

令和元年 10 月 17 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 28

氏 名 松本 知訓

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: オレゴン州ポートランド オレゴン健康科学大学(アメリカ合衆国)2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。肝再生・恒常性維持における多倍体肝細胞の病態生理学的意義の解明3. 派遣期間: 平成 29 年 9 月 26 日 ~ 令和 元年 9 月 25 日

4. 受入機関名及び部局名

Oregon Health & Science University, Oregon Stem Cell Center, Markus Grompe lab5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

哺乳類の体細胞は通常、基本数 n の染色体を 2 セット持つ 2 倍体($2n$)である。しかし、肝臓の主な構成細胞である肝細胞には、染色体セットを多数持つ多倍体($4n/8n$ など)が生理的に多く認められることが古くから知られている。事実、ヒトでは成体肝の約 50%の肝細胞が多倍体とされ、マウスでは 80 から 90%の肝細胞が多倍体として存在する。また、肝内における多倍体肝細胞の比率は加齢や肝硬変などの様々な病態において増加することが知られており、多倍体肝細胞はこれらの病態において何らかの役割を担っている可能性が推察されるが、多倍体肝細胞が肝臓の病態生理においてどのような意義を持つのかについては不明な点が多い。

また多細胞肝細胞をめぐっては、その細胞分裂様式も特異で興味深い。一般的な体細胞は体細胞分裂により、母細胞と同じ染色体数を持つ 2 つの娘細胞を生み出すが、肝細胞の細胞分裂では、核分裂後の細胞質分裂が不完全となることで、2 核の多倍体肝細胞が生み出される。さらに特徴的な分裂様式として、多倍体肝細胞自身は細胞分裂に際して、時に多極分裂を行うことで染色体数を半減し、多倍体肝細胞から 2 倍体や多様な異数体細胞が産み出される可能性があることが明らかとなっている(Duncan AW, et al. Nature 2010)。しかしながら、このような多極分裂(体細胞減数分裂)は染色体の分離異常を引き起こし、多くの娘細胞は細胞死に陥ってしまうことも報告されており(Ganem NJ, et al. Nature 2009)、肝細胞の多極分裂と、それによって生じた染色体を半減した細胞が、生体肝の維持、肝再生に実際に寄与しているのかについては未だ不明である。そこで本研究では、多倍体肝細胞とその体細胞減数分裂が肝恒常性の維持、及び肝障害下での肝再生に果たす役割を明らかにすることを目的に、多倍体肝細胞の動態を経時的に追うマウスモデルを構築し解析を行った。

【多倍体肝細胞の動態を経時的に追うマウスモデルの構築】

まず始めに、多倍体肝細胞を標識する遺伝子改変マウスモデルの確立を試みた。多倍体肝細胞を遺伝的に標識する方法として、4 種類の蛍光遺伝子を内在する Rosa26-Confetti マウスを利用した。Rosa26-Confetti マウスでは Rosa 遺伝子座に緑色(hrGFP)、黄色(EYFP)、シアン(mCerulean)、赤色(DsRed)の 4 色の蛍光遺伝子が loxP 配列で挟まれる形で配置されており、Cre 組換えを受けると 1 つの Confetti アレルから 1 色の蛍光遺伝子を発現する。このため Rosa26-Confetti ヘテロマウス

スを用いた場合、2 倍体細胞では Cre 組換え後に 1 色の蛍光遺伝子のみを発現するのに対し、多倍体細胞では Confetti アレルを 2 本以上持つため、理論上 2 種類以上の蛍光遺伝子が発現する可能性がある。すなわち、2 色以上の蛍光を同時に発色する細胞は多倍体細胞であり、これらの挙動を解析することにより多倍体肝細胞の動態を追うことが可能となる。

一方、Confetti マウスは複数の loxP 配列を持つため、Cre 組換え遺伝子の発現が持続する限り Confetti アレルの組換えが続き、各 Confetti アレルからの蛍光遺伝子の発現が 1 遺伝子に定まらないという問題があり、またマウス肝細胞の多倍体化は離乳後から成体マウスになる時期に生じるため、Confetti マウスへの Cre 組換えの導入は任意の時点でオン・オフができる方法を用いなければならない。いくつかの方法を検討した結果、Cre 組換えを確実に停止させられる Cre 組換え導入法であった UBC-CreERT2 マウスを用いた Cre 組換え誘導法を選択することとした。すなわち、Confetti マウスを UBC-CreERT2 マウスと交配して得られた UBC-CreERT2/Rosa26-Confetti マウスではタモキシフェン投与依存性に Cre 組換えを誘導することができる。逆に、Cre 組換えを停止させられるためには、タモキシフェン投与が無い状態では全く Cre 組換えが起こらないことが必要となるが、事前の検討の結果、UBC-CreERT2/Rosa26-Confetti マウスではタモキシフェン非投与下でのいわゆるリークが存在しないことが確認できた。

