²⁾, 人見次郎²⁾, 滝川康裕¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 内科学講座消化器内科肝臓分野

²⁾ 岩手医科大学医学部, 解剖学講座人体発生分野

(Received on January 17, 2022 & Accepted on February 8, 2022)

要旨

肝障害組織では, 肝細胞が失われた肝小葉内に細胆管と呼ばれる幼若な胆管構造が出現し, この細胆管は肝組織修復過程で胆汁ドレナージ機能という重要な意義を持つ. 発生学的に, 胆管は先立つ門脈の形成に伴い構築されることから, 細胆管と血管新生は密接に関連していると推察されるが障害肝における両者の 3 次元的位置関係は明らかとなっていない. 本研究では, 臓器透明化手法を用いて, 肝内胆管と血管の 3 次元の構造解析を行った. 結果, 細胆管増生を誘導し

たマウス障害肝の解析では, 胆管増生に伴い門脈系の血管新生が生じていた. また, 細胆管増生誘導時に VEGFR-2 抗体により血管新生を抑制したマウス障害肝の解析では, 血管新生と同時に胆管増生も抑制された. 今回の結果, 肝障害時には門脈周囲の血管は, 胆管構造の変化と同時的に構造変化を示すことが明らかとなった. また, 病的肝臓における細胆管と血管新生の両者に細胞間相互作用が存在する可能性が示唆された.

Key words : *hepatic injury, ductular reaction, angiogenesis, vascular endothelial growth factor receptor-2, biliary epithelial cell*

I. 緒 言

肝臓は旺盛な再生能を示し, 様々な障害に対して柔軟な組織修復を行う. 肝硬変や急性肝不全は, 肝線維化や肝細胞の炎症・壊死により肝臓が持つ組織修復機構を逸脱した結果生じる肝疾患の終末像である. 末期肝不全に対して内科治療による肝機能回復は限定的であり, 唯一の根治的治療は肝移植となる. しかし, 肝移植はドナー臓器不足や終生の免疫抑制剤の使用など多くの問題を抱えている. そのため, 移植治療

を回避できるような, 末期肝不全に対する肝再生促進治療法の開発が望まれている.

急性肝不全や肝硬変では肝細胞が失われた肝小葉内に細胆管と呼ばれる幼若な胆管構造が出現する^{1,3)}. 細胆管は, 肝小葉内に異所性に出現した胆管上皮細胞マーカー陽性を示す上皮細胞から構成される幼若な胆管である. この細胆管が肝小葉内に増えていく現象は細胆管反応と呼ばれている^{2,4)}. 細胆管には肝臓の上皮細胞である肝細胞と胆管細胞の両者への分化能を持つ肝前駆細胞が含まれると報告されてきた^{5,7)}. そのため, 細胆管は肝障害によって失われた肝細胞の供給源として期待され, 細胆管の生理学的意

Corresponding author: Yuji Suzuki
yusuzuki@iwate-med.ac.jp

義の解析や増殖制御機構の解析を目的とした数多くの検討がなされてきた⁸⁻¹⁰⁾。近年, マウス肝臓の胆管を三次元的に解析する手法が確立され, 細胆管を含む肝障害時の胆管構造の動態が明らかとなった¹¹⁾。その結果, 肝前駆細胞の出現・増殖といわれていた細胆管増生の実像は, 既存の胆管と連続的に肝小葉内に広がっている胆管組織の構造変化をとらえたものであること¹¹⁾, またその生理学的意義は, 肝小葉内の毛細胆管の破壊に伴って生じた, 胆汁うっ滞のドレナージ機能であることが示唆されている¹²⁾。発生学的に, 胆管は先立つ門脈の形成に伴い構築されることが知られている^{13, 14)}。また, 実際の病的肝臓において細胆管周囲には門脈系由来と思われる脈管構造が確認されている¹⁵⁻¹⁷⁾。このことから, 病的肝臓における細胆管と血管新生について両者は密接に関連していると推察されるが, 胆管増生に伴う血管の3次元的な構造変化および胆管との関係は未解明である。

本研究は, 臓器透明化手法と免疫組織化学染色を組み合わせ, 肝臓内の胆管と血管の3次元的構造解析を同時的に行う手法を確立したうえで, 病的肝臓における細胆管と血管新生の関連を詳細に解析した。

II. 研究材料および方法

1. マウスと肝障害モデル

8~10週齢のC57BL/6J系統雄性マウス(日本クレア, 東京)を用いた。動物実験は, 岩手医科大学動物実験委員会の審査で承認を得て(承認番号: 01-006, 02-022), 動物実験規定を遵守して実施した。肝障害モデルの誘導は, 0.1%DDC(3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine)含有飼料を3週間給餌することで行なった。DDC給餌開始から3週間時点で肝臓を摘出し以後の解析に用いた。また, DDC給餌中に血管新生阻害薬であるvascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR-2)阻害剤(DC-101, Bio X Cell, Lebanon, USA)(以下DC-101中和抗体)

