

令和元年 8月30日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19697

研究課題名(和文) 妊娠期における肝幹細胞の活性化機構と生殖機能における役割

研究課題名(英文) Dynamics of hepatocyte and progenitor cells during pregnancy

研究代表者

豊島 文子 (Toyoshima, Fumiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40397576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎生動物である哺乳類では、母体環境が胎児に大きな影響を与える。妊娠期には、母体の複数の臓器でサイズや機能が変化する。特に肝臓は顕著に肥大化することが知られており、母体の代謝機能の昂進に必須と考えられる。本研究では、マウスを用いて、妊娠期における肝細胞の増殖機構について研究を行った。その結果、肝細胞の増殖率は妊娠8日～18日に亢進し、出産後に速やかに低下すること、肝細胞増殖はストキャステイックに起こることが分かった。また、胆管上皮細胞も妊娠初期に増殖能することが分かった。現在、妊娠期における肝細胞・胆管上皮細胞の遺伝子発現変化を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の生殖研究は、卵子・精子の質やiPS細胞から生殖細胞の作出など、配偶子側からの解析が中心であるが、配偶子から個体を得るには、胎児発生の場としての母体の機能を細胞レベルで明らかにする必要がある。妊娠期には、母体の代謝機能が大きく変化する。肝臓は代謝機能を担う第一の臓器であるため、妊娠期における肝臓の細胞ダイナミクスの解明は、安心・安全な妊娠・出産の実現に重要である。本研究により、肝細胞・胆管上皮細胞が妊娠期に増殖亢進することが明らかとなった。今後、この増殖亢進を担う遺伝子やシグナル伝達を明らかにすることにより、妊娠における代謝機能の変化を細胞・遺伝子レベルで解明することができる。

研究成果の概要(英文)：In mammals, maternal environments influence embryonic development. During pregnancy, maternal organs change their size and functions to accommodate fetal growth. The organs that are expanded in the size during pregnancy include maternal liver, which would be important for metabolic change in gestation period. However, little is known how liver parenchymal and nonparenchymal cells are regulated during pregnancy. In this project, we found in mice that hepatocytes and bile duct epithelial cells proliferate at early stage of pregnancy. Cell-trace assay by labeling the hepatocyte progenitor cells and bile duct epithelial cells show that these cells divide and proliferate stochastically during pregnancy. We are now investigating the changes of gene expression profiles in both hepatocytes and bile-duct epithelial cells during pregnancy to identify the responsible genes for their proliferation.

研究分野：幹細胞学

キーワード：妊娠 肝臓 増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎生動物である哺乳類では、母体環境が胎児に大きな影響を与える。現行の生殖研究は、卵子・精子の質や iPS 細胞から生殖細胞の作出など、配偶子側からの解析が中心であるが、配偶子から個体を得るには、胎児発生の際としての母体の機能を細胞レベルで明らかにする必要がある。妊娠期には、造血幹細胞、神経幹細胞、乳腺幹細胞、表皮幹細胞など、母体の複数の臓器において、組織幹細胞・前駆細胞の増殖・分化が促進されることが、我々を含む複数の研究グループから報告されている。このような母体の幹細胞ダイナミクスは、妊娠に伴う母体臓器のリモデリングと機能変化を誘導し、妊娠の継続や胎児の正常な発生に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、母体の各臓器に存在する幹細胞や前駆細胞の増殖・分化についての遺伝子・細胞レベルでの研究は数少なく、生殖機能における役割については不明であった。

2. 研究の目的

妊娠期には、母体の複数の臓器がリモデリングされる。マウスでは、妊娠期において肝臓が肥大化することが知られている。これは、母体の代謝や解毒作用を増進させるためと考えられるが、そのメカニズムは不明である。研究代表者らは、妊娠のごく初期に、肝臓の肝細胞と胆管上皮細胞がともに増殖能を獲得し、その後、肝臓のサイズが急速に拡大することを見出した。このことは、妊娠期において胆管上皮細胞と肝細胞を活性化する何らかのメカニズムが働き、新しい肝実質細胞が供給されていることを示唆している。そこで本研究では、妊娠期における肝細胞・胆管上皮細胞のダイナミクスを妊娠の時系列に沿って解析し、その増殖・分化制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 妊娠における母体肝細胞・胆管上皮細胞のダイナミクス解析

妊娠・出産後における肝細胞ならびに胆管上皮細胞の増殖能の変化について解析した。増殖能は、増殖マーカーKi67での抗体染色ならびにチミジンアナログ EdU の取り込み率の測定により判定した。また、アクチン染色によって細胞輪郭をマークし、妊娠の進行に伴う肝細胞の大きさの変化を測定した。

(2) 妊娠における肝細胞・胆管上皮細胞の細胞系譜解析

肝細胞と2種類の肝前駆細胞(門脈域の Sox9⁺肝前駆細胞と、中心静脈域の Axin2⁺肝前駆細胞)に着目し、その系譜解析を行った。タモキシフェン誘導的にそれぞれをラベルトレースできるマウス(肝細胞: Alb-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFP、Sox9⁺肝前駆細胞: Sox9-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFP、Axin2⁺肝前駆細胞: Axin2-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFP)を作出した。ラベルされたコロニーのサイズを計測することにより、増殖率を測定した。また、肝細胞特異的に感染する AAV8(アデノ随伴ウイルス)に Cre を搭載し、R26-LSL-H2BGFP マウスに静脈注射することで肝細胞をラベルし、妊娠に伴うコロニーサイズの変化を解析した。これらのラベルされた肝細胞について、肝小葉内の代謝ゾーンの各区画に占める割合を妊娠の時系列に沿って測定し、ある特定の肝細胞・肝前駆細胞が、妊娠における肝肥大化に貢献する可能性を検討した。また、タモキシフェン誘導的に胆管上皮細胞ラベルトレースできるマウス(K19-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFP)を作出し、妊娠期における胆管上皮細胞の細胞系譜解析を行った。妊娠期の各ステージで GFP と肝実質細胞マーカー(Afp など)との共染色を行い、胆管上皮細胞が肝実質細胞に分化転換する可能性を検証した。

