

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19885

研究課題名（和文）ヘテロな肝細胞の生理学的役割分担の解明と創薬や医療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the physiological role of heterogeneous hepatocytes and its application to drug discovery and medicine

研究代表者

酒井 康行（Sakai, Yasuyuki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：00235128

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）：成熟肝細胞の核型は多様で、さらに約60%は二核であるが、そのヘテロ性の生理学的な役割は不明である。本研究では、ヘテロな肝細胞の生理学的役割分担の解明と創薬や医療への応用を目的とした。まず、二核を単一の核に分離するための条件を検討した。細胞骨格形成阻害剤処理後に細胞質を溶解することで、二核がそれぞれ形を保持したまま単核に分離可能であることを見出した。また、この条件下で細胞質RNAが十分除去可能であることを確認した。さらに、分離した同一細胞由来の二核をオートマニピュレーターで個別回収し、単一核からRNA-seq用ライブラリを作成することで、同一細胞内の核ごとの遺伝子発現解析への道筋を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞のヘテロ性の生理学的役割の解明を目指す本研究は、肝臓のZonationのメカニズム理解に直結し、肝臓・肝細胞の培養系や数値モデルの精緻化による創薬や医療への貢献につながる重要な成果となる。メカニズムにもとづくボトムアップ的な肝臓の理解を達成することで、世界に類を見ないバーチャル肝臓の構築に発展しうる。バーチャル肝臓による薬物応答ダイナミズムの高精度な予測やその個別テーラーメイド化は、近未来の創薬や医療のスタンダードになると考えられ、本研究はその進展に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Hepatocytes have diverse karyotypes and approximately 60% are binuclear. However, the physiological role of their heterogeneity is still unknown. The aim of this study was to elucidate the physiological role of heterogeneous hepatocytes and their application in drug discovery and medicine. First, we examined the conditions to separate the binuclei into a single nucleus. We found that by lysing the cytoplasm after treatment with an inhibitor of cytoskeleton formation, the binuclei could be separated into a single nucleus without damaging their shapes. We also confirmed that cytoplasmic RNA could be sufficiently removed under these conditions. Furthermore, the two separated nuclei derived from the same cell could be collected separately using an auto-manipulator, and a library for RNA-seq was created from each single nucleus. Those findings and methodologies paved the way for gene expression analysis of each nucleus in the same cell.

研究分野：再生医工学

キーワード：肝細胞 創薬支援デバイス 肝機能

1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体内における代謝機能の中核を担っている。肝臓の最小構成単位である肝小葉では、門脈から中心静脈に向かって類洞と呼ばれる毛細血管内を血液が流れる過程で、数百種類もの代謝が肝細胞内で行われる。この膨大な役割を効率的に行うため、類洞に沿って並ぶ肝細胞には位置(Zone)に応じた役割分担 (Metabolic Zonation)があることが知られている(図1)。この Metabolic Zonation によって、アセトアミノフェンによる肝毒性や繊維化などの肝疾患が Zone 特異的に起こるとされる。しかし、Zonation を惹起するメカニズムや関与する因子など不明な点が多いことから、現状の肝細胞培養系や肝代謝数理モデルは肝臓を均一な臓器として扱ったものが主流となっている。よって、Metabolic Zonation を惹起するメカニズムを解明し、それを再現する培養系や数理モデルを構築することができれば、化学物質の薬効・毒性や肝疾患の正確な評価につながることを期待される。