を20 mg/kg body weightの濃度で3週にわたり週3回の腹腔内投与を行った個体を作成した^{18, 19)}。DDC肝障害モデルマウス群およびDC-101中和抗体投与下におけるDDC肝障害モデルマウス群のサンプル数はそれぞれn=5に設定し, それぞれの摘出した肝臓において以後の解析を行なった。

2. 薄切切片における2次元的構造解析

摘出肝臓は4%パラホルムアルデヒドを用いて4℃で24時間固定後に, パラフィンブロックを作製した。3-5 μmの厚さで薄切しパラフィン切片を作製した。パラフィン切片について, ヘマトキシリン・エオジン染色, 免疫組織化学染色および蛍光免疫染色を行った。免疫組織化学染色による胆管細胞の観察は, 一次抗体としてrabbit anti-Cytokeratin(CK)19抗体(1:50, ab15463, abcam, Cambridge, UK)を使用した。二次抗体としてヒストファインシンプルステインMAX-PO(R)(424141, ニチレイバイオサイエンス, 東京)を使用し, DAB基質キットで発色した。蛍光免疫染色による血管構造の解析は, 一次抗体として血管内皮細胞マーカーであるrat anti-CD31抗体(1:100, DIA-310, DIANOVA, Hamburg, Germany)を使用した。一次抗体を4℃ over nightで反応した後, ビオチン標識二次抗体Biotinylated anti-rat IgG(BA4000, VECTOR, Burlingame, USA), アビジン-ビオジン標識酵素複合体VECTASTAIN Elite ABC Reagent(PK6100, VECTOR)で標識した。蛍光検出試薬としてTSA Cyanine 3 System(SAT704A001EA, パーキンエルマージャパン, 横浜)を用いて発色した。

3. 凍結標本および肝組織厚切り切片の作製

摘出肝臓は4%パラホルムアルデヒドを用いて4℃で24時間固定を行った。固定後, 10%スクロース溶液, 15%スクロース溶液, 20%スクロース溶液の順でそれぞれ4~12時間浸し, 置換(脱水)を行った。スクロース置換後はティシューテックO.C.T.コンパウンド(45833,

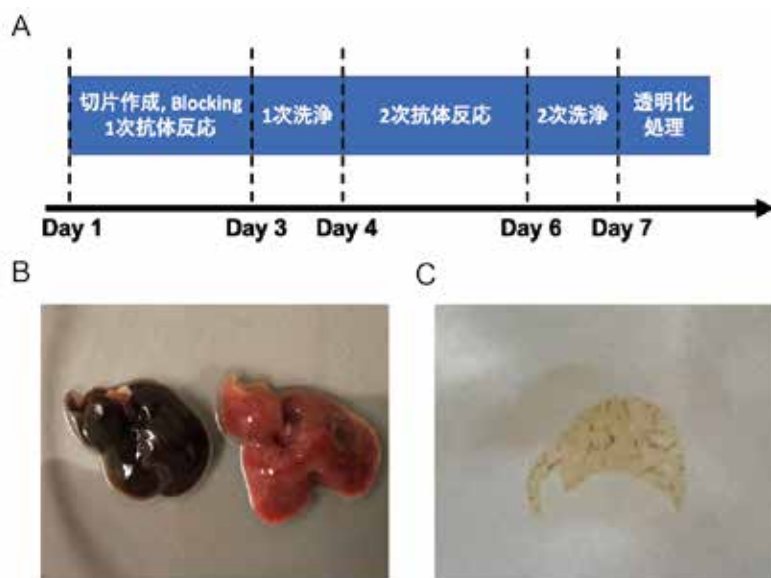


図1. A. 肝厚切り切片の染色プロトコール. B. マウス摘出肝の肉眼所見(右: マウス正常肝, 左: DDC 肝障害モデルマウス肝). C. SeeDB で透明化処理を行なった DDC 肝障害モデルマウス肝の厚切り切片写真.

Sakura Finetek, 東京) に包埋し, 液体窒素で凍結した. 凍結包埋サンプルについて, クライオスタット (CM3050s, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて3次元解析用の $200\ \mu\text{m}$ の厚切り切片を作製した. 正常肝群, DDC 肝障害モデルマウス群, DC-101 中和抗体投与下における DDC 肝障害モデルマウス群それぞれのサンプル数は $n = 5$ に設定し, それぞれの摘出肝について凍結標本および肝組織厚切り切片を作製し, 解析に用いた.

