

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23991

研究課題名(和文) 妊娠期特異的組織恒常性を維持する細胞ダイナミクスとその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Cell dynamics and molecular mechanisms of pregnant specific tissue homeostasis

研究代表者

上月 智司 (Kozuki, Satoshi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：60850972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期において、胎児の発生を支えるため母体の肝臓の代謝状態は大きく変化する。しかしながら、肝細胞がこれらの代謝変化にどのような影響を与えるかについてはほとんど明らかになっていなかった。そこで妊娠期において、肝細胞の増殖について詳細に解析したところ、時空間的に制御されていることが明らかとなった。すなわち門脈周囲の肝細胞は妊娠初期に、中心静脈周囲の肝細胞は妊娠後期に増殖していた。妊娠初期における門脈周囲の肝細胞の増殖を阻害することで、肝臓の肥大化および代謝状態の適応が抑制されたことから、門脈周囲の肝細胞増殖の重要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肝小葉内の各ゾーンの最も内側に増殖性の高い肝細胞が存在することが報告されていた。妊娠期の肝臓肥大化において、これらの特殊な肝細胞が関与するかどうかは明らかになっていなかったが、本研究により、各ゾーンに散在する肝細胞が異なるタイミングで増殖することで肝臓が肥大化することが明らかとなった。また、特定のゾーンの肝細胞増殖が個体に与える影響については不明な点が多かったが、妊娠というライフイベントにおいて門脈周囲の肝細胞の増殖が、代謝状態の適応という大きな影響を個体レベルで与えるということが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During pregnancy, maternal liver is challenged by various metabolic demands throughout gestation period. However, hepatocyte adaptation mechanisms and their physiological relevance in pregnancy remains largely unknown. Here we show that hepatocyte proliferation in liver lobules is spatio-temporally regulated in pregnancy, where periportal and pericentral hepatocyte transiently proliferate in early and late gestation period, respectively. Inhibition of hepatocyte proliferation in early phase, but not in late-phase, impairs liver growth, and is associated with maternal metabolic dysfunction.

研究分野：幹細胞学

キーワード：肝臓 細胞増殖 幹細胞 代謝 妊娠

1. 研究開始当初の背景

体を構成する細胞が、ライフステージに伴う生理変化にどのように適応するかという問題は、生命医学領域における重要な研究課題である。近年、妊娠期に乳腺、神経、造血系、表皮など、母体の様々な組織の幹細胞が活性化し増殖・分化することが、報告されている。このような組織幹細胞のふるまいは、母体の生殖機能や胎児の発生に重要であると考えられるが、その制御機構や生理機能は不明な点が多い。妊娠期には、母体の肝臓が短期間で顕著に肥大することが報告されている。さらに、この妊娠期の肝臓肥大化には肝細胞の増殖が伴うことも報告された。この現象は、妊娠に伴う母体の代謝変化と生理機能および正常な妊娠・出産に必須と予想されるが、その分子機構や生理学的意義は不明なままであった。肝臓における機能的な最小単位は、肝小葉と呼ばれる六角形の構造である。肝小葉は、六角形の各頂点部分が、血液が流入する門脈・動脈領域(ゾーン 1)、代謝された血液が流出する中心静脈領域(ゾーン 3)、それらの中間領域(ゾーン 2)のゾーンに区別される。これらの肝細胞は流入した血液を効率よく代謝するため、それぞれのゾーン肝細胞の代謝能力が異なるということが報告されている。また、近年、それぞれのゾーンに増殖能力の高い肝細胞が存在するという報告がいくつかなされている。ある種の肝障害からの回復期においては、ゾーン 1 領域の門脈周囲に存在する Sox9 陽性の肝細胞、またはゾーン 3 領域の中心静脈周囲に存在する Axin2 陽性の肝細胞が優位に細胞分裂を繰り返し肝臓の再生に寄与するというものであるが、これらの肝細胞が妊娠期の肝臓肥大化についてどのような役割を果たしているかについては全く明らかになっていなかった。またこれらの代謝状態の異なる細胞が増殖することによって妊娠期にどのような影響を与えているのかということについても全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究結果より、妊娠期の肝肥大に伴う肝細胞増殖は時空間的に制御されていることが明らかとなった。具体的には、門脈域周囲の肝細胞は妊娠初期に、中心静脈域周囲の肝細胞は妊娠後期に増殖していた。これらの肝細胞増殖は妊娠の継続および胎児の発生に重要な役割を持つものと考えられるが、その分子機構や生理学的意義は不明であった。また機能的に同一であると考えられている肝細胞が、その存在する場所によって異なるタイミングで増殖を開始するメカニズムについても不明な点が多かった。