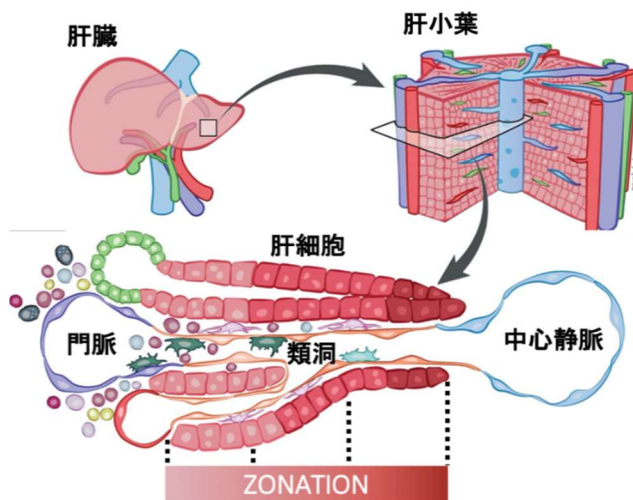


図1 肝小葉内の位置に応じた肝細胞の役割分担

Zonation を惹起する因子としては、類洞内における酸素やホルモンなどの物質濃度勾配や Wnt など局所的な細胞間シグナルによる制御が挙げられる。一方、細胞に視点を移すと肝細胞自体にもヘテロ性が存在する。肝細胞には単核細胞と二核細胞が混在しているうえ、一つの核に含まれる染色体数も通常の  $2n$  の他に、 $4n$  や  $8n$  といった様々な核型(染色体倍数性)の肝細胞が存在する(図2)。また、近年では核型によって肝小葉内での分布が異なることが明らかとなり、核型分布と Zonation との関係が示唆されている。しかし、これらの直接的関係は未解明であり、類洞内の物質濃度勾配との相互作用や寄与率なども不明であり、Zonation のメカニズム解明には程遠い状態である。

核型		染色体総数
単核細胞 $2n$	$2n$	<b><math>4n</math></b>
二核細胞 $2n+2n$	$2n, 2n$	
単核細胞 $4n$	$4n$	<b><math>8n</math></b>
二核細胞 $4n+4n$	$4n, 4n$	
単核細胞 $8n$	$8n$	

図2 肝細胞の様々な核型

また、成熟ラットでは二核細胞が肝細胞全体の約 60 % を占めることが知られている(図4)。それにも関わらず、二核細胞の生化学的役割や Zonation に与える影響は不明である。この理由として、従来の 1 細胞遺伝子発現解析では、二核細胞内の二核の差異が検証できないという問題点があった(図5左)。例えば、1 細胞遺伝子発現解析により、二核細胞  $2n+2n$  と単核細胞  $4n$  の間には Zone 特異性が知られた一部の遺伝子発現パターンに差異があることが報告されている(図6)。しかし、この結果からは、単核細胞と二核細胞の遺伝子発現プロファイルの差異しか検証されず、二核細胞の生化学的役割の検証には十分ではない。メカニズムベースで二核細胞の生化学的役割を解明するためには、細胞レベルではなく「核」における遺伝子発現を調べることが不可欠である。特に、二核細胞内の二つの「核」の遺伝子発現を比較することが非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、近年広く用いられるようになったシングル核遺伝子発現解析を検討する(図5右)。しかし、二核細胞のシングル核遺伝子発現解析は世界的にも未達成である。