4. 蛍光免疫染色

$200\ \mu\text{m}$ の厚切り切片について, PBS で O.C.T. コンパウンドが除去される程度に洗浄し, 5% スキムミルクで 4°C 下 30 分間ブロッキングした後, 一次抗体として rat anti-CD31 抗体 (1:200, DIA-310), 胆管上皮細胞マーカーである rabbit anti-CK19 抗体 (1:2000, 東京大学定量生命科学研究所幹細胞創薬社会連携部門研究分野より譲渡) を 5% スキムミルク $500\ \mu\text{l}$ に懸濁し 4°C 下で 2 日間振盪反応させた. 12 時間毎に PBS を交換し, PBS で合計 24 時間の洗浄後, 二次抗体として Anti-Rat Alexa Fluor 488 (1:200,

ab150157, abcam), Anti-Rabbit Alexa Fluor 647 (1:200, ab150079, abcam) および核染色溶液として Hoechst 33342 (1:500, ab228551, abcam) を 5% スキムミルク $500\ \mu\text{l}$ に懸濁し, 4°C 下で 2 日間振盪反応させた²⁰⁾. 各抗体反応, 洗浄作業はすべて 2 ml チューブ内で行った.

5. 厚切り切片の透明化

透明化試薬は SeeDB [fructose 80.2% (wt/wt), 2% α -tioglycerol] を用いた²¹⁾. 二次抗体反応および核染色まで施行した組織切片を 12 時間毎に PBS を交換し, PBS で合計 24 時間の洗浄後, SeeDB に浸し振盪機を用いて室温下で最低 12 時間以上反応させ透明化を行った. 切片作成から抗原抗体反応, その後の透明化処理までの作業工程を図 1A に示す. また, マウス摘出肝の肉眼所見を図 1B, 透明化処理を行った肝臓切片の代表例を図 1C に示す.

6. 観察および画像取得

透明化処理を行った組織切片について, カバーガラスで挟み込み観察および画像取得を行った. 3次元解析のための画像取得は蛍光共焦点レーザー顕微鏡 (A1RHD25, Nikon, 東京) を用い, $5\ \mu\text{m}$ スライス 20-22 フレーム撮影

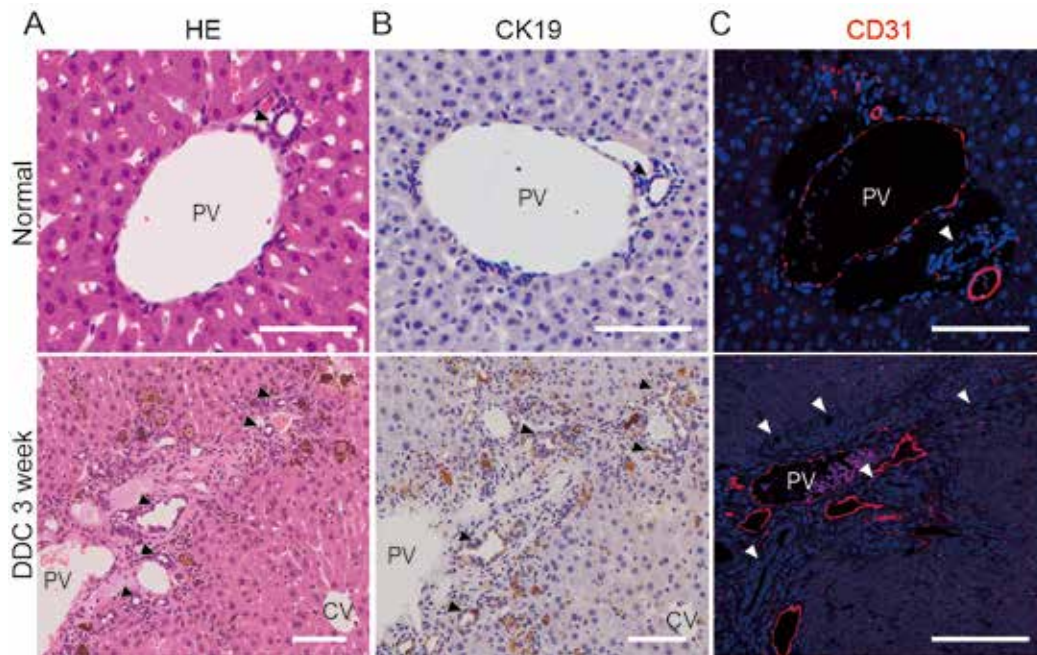


図2. マウス正常肝および DDC 食を3週間給餌し、肝障害を誘導したマウス摘出肝の組織像。
 A. マウス正常肝および DDC 肝障害モデルマウス肝のヘマトキシリン・エオジン染色像。矢頭は胆管を示す。B. マウス正常肝および DDC 肝障害モデルマウス肝の CK19 免疫組織化学染色像。矢頭は胆管を示す。C. マウス正常肝および DDC 肝障害モデルマウス肝における CD31 蛍光免疫染色画像。矢頭は胆管を示す。PV：門脈 (Portal vein)、CV：中心静脈 (Central vein)。Scale bar, 100 μm 。