そこで、本研究では、妊娠期における肝細胞のゾーン依存的な増殖制御メカニズムおよび、母体代謝と生殖機能における肝細胞の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 妊娠期における肝細胞の増殖ダイナミクス

妊娠期において各ゾーンの肝細胞の増殖プロファイルを得るため、細胞系譜追跡実験を行う。AAV8-Cre をレポーターマウスへ低濃度で感染させることで、各ゾーンの肝細胞をスパースにラベリングした。その後、交配し妊娠したものと、妊娠していないものを比較し、クローンサイズの変化より妊娠期における各ゾーンの肝細胞がどのように増殖するのかという増殖プロファイルを取得した。

(2) 妊娠期における肝細胞の増殖制御機構

妊娠期における各ゾーンの肝細胞の増殖制御機構を明らかにするため、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法および、RNA-seq を組み合わせることで各ゾーンの遺伝子発現を網羅的に解析した。非妊娠、妊娠 8 日目および、妊娠 16 日目の肝臓より各ゾーンの肝細胞を顕微鏡下で切り出し、RNA を抽出しその後 RNA-seq を行った。ジーンオントロジー解析および、ジーンセットエンリッチメント解析を行うことにより、妊娠各日の各ゾーンの肝細胞の性質の違いを明らかにした。さらに、パスウェイ解析を行い肝細胞の増殖を促進する上流のシグナルとして、どのようなものが存在するか探索した。

(3) 肝細胞増殖の生理学的意義

妊娠期における肝細胞の増殖の重要性を明らかにするため、AAV8 を用いて肝細胞特異的に p21 タンパク質を強制発現し肝細胞の増殖を阻害した。肝細胞の増殖阻害により肝臓の肥大化が抑制されるか、また、肝細胞増殖および肝臓の肥大化が抑制されたときに母体の代謝状態がどのように変化するのか検討した。

4. 研究成果

(1) 妊娠期における肝細胞の増殖ダイナミクス

レポーターマウスに AAV8-Cre を感染させることで、肝細胞特異的にレポーター遺伝子によるラベルをすることができていた。また AAV8-Cre の力価を調整することで、高濃度に投与すると全肝細胞をラベルでき、また、低濃度に投与するとシングルセルレベルでラベルすることができていた。AAV8-Cre によってラベルされた肝細胞は非妊娠時にはほとんど増殖していなかった。一方、妊娠時にはコロニーが多数観察され、肝細胞の増殖が確認された。また、先行研究と同様に妊娠 8 日目では、ゾーン 1 においてコロニーが観察され、妊娠 16 日目では、ゾーン 3 においてもコロニーの出現が観察されたことから、肝細胞増殖が時空間的に制御されていることが明らかとなった。

肝障害時にはゾーン 1 またはゾーン 3 に存在する増殖能力の高い特殊な肝細胞が優位に細胞増殖を繰り返すことで、新しい細胞を供給することが報告されているが、妊娠期においてこれらの特殊な肝細胞が肝臓肥大化に関与しているかは明らかになっていなかった。そこで、それらのコロニーの位置情報から各ゾーンの肝細胞増殖ダイナミクスを推定したところ、肝障害時とは異なり各ゾーンにおいて等価な細胞増殖が観察された。また Sox9CreERT2 マウスおよび Axin2CreERT2 マウスを用いた実験からも同様に、これらの特殊な肝細胞が妊娠期において優位に増殖しているわけではないことが明らかとなった。