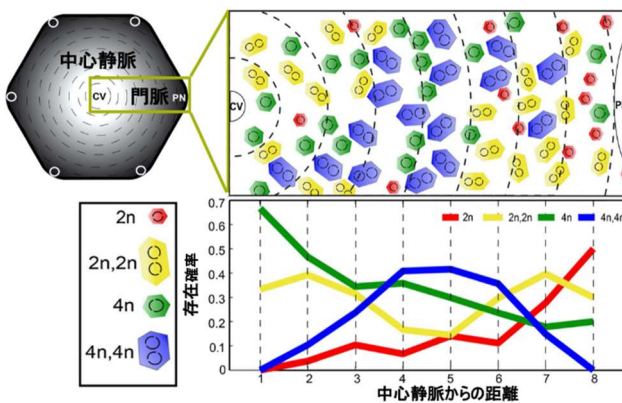


図3 肝小葉内での核型の規則的な分布

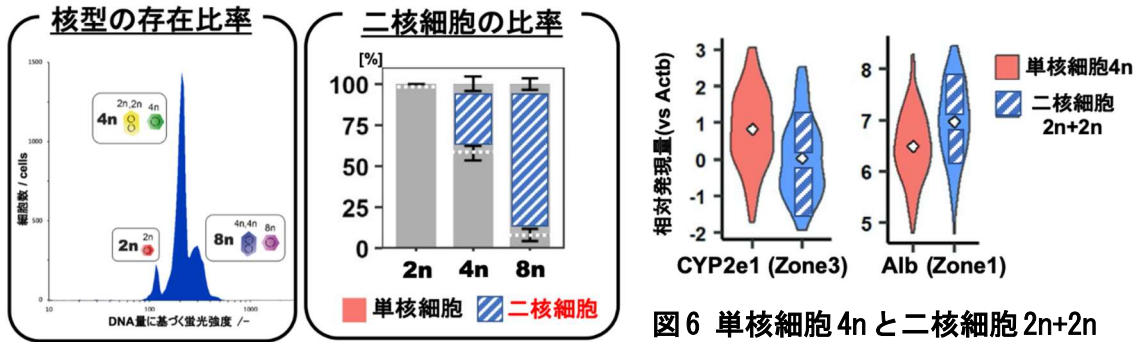


図4 成熟ラットの二核細胞の存在割合

図6 単核細胞4nと二核細胞2n+2nの遺伝子発現の比較

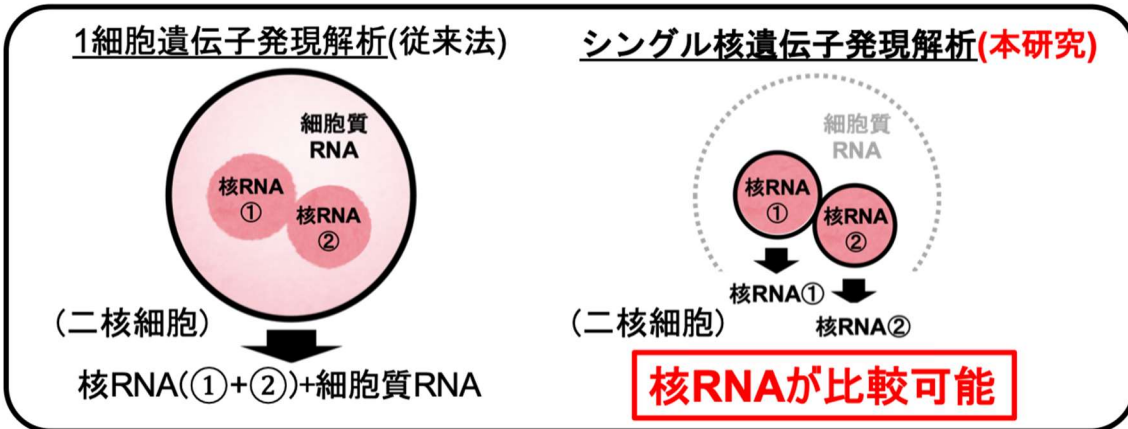


図5 二核細胞の1細胞遺伝子発現解析(左)とシングル核遺伝子発現解析(右)の違い

## 2. 研究の目的

本研究では、約60%が二核細胞である成熟ラット肝細胞について、二核細胞内の二核を単一の核に「分離」し、分離後の二核を個別回収することでシングル核レベルでの遺伝子発現プロファイルを明らかにする。これをもとに二核細胞内の核間の相互作用や機能分担等の可能性を検証し、未解明であった二核細胞の生理学的役割やZonationに与える影響を明らかにする。遺伝子や核レベルからメカニズムベースかつボトムアップ的に肝臓を理解することを目指す本研究は、将来的には *in silico* バーチャル肝臓の構築などにつながるものであり、創薬や医療への大きな貢献が期待される。