後, NIS-Elements AR (Nikon) で3次元構築した。3次元取得画像における血管の面積, 分岐点, 分枝数, 胆管の面積を NIS-Elements AR (Nikon) で計測した。

7. 統計処理

胆管面積, 血管面積, 血管分岐点および分岐数についての3群間比較は混合効果モデルをあてはめ, 多重比較は Tukey 検定を用いた。p 値が 0.05 より小さい場合に有意な差があった。全ての統計解析は, Prism9 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) で行った。

III. 結 果

1. 細胆管増生時における新生血管の評価

マウス正常肝および DDC 肝障害モデルマウス肝における2次元肝組織染色画像を図2に示す。マウス正常肝と比較すると, DDC 食を3週間給餌させることで門脈周囲に CK19 陽性細

胞が多数認められ細胆管反応が誘導されていた (図2A, B)。また, 細胆管周囲には脈管と思われる管腔構造を認め, 蛍光免疫染色を行うと, この脈管構造は CD31 陽性であった (図2C)。

2. 正常肝臓における胆管および血管の3次元構造

2次元的な構造解析では, 細胆管と血管の連続性や位置関係の評価が困難であるため, 3次元構造解析を行い両者の形態学的ネットワークを明確にすることを試みた。マウス正常肝組織について, CD31 および CK19 二重染色を実施し, 3次元蛍光免疫染色画像を構築した典型像を図3Aに示す。CD31 は門脈内皮細胞に加え, 類洞内皮細胞, 中心静脈内皮細胞に陽性であった。200 μm の厚切り切片での3次元構造解析を行うことで, 血管および胆管の連続性が明瞭となり, 胆管は血管に近接するとともに, 血管周囲を取り巻くように存在していた。

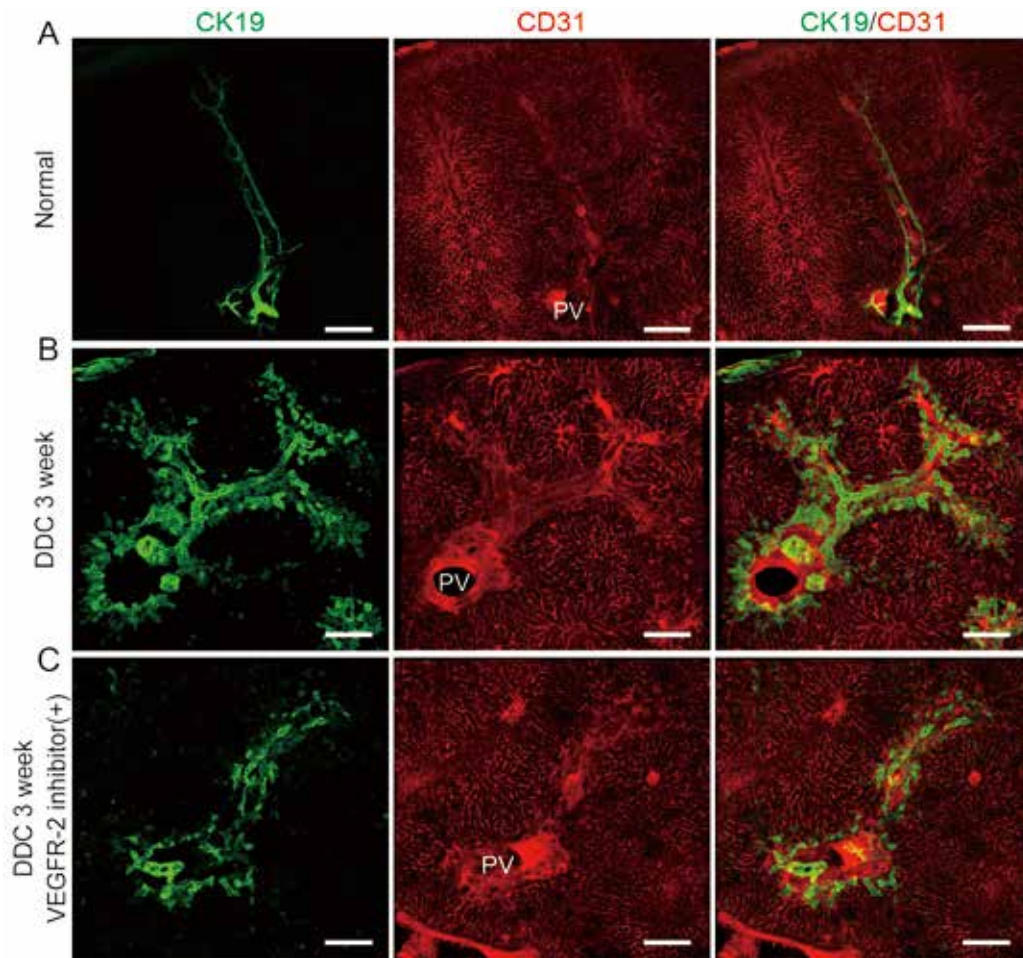


図3. DDC肝障害モデルマウス肝における3次元的蛍光免疫染色画像
 A. 正常マウスにおける肝組織所見. B. DDC食を3週間給餌し肝障害を誘導した個体の肝組織所見. C. DDC食3週間給餌中にDC-101中和抗体を腹腔内投与し肝障害を誘導した個体の肝組織所見. PV: 門脈 (Portal vein). Scale bar, 200 μm .