(3) 妊娠に伴う肝細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルの変化

肝細胞については、非妊娠、妊娠8日、16日の肝臓切片から、マイクロダイセクションにより門脈域、中心静脈域、中間域を切り出して RNA を抽出し、RNAseq により各領域の遺伝子発現を解析した。各領域で増殖期に発現上昇する増殖・分化関連遺伝子に着目し、解析を進める。胆管上皮細胞については、表面抗原マーカーEpCAM を用いて、非妊娠と妊娠マウスの肝臓から胆管上皮細胞を FACS ソートした。RNAseq 解析ならびに qPCR により、妊娠期に mRNA 発現量が変動する遺伝子を同定した。抗体を用いた組織染色により、タンパク質レベルで妊娠期に発現が変動する遺伝子を絞り込む。

4. 研究成果

(1) 妊娠における母体肝細胞・胆管上皮細胞のダイナミクス解析

非妊娠、妊娠6日、8日、12日、16日、18日、出産後1か月の肝臓重量を測定した結果、妊娠8日目から顕著に増加し、16日で最大値となり、出産後約1か月で非妊娠と同レベルに戻ることが観察された。Ki67での抗体染色、EdUの取り込み率を測定した結果、肝細胞の増殖率は妊娠8日～18日に亢進し、出産後に低下することが分かった。また、妊娠初期と後期で肝細胞のサイズが段階的に大きくなる現象が観察された。また、胆管上皮細胞は、妊娠8日目から増殖亢進する結果が得られた。妊娠6日目には、肝細胞の増殖や細胞サイズ上昇は認められなかったことから、妊娠6日～8日の間に、肝細胞の性質を変化させる母体イベントが起こっていることが予想される。

(2) 妊娠における肝細胞・胆管上皮細胞の細胞系譜解析

Alb-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFP、Sox9-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFP、Axin2-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFPマウスを作成して、タモキシフェンを投与し、肝細胞、Sox9⁺肝前駆細胞、Axin2⁺肝前駆細胞をそれぞれラベルトレースした。その結果、どのマウスでも、妊娠期にコロニーサイズが同程度拡大すること、また肝小葉内の代謝ゾーンを超えることは無いことが観察された。R26-LSL-H2BGFPマウスにAAV8-Creを投与し、妊娠に伴うコロニーサイズを計測した結果、どのコロニーも同程度に拡大し、コロニーサイズにばらつきは認められなかった。また、ゾーンの偏りも観察されなかった。以上の結果から、妊娠期には特定の肝細胞集団が増殖するのではなく、各肝細胞はストキャステックに増殖能を獲得することが示唆された。しかし、肝小葉全域に特定の肝前駆細胞が均一に存在し、妊娠にตอบสนองして特異的に増殖している可能性は否定できない。今後、1細胞解析等により肝細胞の不均一性について検証する必要がある。

次に、K19-Cre-ER/R26-LSL-H2BGFPマウスを用いて胆管上皮細胞をラベルトレースした結果、妊娠初期でコロニーの拡大がみられた。しかし、肝細胞への分化転換は認められなかった。従って、妊娠期における肝細胞の供給源は既存の肝細胞であり、胆管上皮細胞からの供給はほぼないと考えられる。妊娠における肝臓の肥大化に適応するため、胆管上皮細胞は増殖能を獲得して胆管を伸長させていると予想される。今後は、増殖能を獲得する胆管上皮細胞の特異性の検討、胆管上皮細胞と肝細胞の増殖を協調させるメカニズムの解明が必要である。

(3) 妊娠に伴う肝細胞と胆管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルの変化

非妊娠と妊娠8日の胆管上皮細胞を表面抗原であるEpCAMを用いてFACSソートし、RNAseq解析を行った。その結果、特定のシグナル伝達機構や分泌因子の発現が増加していることが分かった。現在、この因子の機能について検討中である。また、非妊娠、妊娠8日、16日の肝臓切片から、マイクロダイセクションにより門脈域、中心静脈域、中間域を切り出してRNAを抽出した。現在、RNAseq解析を実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

上月智司、豊島文子、Dynamics of liver stem/progenitor cells during pregnancy、第15回幹細胞シンポジウム、2017年

上月智司、豊島文子、妊娠期における、肝細胞・肝幹細胞の時空間依存的細胞分裂による肝細胞再編成機構の解析、生命科学系学会合同年次大会、2017年

上月智司、豊島文子、妊娠期における肝前駆細胞のダイナミクス第24回肝細胞研究会、2017年

上月智司、豊島文子、肝臓内ゾーン依存的な妊娠期母体肝細胞再編成機構の解析、第41回日本分子生物学会年会、2018年

Elizabeth Shimoura, Riki Ishibashi, Sachiko Kamakura, Satoshi Kozuki, Hideki Sumimoto, Fumiko Toyoshima、Mechanisms of Hepatocyte Division During Pregnancy、第41回日本分子生物学会年会、2018年

Satoshi Kozuki, Fumiko Toyoshima、Zonation-dependent hepatocytes dynamics during pregnancy、25th East Asia Joint Symposium、2018年

上月智司、豊島文子、肝細胞の時空間依存的細胞分裂による妊娠期母体肝細胞再編成機構の解析 第25回肝細胞研究会、2018年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/Toyoshima-HP/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。