## 3. 研究の方法

二核細胞のシングル核遺伝子発現解析を行う際の最大の技術的障壁は「二核の分離」である。単核細胞では、界面活性剤を用いて細胞質を溶解後、マニピュレーター操作によりサンプル調製が可能である。一方で、二核細胞の場合は、細胞質溶解後に細胞骨格等のタンパク質でつながっている「二核の分離」が必要であり、この「二核の分離」が二核細胞のシングル核遺伝子発現解析を困難にしていると考えられる。そこで本研究においては「二核の分離」に注力し、化学的処理による「二核の分離」を検討した。また、分離後の二核はマニピュレーター操作により個別回収した。

肝細胞はラット(メス・8週齢)より単離した。細胞質の溶解には界面活性剤を用いた。細胞質溶解前後での核と細胞質RNA、及び細胞骨格を可視化した。

化学的処理として、タンパク質を特異的に分解する酵素である(i)トリプシン EDTA と(ii)プロテイナーゼK、並びにアクチン重合に



図7 超微小液量操作による1細胞ピッキング・ハンドリング装置(ヨダカ技研)



より形成される細胞骨格を脱重合させる (iii) 細胞骨格形成阻害剤ラトランクリン B を検討した。(i) (ii) については細胞質溶解後に添加しそれぞれ 10 分間、5 秒間反応させた。(iii) については細胞質溶解前に添加し 1.5 時間反応させた。処理前後での二核を共焦点顕微鏡で観察した。蛍光画像における核の形と二核間距離を指標に各条件の評価を行った。「二核の分離」後、先端のガラスニードルの径が 30  $\mu\text{m}$  のオートマニピュレータを用いて二核を個別回収した(図 7)。

#### 4. 研究成果

胞質溶解前後での核と細胞質 RNA の蛍光画像から、細胞質溶解後には細胞質 RNA はほとんど残存しておらず核 RNA の純化が確認された(図 8)。また、細胞質溶解前後での細胞骨格の可視化から、細胞質の溶解後も細胞骨格は残存し、二核は分離されないことが分かった(図 9)。

タンパク質分解酵素処理である (i) トリプシン EDTA と (ii) プロテイナーゼ K による処理では、共にかろうじて二核は分離したもの、いずれも核膜の膨張や破壊を伴った(図 10)。これより個別回収後の二核の核 RNA 純度の低下が予想される。

(iii) 細胞骨格形成阻害剤処理では、ラトランクリン B を添加せずに細胞質を溶解した二核(図 11②') では、細胞骨格が残存し二核は分離されなかった。それに対し、ラトランクリン B 処理後(図 11③)に細胞質を溶解した二核(図 11③)では、二核が形を保持したまま鮮明に分離することが確認された。わずか 1.5 時間で細胞骨格形成が阻害された理由としては、アクチンの重合による細胞骨格形成のターンオーバーが非常に早いということが考えられる。

以上の検討より、(iii) ラトランクリン B 処理が「二核の分離」において非常に有力な化学的処理であることが確認された。また、この条件下でオートマニピュレーターを用いて二核を個別回収した。

個別回収した分離後の二核のシングル核遺伝子発現解析を行い、二核細胞内の二核の機能分担や相互作用の可能性等を検証する。これにより二核細胞の生化学的役割や Zonation に与える影響を解明し、肝機能のボトムアップ的理解に資する知見とする。将来的には、他臓器内の多核細胞や、多核化した癌細胞に対しても本研究のシングル核遺伝子発現解析手法を応用することで、生命現象の一層の理解や、再生医療、創薬効率化等への貢献が期待される。