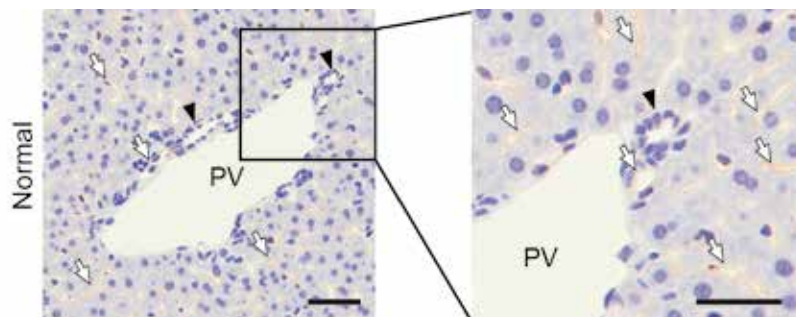


図4. マウス正常肝におけるVEGFR-2の免疫組織化学染色所見.
 矢頭は胆管, 矢印はVEGFR-2陽性細胞を示す. PV: 門脈 (Portal vein). Scale bar, 50 μm .

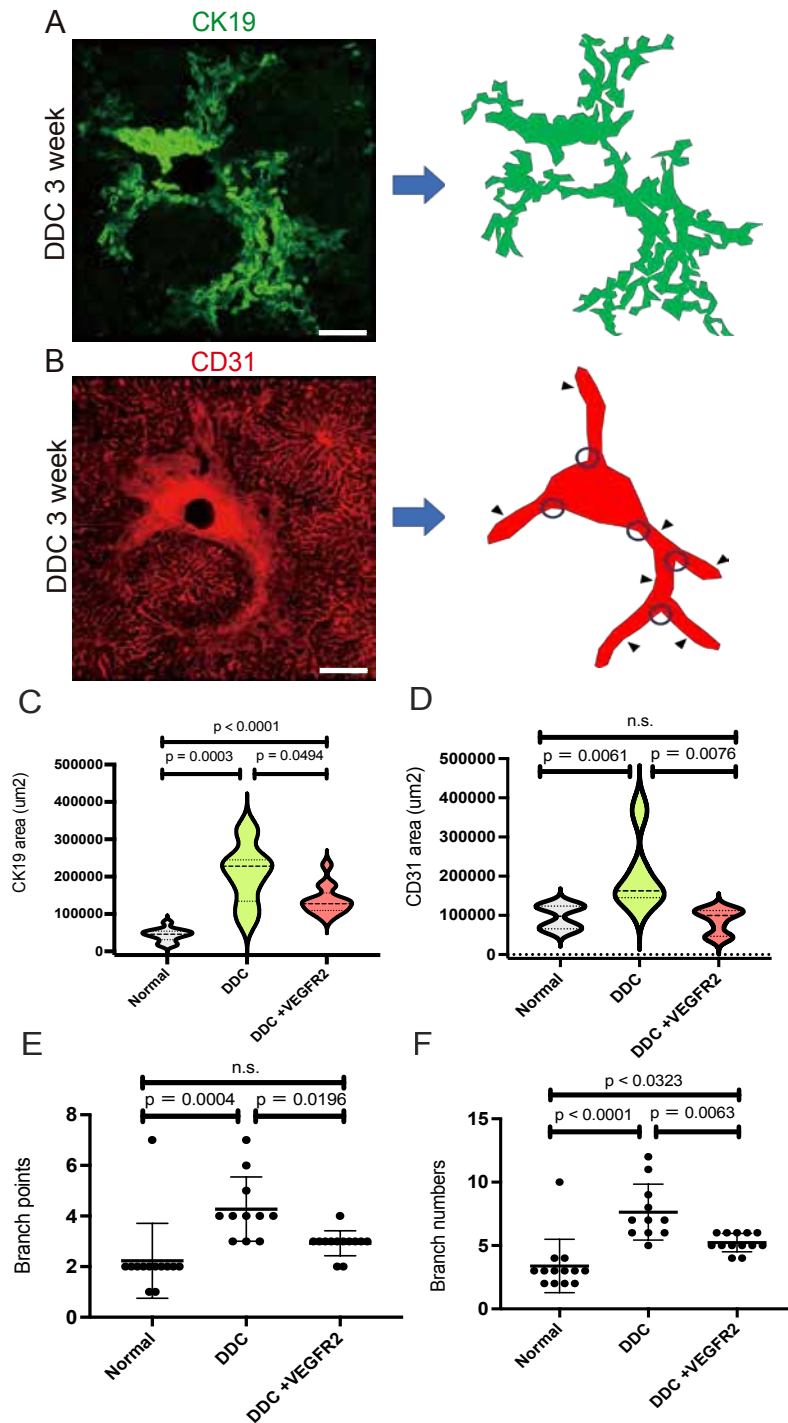


図 5. 血管および胆管の定量化.

A. 胆管増生の定量化. CK19 陽性領域を人工的に抽出し, 胆管面積を算出した. B. 血管新生の定量化. CD31 陽性領域のうち門脈系の血管を人工的に抽出し, 血管面積, 血管分岐点および分枝数を算出した. 矢頭で示す箇所を血管分枝, 円で示す箇所を血管分岐点と定義した. Scale bar, 200 μm . C-F. 胆管面積 (C), 血管面積 (D), 血管分岐点 (E), 血管分枝数 (F) それぞれの定量化結果.

3. DDC 肝障害モデルマウス肝の3次元構造解析

次に、DDC 肝障害モデルにおける胆管および血管構造を3次元構築し解析した。DDC 肝障害モデルマウス肝の門脈域に着目し観察を行うと、既報の通り CK19 陽性細胞の増加（胆管増生）を認めた（図 3B）。興味深いことに、DDC 肝障害モデルでは、CD31 陽性の脈管構造が肝小葉内に向かって伸長している様子が観察された。そして、胆管増生は伸長した血管に伴走して存在していることが明らかとなった。次に、血管新生阻害薬である DC-101 中和抗体の併用下における DDC 肝障害モデルマウス肝の3次元構造解析を行った。その結果、DC-101 中和抗体の併用下における DDC 肝障害モデルマウス肝では、CD31 陽性脈管の伸長の抑制と共に、胆管増生が抑制されていた（図 3C）。DC-101 中和抗体が血管内皮細胞だけではなく、胆管上皮細胞に直接的に作用している可能性を否定する目的で、マウス正常肝において VEGFR-2 の発現を免疫組織化学染色で評価した。結果、マウス正常肝では VEGFR-2 は血管内皮細胞に陽性像を認めたが、胆管上皮細胞には発現していないことを確認した（図 4）。