そこで実際に UBC-CreERT2/Rosa26-Confetti ヘテロ成体マウスにタモキシフェンを投与したところ、タモキシフェン投与から 3 週間以上経過してタモキシフェンの効果が消失した時点においても肝内に多数の多色で標識された肝細胞が存在することが確認できた。これら多色肝細胞の倍数性について、コラゲナーゼ処理によって分離採取した肝細胞を Hoechst で染色しフローサイトメトリーで解析したところ、多色肝細胞は全て 4 倍体以上の多倍体であることが確認できた。すなわちここまでの検討により、UBC-CreERT2/Rosa26-Confetti マウスを用いることによって多倍体肝細胞を多色肝細胞として特異的に標識することができるマウスモデルを構築することに成功した。このマウスモデルにおいては多倍体肝細胞の標識は組み替えられた DNA によって標識されているため、Confetti アレル数が母細胞と娘細胞で変わらない限り、多色多倍体肝細胞由来の細胞は全て細胞分裂後も多色の蛍光遺伝子で標識されることとなり、多色多倍体肝細胞由来の細胞の挙動を追うことが可能となる。

【多倍体肝細胞の体細胞減数分裂の証明、および体細胞減数分裂後に生じた娘細胞の肝再生への寄与の確認】

次に、多倍体肝細胞が実際に体細胞減数分裂を経て倍数性を減じ、さらに倍数性を減じた細胞が肝内で増殖し肝再生に寄与することができるのかどうかを確認することを試みた。多倍体肝細胞のみを分離しその挙動を追うため、タモキシフェンを用いて標識した UBC-CreERT2/Rosa26-Confetti ヘテロマウスから肝細胞を採取し、Hoechst で DNA を染色の後、Fluorescence activated cell sorting (FACS)を用いて多倍体肝細胞を分離した。分離する多倍体肝細胞の条件としては、YFP および DsRed の 2 色を共発現すること、Hoechst による DNA 量の定量において 4 倍体もしくは 8 倍体であること、という 2 つの条件を両方満たす様な細胞として分離した。そして分離した YFP・DsRed 共陽性の 4 倍体、8 倍体肝細胞を Fumarylacetoacetate hydrolase (Fah)欠損マウスに細胞移植した。Fah 欠損マウスは 1 型遺伝性高チロシン血症のモデルマウスとして重篤な肝細胞障害を生じるが、Fah 酵素を正常に発現する肝細胞を移植するとドナー細胞が肝内に定着し、ドナー細胞による肝再生が生じることが知られている (Overturf K, et al. Nat Genet. 1996)。FACS で分離した 2 色の多倍体肝細胞を経門脈的に約 10000 細胞移植した後、約 4 ヶ月間ドナー細胞による肝再生を待った。そして再生後の肝臓をフローサイトメトリーで解析したところ、YFP あるいは DsRed を発現するドナー細胞由来の細胞のうち、平均 26.6%、26.4%の細胞は YFP もしくは DsRed の一方のみを発現する単色細胞となっていた。前述の様に、Confetti アレル数が母細胞と娘細胞で変わらない限り、2 色の多倍体肝細胞由来の細胞は全て 2 色の蛍光遺伝子で標識されるはずであるため、Fah 欠損マウスに出現した単色の細胞は、2 色の多倍体ドナー細胞が肝再生、細胞分裂の過程で Confetti アレル数を減らし、発現する蛍光遺伝子数も減った結果生じたことが推察される。すなわち、多倍体肝細胞が肝再生の過程で体細胞減数分裂を行うことが示唆された。さらに再生後の Fah 欠損マウス肝を共焦点顕微鏡で解析したところ、2 色のドナー細胞が増殖して生じた再生領域の周囲に、体細胞減数分裂後の 1 色細胞が領域性を持って増殖した像が認められ、体細胞減数分裂後の肝細胞が肝再生に寄与していることが確認された。

次に、染色体を減らした娘細胞の挙動を追うため、2 色の多倍体肝細胞を移植した Fah 欠損 1 次レシピエントマウスより、再生後に出現した DsRed 単色陽性の 2 倍体を FACS で分離し、別の Fah 欠損レシピエントマウスに移植を行った。そしてその肝再生中に、2 次レシピエントマウスにタモキシフェンを投与し、ドナー細胞に 2 回目の Cre 組換えを誘導した。再生された 2 次レシピエントマウス肝を解析したところ、DsRed 陽性の再生結節内に、DsRed および CFP 共陽性の細胞が増殖し