(2) 妊娠期における肝細胞の増殖制御機構

LMD-RNA-seq を用いて妊娠各日における各ゾーンの肝細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、妊娠初期には細胞増殖関連遺伝子の発現、妊娠後期には代謝関連遺伝子の発現が亢進していた。また、各ゾーン間での遺伝子発現量の比率を非妊娠および、妊娠各日で比較することで、妊娠によりその比率が大きく変動する適応的な遺伝子群および、変動しない強固な遺伝子群が存在することが明らかとなった。妊娠期における肝細胞の増殖の中でも妊娠初期のゾーン 1 肝細胞の増殖に関与する遺伝子として hyaluronan mediated motility receptor (Hmnr) を見出した。妊娠期の肝細胞増殖における Hmnr の役割を明らかにするため、AAV8 を用いて shHmnr を肝細胞特異的に強制発現し Hmnr のノックダウン実験を行った。まず、shHmnr 強制発現により、妊娠期における Hmnr の発現上昇が抑制されていることが確認された。さらに Hmnr をノックダウンすることで肝細胞の増殖が阻害されていることが確認された。Hmnr のノックダウンにより妊娠初期においてゾーン 1 肝細胞の増殖が阻害された一方で、妊娠後期におけるゾーン 3 肝細胞の増殖は阻害されていなかったことから、Hmnr がゾーン 1 肝細胞の増殖において重要であるということが明らかとなった。また妊娠初期のゾーン 1 肝細胞の増殖を阻害したところ妊娠期における肝臓の肥大化が抑制されたことから、肝肥大化において肝細胞の増殖が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(3) 肝細胞増殖の生理学的意義

妊娠期における肝細胞増殖の生理学的意義を明らかにするため、AAV8 を用いて p21 を肝細胞特異的に強制発現し肝臓の肥大化および、母体、胎児への影響を検討した。AAV8-p21 を用いて妊娠 8 日目の肝細胞の増殖を阻害することで肝臓の肥大化が抑制されたことから、妊娠期における肝臓の肥大化に肝細胞増殖が重要な役割を持つことが示唆された。一方で妊娠 16 日目に AAV8-p21 を用いて肝細胞の増殖を抑制した場合には、肝臓の肥大化への影響は見られなかった。これの原因としては肝細胞の細胞自体のサイズが大きくなっていることで肝臓の肥大化に寄与したと考えられた。

妊娠期の肝細胞の増殖が阻害され、肝臓の肥大化が抑制された場合に、胎児にどのような影響がみられるか検討したところ、発生に大きな影響は見られなかったが、胎児の体重が増加する傾向がみられた。胎児の体重が増加する症状がみられる疾病として、妊娠期糖尿病がよく知られている。そこで肝臓の肥大化が抑制された場合、母体の代謝状態、特に糖代謝に関してどのような影響がみられるのかについて検討を行った。

まず AAV8-p21 を用いて肝細胞の増殖を阻害したマウスにおいて、妊娠期における絶食時および、随時摂食時血糖値を測定したところ、AAV8-Null (コントロールウイルス) を感染させた群と比較して、上昇していた。このことから、肝細胞増殖阻害によって、妊娠期糖尿病様の症状を呈していたことが示唆された。

妊娠期の肝細胞の増殖が阻害され、肝臓の肥大化が抑制された場合に、母体の代謝状態、特に糖代謝において、にどのような影響があるか包括的に検討するためコントロールおよび AAV8-p21 を強制発現した、非妊娠および、妊娠各日の肝臓サンプルを取得した後、RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。RNA-seq 解析より得られた発現変動遺伝子群を用いてジーンオントロジー解析および、ジーンセットエンリッチメント解析を行った。その結果として、AAV8-p21 を強制発現した群においては、糖新生に関する経路および、糖の輸送に関する経路の遺伝子が多数エンリッチしていた。このことから肝細胞の増殖を阻害することで母体の糖代謝に影響が与えられたことが示唆された。また AAV8-p21 を強制発現した肝臓においてはグリコーゲンの貯蔵量が減少していた。これらの結果より、妊娠期における肝細胞の増殖を阻害することで肝臓の肥大化が抑制され、さらに肝臓肥大化が抑制された状態では、母体の血糖値が上昇し胎児の体重が増加する可能性が示唆された。

以上のことから、妊娠期において肝細胞の増殖が阻害され肝臓の肥大化が抑制されると、母体の代謝状態が妊娠というライフイベントに適応できず、胎児の正常な発生が妨げられる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上月智司
2. 発表標題 妊娠期母体肝臓における肝細胞のダイナミクス解析
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上月智司
2. 発表標題 妊娠期におけるゾーン依存的肝細胞増殖機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上月智司
2. 発表標題 妊娠期肝臓の恒常性を維持する細胞ダイナミクスとその分子基盤の解明
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------