4. 胆管増生および血管新生の定量化と統計解析

正常肝群、DDC 肝障害モデル群、DC-101 中和抗体投与により DDC 肝障害モデルで血管新生を抑制した群の3つにおいて、3次元画像情報から胆管増生および血管新生の定量化を行った。胆管増生の評価として胆管面積を算出した。胆管面積の評価は CK19 陽性領域を手動的に抽出し、その面積を算出することで定量化した（図 5A）。血管新生の評価項目として血管面積、血管分岐点および血管分枝数を算出した。血管面積は、CD31 陽性領域のうち門脈領域を手動的に抽出し（図 5B）、CD31 陽性細胞で囲まれた領域を血管面積として算出した。血管分岐点（図 5B：円部）および血管分枝数（図 5B：矢頭部）

は、前述の手動的に抽出した門脈系の血管について定量化した（図 5B）。類洞内皮細胞、中心静脈系の血管については、解剖学的構造を指標に解析から除外した。正常肝群、DDC 肝障害モデルマウス群、DC-101 中和抗体投与下における DDC 肝障害モデルマウス群それぞれの肝組織切片において、マウス各群5匹ずつ、それぞれの肝臓において2～3領域の門脈域を抽出し、合計10～13領域の門脈域について解析を行った。DDC 肝障害モデルマウス群は正常肝群と比較し、胆管面積の増加に加えて（ $p = 0.0003$ ）、血管面積（ $p = 0.0061$ ）、血管分岐点（ $p = 0.0004$ ）および血管分枝数（ $p < 0.0001$ ）のいずれにおいても有意差をもって増加していることが示された（図 4C-F）。また、DC-101 中和抗体投与下における DDC 肝障害モデルマウス群は DDC 肝障害モデルマウス群と比較し、胆管面積の減少に加えて（ $p = 0.0494$ ）、血管面積（ $p = 0.0076$ ）、血管分岐点（ $p = 0.0196$ ）および血管分枝数（ $p = 0.0063$ ）も有意に減少しており、肝障害時に血管新生を抑制すると胆管増生も抑制されることが示された。