ている像を認めた。このことは、多倍体細胞が染色体を減らし2倍体となった後、増殖中に再度多倍体化し、さらにその多倍体化した細胞も増殖能を保持し肝再生に寄与する、という肝細胞の多彩な倍数性の変化を示していた。

以上の実験により多倍体肝細胞が体細胞減数分裂を行い染色体数を減じた娘細胞を生み出し、またこれらの娘細胞が肝再生に寄与していることが確認されたが、FACSによる細胞分離においては100%の純度を得ることは技術上困難であることを考える必要がある。すなわち、FACSによる細胞分離時にごく少量混入した単色の細胞が実験結果を歪めてしまっている可能性が否定しきれない。事実、FACSにより分離した細胞を分離直後にフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡で確認したところ、分離した細胞のうち2色の蛍光を発現していた細胞の割合は平均98.5%であり、分離・移植した細胞の中には1-3%の単色細胞が混入していた可能性を考慮しなければならないと考えられた。そこで、FACS分離時に混入する単色細胞の影響を評価するため、2色の多倍体肝細胞に意図的に単色細胞を混入させ移植する実験を行った。雌雄の異なる同腹仔由来のUBC-CreERT2/Rosa26-Confettiヘテロマウスより、雌の2色多倍体肝細胞と雄の単色肝細胞を分離し、これらを混合して単色肝細胞が全体の5%、10%混入した細胞集団をFah欠損レシピエントマウスに移植した。その結果、再生後のレシピエント肝内には予想通り25-30%ほどの単色細胞が認められた。これら単色細胞をFACSで分離し、そのDNA中のY染色体数を定量的PCRを用いて定量することにより単色細胞内の雄由来の細胞割合を算出したところ、単色細胞のほとんど(70-80%)は雌細胞由来であることが分かった。この結果は、FACSの過程で少量混入した単色細胞が多色細胞に比べて過剰増殖する可能性を否定しており、前の実験で多色細胞の移植後に認められた単色細胞は、細胞の混入ではなく体細胞減数分裂の結果として生じたことが示された。

【多倍体肝細胞の肝再生・恒常性維持に対する寄与の評価】

ここまでのFah欠損マウスへの肝細胞移植の実験と並行して、肝細胞移植を用いない実験系においても多倍体肝細胞の動態を経時的に追う細胞系譜解析を試みた。この実験ではRosa26-Confettiヘテロ成体マウスに、Cre遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV-Ttr-Cre)を低ウイルス量(5×10^8 コピー以下)感染させることにより低頻度のCre組換えを誘導して肝細胞を標識した。この方法では肝内では肝細胞が非常に粗に標識されるため、1つ1つの肝細胞の単クローン性の増殖を評価することが可能となる。肝細胞を標識後、四塩化炭素、チオアセトアミド、3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)、Fah欠損の4種類の慢性肝障害をマウスに誘導し、標識された肝細胞の増殖を検討した。その結果、いずれの肝障害においても多色肝細胞の単クローン性の増殖を認め、多倍体肝細胞は様々な肝障害において、持続的に細胞分裂を繰り返し肝再生に寄与することが示された。薄切切片を解析することによるサンプリングバイアスを除外するため、150-200 μ mの厚い切片を作製し3D画像にて単クローン性の細胞増殖をさらに検討したところ、各肝障害において、標識された多倍体細胞の大多数が増殖し肝再生に寄与していることが明らかとなった。このことは、少数の組織幹細胞ではなく肝内に存在する多数の分化した多倍体肝細胞が肝再生に深く寄与していることを示しており、未だ一定の見解を得られていない肝組織幹細胞の存在に一石を投じる結果であった。

さらに多倍体肝細胞の肝再生への寄与を評価するため、高効率に肝細胞を標識する系でも検討を行った。UBC-CreERT2マウスへのタモキシフェン投与ではCre組換え効率が十分ではなく、高効率に肝細胞を標識することが難しいため、本実験では新たなレポーターマウスとしてRosa-RGBowマウスを利用した。Rosa-RGBowマウスはRosa遺伝子領域にEGFP、mOrange2、mKate2の3種類の蛍光遺伝子が組み込まれており、Cre組換え後に3種のうちの1種の蛍光遺伝子のみを発現する。またRGBowマウスではConfettiマウスと異なりCre組換えは理論上1度しか起こりえないため、一度誘導したCre組換えを停止させる必要がなく、AAV-Ttr-Creの高ウイルス量投与によりCre組換えを誘導することができる。成体RGBowヘテロマウスへAAV-Ttr-Creを 6×10^{10} コピー感染させると75%近くの肝細胞を標識することができ、多倍体肝細胞の3分の1以上が2色の蛍光遺伝子を発現する多色肝細胞として標識されることがフローサイトメトリーにより分かった。また、この標識効率は、個体間でも大きな差が無く比較的安定していた。そこで、事前に成体RGBowヘテロマウスをAAV-Ttr-Creにより標識した上で、様々な肝障害を加え、肝障害後の多色肝細胞の全標識肝細胞における割合をフローサイトメトリーで評価したところ、いずれの肝障害においても、障害後には多色肝細胞の割合が減少していることが分かった。このことはFah欠損マウスへの細胞移植の系のみならず、複数の慢性肝障害においても肝再生の過程で多倍体細胞由来の染色体減少が生じた可能性を示唆している。