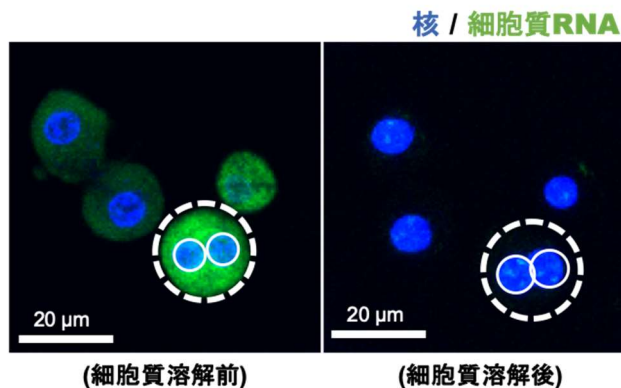


図 8 細胞質溶解前後での核と細胞質 RNA の

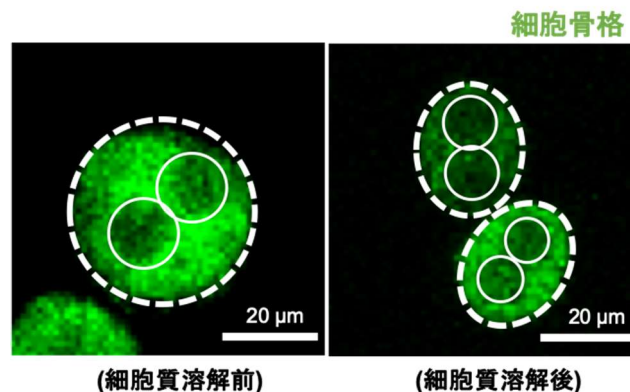


図 9 細胞質溶解前後での細胞骨格の可視化

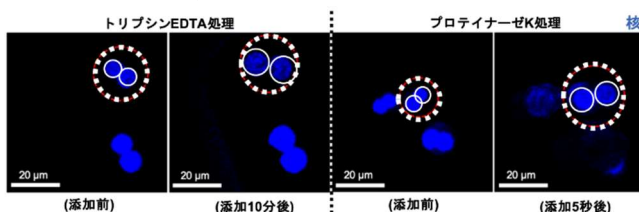


図 10 (i)トリプシン EDTA 処理(左)と(ii)プロテイナーゼ K 処理(右)前後での二核の様子

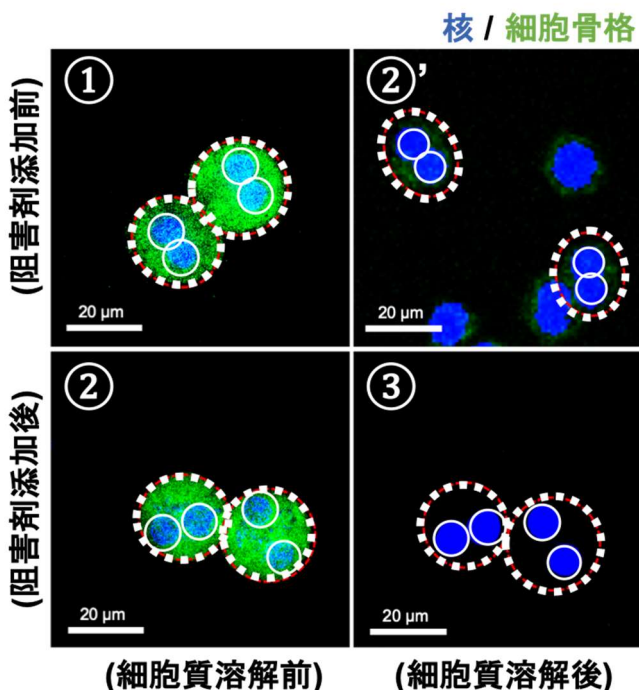


図 11 (iii)ラトランクリン B 処理(①→②→③)での二核の様子(②'は阻害剤無添加での細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	西川 昌輝  (Nishikawa Masaki)  (40843149)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師   (12601)	
研究分担者	新宅 博文  (Shintaku Hirofumi)  (80448050)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・理研白眉研究チームリーダー   (82401)	

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