IV. 考 察

今回我々は、200 μm の厚切り切片における免疫染色と臓器透明化手法により、肝臓内部の胆管および血管ネットワークの同時的な3次元構造を評価する手法を確立した。この方法を用いることで、肝障害における胆管および血管の構造変化を捉えることが可能となった。今回の解析の結果、肝障害後の胆管および門脈周囲の血管の構造変化の詳細が明らかとなった。

肝臓は障害の強さや種類に応じて胆管の構造を劇的に変化させる^{11, 20}。最近、この胆管構造の変化は肝小葉内の毛細胆管の崩壊に伴って生じることが示されている¹²。毛細胆管は、肝細胞で産生された胆汁の胆管への排出路としての機能を担っている。肝障害時における胆管の構造変化は、肝細胞障害および毛細胆管が破壊

された結果として生じた胆汁うっ滞を軽減するという、機能的側面を見ているものと考えられる。言い換えると、胆管増生は肝臓が障害を回避するシステムの一部を見ているものと思われる。既報において、マウスにおける胆管の発生は胎生 12.5 日前後から始まることが知られている²²⁾。高島らは、発生過程での門脈周囲の胆管形成の過程を詳細に観察している¹³⁾。この報告では、胎生 13.5 日のマウス胚で、門脈周囲の肝芽細胞が胆管上皮細胞へと運命決定されることによって肝内胆管の発生が始まる。嚢胞状に形成された胆管は、胎生 15.5 日から 18.5 日にかけて連続性を持ち始め、細かい管状構造を形成する。この結果、門脈を取り囲むように密なネットワークが形成され、いわゆる胆管板 (Ductal plate) と呼ばれる構造となる。本研究において、肝障害時には胆管増生に加えて、門脈周囲の血管の分岐数および面積の増加を認め、細胆管反応時には血管新生も生じていることが示唆された。興味深いことに、DC-101 中和抗体により肝障害時に誘導される血管新生を抑制することで、新生血管の抑制のみならず細胆管増生も抑制されていた。したがって、発生過程で胆管形成に必要な条件となる血管系について、肝障害時の胆管増生の過程においても同時に形成される血管が胆管増生に重要な因子である可能性を示唆している。しかしながら、本研究においては DC-101 中和抗体投与下における DDC 肝障害モデルマウス群に対して、Isotype control 抗体投与下における DDC 肝障害モデルマウス群を用いた比較検討を行っていないため、IgG 抗体の非特異的反応による影響の可能性を完全には否定できておらず、追加検討が必要であると考えられる。今回の結果が純粋な DC-101 中和抗体投与による血管新生の抑制を反映しているものと仮定すれば、胆管の増生に血管内皮細胞からの接着因子や液性因子などの因子が関与していると予想される。今後、胆管細胞と血管内皮細胞、それぞれの培養細胞を用いた共培養実験

による細胞間相互作用の解析などを組み合わせることで、胆管と血管の動的なモデリング過程が明らかとなることが期待される。

肝臓の再生過程は大きく二つの様式をとる。一つは、ヒトの部分肝切除や生体肝移植などで観察される代償性肥大という再生過程である。二つ目は、今回の DDC 肝障害モデルのように毒物や薬物により成熟肝細胞の増殖が損なわれた結果として、胆管増生が生じる再生過程である。代償性肥大による肝再生過程では、残存する肝細胞が肥大と一部細胞分裂することにより、臓器としての大きさを回復して再生する²³⁾。代償性肥大による再生過程において、血管内皮細胞特異的に VEGFR-2 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは、肝再生が遅延することが報告されている²⁴⁾。この機序として、血管内皮細胞から分泌される肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor) の産生が低下することが示されており、代償性肥大による肝再生過程において血管内皮細胞と肝細胞との相互作用が重要な意味を持つことが示唆されている。これまで、胆管増生が生じる再生過程において、胆管細胞と血管内皮細胞との相互作用は明らかとなっていなかったが、本研究で確認された血管新生を抑制することで胆管増生が抑制された結果は、胆管細胞と血管内皮細胞との細胞間相互作用が存在する可能性を示唆している。

今回、臓器透明化技術による肝臓の 3 次元構造解析手法を活用し、肝臓が障害を回避する仕組みである胆管増生には門脈系の血管構造の変化も伴っていることを見出した。ヒト病的肝においても同様の手法にて 3 次元構造解析を行うことで、末期肝不全における病態解明につながるものと期待される。また、DC-101 中和抗体投与にて血管新生を抑制すると胆管増生が抑制される可能性があるという興味深い点も明らかとなった。今後、さらなる追加検討を行うことで肝不全の組織修復・再生過程における胆管増生

に関わる血管新生の意義が明らかになるものと期待される。

今回我々は肝臓透明化技術による胆管および血管ネットワークの3次元構造解析手法の確立に際し、東京大学定量生命科学研究所幹細胞創薬社会連携部門研究分野の宮島 篤博士、伊藤 暢博士、中野泰博博士の支援を受け、有益な助言をいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