そこで多細胞由来の染色体減少をさらに確認するため、FACSで分離した多色多倍体肝細胞を野生型マウスに移植することにより粗に多色多倍体細胞のみが標識された肝を作製し、引き続いて四塩化炭素を投与し肝障害を誘導した。その結果、肝障害後には単クローン性の再生領域の中に単色

細胞が出現する像が高頻度に認められた。これら出現した単色細胞では、元の多色多倍体細胞と比べて倍数性が減少していることを確認するため、Hoechst 染色を用いたイメージサイトメトリーによる倍数性の評価を行った。その結果、同一クローン内の多色多倍体細胞と比べ、出現した単色細胞は低い倍数性を呈していることが確認された。以上の結果、多倍体肝細胞由来の倍数性減少は、Fah 欠損マウスへの細胞移植以外の慢性肝障害肝でも起こることが示された。

【考察】

本研究ではまず始めに、多色の蛍光遺伝子を内在したレポーターマウスを用いることにより、多倍体肝細胞を標識する遺伝子改変マウスモデルを確立した。過去に多倍体細胞の細胞系譜解析法の報告はなく、本研究により確立した多色レポーターマウスを用いた細胞系譜解析によって初めて、以下で述べる様な多倍体細胞のクローン性増殖能を確認することが可能となった。このマウスモデルは肝細胞のみならず、生体内に存在する様々な臓器の多倍体細胞も多色細胞として標識することが可能で、実際、骨格筋細胞や心筋細胞が多色細胞として標識されることを確認している。このため本マウスモデルは、肝以外の様々な臓器でも多倍体細胞の挙動を追うことに有用と考えられる。

本研究では、多色多倍体細胞を FACS により分離し Fah 欠損マウスへ移植することにより、多倍体肝細胞が 2 倍体へと倍数性を減少させられること、さらに倍数性減少により生じた 2 倍体細胞は増殖することにより肝再生に寄与しうることを示した。また倍数性を減少させた後、増殖の過程で 2 倍体細胞は再度多倍体化する、という多様な肝細胞の倍数性の変化を証明した。このような倍数性の変化、特に倍数性の減少はこれまでにほとんど報告がない特異な現象であるとともに、多彩な倍数性の変化を示した後も、肝細胞がクローン性増殖能を有し肝再生に寄与することが初めて明らかとなった。

さらにこのような倍数性の現象は、細胞移植を伴わない慢性肝障害の条件下でも生じていた。肝臓は他の臓器にはない特徴的な再生能力を保持していることを鑑みると、肝細胞の特異な倍数性の動態は肝再生に積極的に寄与している可能性がある。一方、多倍体細胞の増殖は染色体不安定性につながる可能性があり、また特に体細胞減数分裂は染色体の分離異常を伴う危険性が高いことが推測される。そのため、多倍体肝細胞は 2 極、多極分裂を介して染色体異常を伴った娘細胞を生み出し、肝癌の発生母地となっている可能性もある。多倍体肝細胞の増殖過程における染色体安定性については、今後の更なる検討が必要と考えられる。

以上の結果のうち、UBC-CreERT2/Rosa26-Confetti ヘテロマウスを用いた多倍体肝細胞の細胞系譜解析法と、Fah 欠損マウスへの肝細胞移植を用いた体細胞減数分裂に関する実験の結果は、2018 年 6 月にアリゾナ州スコッツデールで開催された FASEB meeting (Fundamental Biology and Pathophysiology of the Liver)において発表を行った（タイトル；Fate tracing of polyploid hepatocytes using multi-colored reporter mice）。また、本研究の結果をまとめた論文を Cell Stem Cell 誌に投稿し、現在一次審査後の修正版の審査中である（タイトル；In vivo lineage tracing of polyploid hepatocytes during regeneration and injury）。