利益相反：著者らには開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, et al.**: Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* **154**, 537-541, 1999.
- 2) **Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al.**: Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* **39**, 1739-1745, 2004.
- 3) **Gouw AS, Clouston AD and Theise ND**: Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* **54**, 1853-1863, 2011.
- 4) **Sato K, Marzioni M, Meng F, et al.**: Ductular reaction in liver diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* **69**, 420-430, 2019.
- 5) **Deng X, Zhang X, Li W, et al.**: Chronic liver injury induces conversion of biliary epithelial cells into hepatocytes. *Cell Stem Cell* **23**, 114-122, 2018.
- 6) **Lu WY, Bird TG, Boulter L, et al.**: Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol* **17**, 971-983, 2015.
- 7) **Nagahama Y, Sone M, Chen X, et al.**: Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injury. *Am J Pathol* **184**, 3001-3012, 2014.
- 8) **Takase HM, Itoh T, Ino S, et al.**: FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* **27**, 169-181, 2013.
- 9) **Suzuki Y, Katagiri H, Wang T, et al.**: Ductular reactions in the liver regeneration process with local inflammation after physical partial hepatectomy. *Lab Invest* **96**, 1211-1222, 2016.
- 10) **Miyajima A, Tanaka M and Itoh T**: Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 561-574, 2014.
- 11) **Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A, et al.**: Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology* **61**, 2056-2066, 2015.
- 12) **Kamimoto K, Nakano Y, Kaneko K, et al.**: Multidimensional imaging of liver injury repair in mice reveals fundamental role of the ductular reaction. *Commun Biol* **3**, 289, 2020.
- 13) **Takashima Y, Terada M, Kawabata M, et al.**: Dynamic three-dimensional morphogenesis of intrahepatic bile ducts in mouse liver development. *Hepatology* **61**, 1003-1011, 2015.
- 14) **Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, et al.**: Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* **294**, 559-563, 2001.
- 15) **Dezsó K, Nagy P and Paku S**: Human liver regeneration following massive hepatic necrosis: Two distinct patterns. *J Gastroenterol Hepatol* **35**, 124-134, 2020.
- 16) **Tanimizu N, Kaneko K, Itoh T, et al.**: Intrahepatic bile ducts are developed through formation of homogeneous continuous luminal network and its dynamic rearrangement in mice. *Hepatology* **64**, 175-188, 2016.
- 17) **Morell CM, Fabris L and Strazzabosco M**: Vascular biology of the biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* **28**, 26-32, 2013.
- 18) **Hooper AT, Butler JM, Nolan DJ, et al.**: Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell* **4**, 263-274, 2009.
- 19) **Seki T, Hosaka K, Lim S, et al.**: Endothelial PDGF-CC regulates angiogenesis-dependent thermogenesis in beige fat. *Nat Commun* **7**, 12152, 2016.
- 20) **Kamimoto K, Kaneko K, Kok CY, et al.**: Heterogeneity and stochastic growth regulation

- of biliary epithelial cells dictate dynamic epithelial tissue remodeling. *Elife* **5**, e15034, 2016.
- 21) **Ke MT, Fujimoto S and Imai T**: SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* **16**, 1154-1161, 2013.
- 22) **Raynaud P, Tate J, Callens C, et al.**: A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. *Hepatology* **53**, 1959-1966, 2011.
- 23) **Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, et al.**: Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* **22**, 1166-1175, 2012.
- 24) **Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, et al.**: Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* **468**, 310-315, 2010.

Three-dimensional structural analysis of ductular reaction and angiogenesis after liver injury

Hiroaki ABE¹⁾, Yuji SUZUKI¹⁾, Aki MURASHIMA¹⁾,
Keisuke KAKISAKA¹⁾, Akio MIYASAKA¹⁾, Tokio SASAKI¹⁾,
Eiji KIMURA²⁾, Jiro HITOMI²⁾ and Yasuhiro TAKIKAWA¹⁾

¹⁾Division of Hepatology, Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾Division of Human Embryology, Department of Anatomy,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on January 17, 2022 & Accepted on February 8, 2022)

Abstract

The liver has a robust regenerative capacity, with different modes of regeneration according to the type and extent of injury. When the proliferation of hepatocytes is impaired as a result of hepatic injury, reactive bile ducts emerge and expand in the liver parenchyma, a process known as ductular reaction (DR). However, there is no information available about structural change of blood vessels in the liver when DR occurs. In this study, we analyzed

the three-dimensional structure of bile ducts and blood vessels simultaneously using the tissue transparency technique. We show that angiogenesis occurs concurrently with DR in a mouse liver injury model. Inhibition of angiogenesis by the VEGFR-2 monoclonal antibody modulated the dynamics of blood vessels and biliary ducts. The findings of this study suggest that angiogenesis may play a role in the structural flexibility of DR.
