

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 保坂 和徳  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 907 号  
学位授与の日付 令和2年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Transcriptomic Dissection of Hepatocyte Heterogeneity: Linking Ploidy, Zonation, and Stem/Progenitor Cell Characteristics  
(トランスクリプトーム解析が示す肝細胞不均一性 ～倍数性、肝内分布、幹/前駆細胞の観点から～)  
論文審査委員 主査 教授 若井 俊文  
副査 教授 平島 正則  
副査 講師 坂田 純

博士論文の要旨

[背景と目的]

肝細胞における倍数性は広く認知されているが、その生物学的重要性についてはほとんど知られていない。げっ歯類においては誕生時の肝細胞には2倍体しか存在しないが、離乳が始まると状況は一変し、成熟したげっ歯類においては肝細胞の90%が4倍体で形成され、それ以上の倍数体も存在するようになる。この仕組みは古くから認識されているものの、異なる倍数性を持つことの意義に関しては未だ解明されていない。最近になって肝細胞の倍数性に関する研究が少しずつ進み、倍数性の違いが表現型として現れることが示されている。Wangらは中心静脈周囲の *Axin2* 陽性細胞には2倍体肝細胞が多く、肝細胞のターンオーバーに関わっていることを示した。また、申請者らのグループでは2倍体の肝細胞が4倍体や8倍体の肝細胞と比較して、低分子化合物の成長刺激に反応し *in vitro* での爆発的な増殖能力を呈することを示した。しかしながら、これらの研究は人工的なある特定の状況下における現象に着目する結果となっており、より普遍的で生理的な状態における倍数性の研究が求められていた。そこで、本研究ではこの生理的な状態下における倍数性の違いに着目することとし、マイクロアレイ解析でそれぞれの倍数体集団における違いを比較し、さらに single cell PCR (以下 scPCR) を併用することでそれぞれの集団内における不均一性についても明らかとすることを目的とした。

[方法]

申請者らはマイクロアレイ解析の手法を用いて、倍数性の違いによる肝細胞の不均一性を調べることとした。加えて、scPCR解析の手法を用いることで、2倍体肝細胞および4倍体肝細胞の集団内における不均一性にも着目することとした。

[結果]

マイクロアレイ解析では典型的な肝細胞マーカー (*Serpina1*, *Tf*, *Ttr* など) はそれぞれの倍数体で違い

が見られず、それぞれの倍数体が異なった細胞ではなく、肝細胞であることが証明された。また、8倍体肝細胞において cell cycle 関連の遺伝子が増加していることを確認した。一般的に生理的な環境下での倍数化は細胞質分裂の失敗によって引き起こされるとされており、この結果は生理的な環境下での実験検証がなされていることの証拠だと考えられた。続いて倍数性に伴う肝細胞の分布の違いについて検証した。肝小葉は一般的に3つの zone に分類され、zone1 (門脈周囲)、zone3 (中心静脈周囲)、zone2 (zone1 と 2 の中間領域) とされている。この分布は代謝や分泌機能といった表現型と直結しており、分布の違いは機能の違いに直結すると考えられる。申請者らは2倍体肝細胞で zone3 に特徴的な遺伝子発現が有意に高くなっていることを確認し、2倍体肝細胞は中心静脈周囲に多く分布している可能性が示された。

しかし、これらの結果のみでは倍数性の違いに伴う表現型の違いが、細胞集団全体から形成されているのか、集団内の一部の特殊な集団から起きているのかは判断ができない状態であった。特に肝前駆細胞のような少数と考えられる細胞について検討する際は、より個の状態を観察しなければならないと考えられた。そこで、2倍体と4倍体肝細胞について scPCR 解析を行うことで、特殊な集団の存在に迫っていくこととした。scPCR 解析では *Epcam*, *Lgr5*, *Prom1*, *Axin2* といった肝前駆細胞のマーカーが2倍体肝細胞で上昇していることが明らかとなり、特にマイクロアレイ解析では検出することができなかった *Lgr5* 陽性の2倍体肝細胞がごく少数存在することが示された。また、これら肝前駆細胞のマーカーを強発現する一部の2倍体肝細胞が存在することが示された。

#### [考察]

本研究は2倍体の肝細胞が優先的に中心静脈に存在し、2倍体肝細胞の一部の集団は肝前駆細胞のマーカーを発現しているという新たな知見を示した。特に肝前駆細胞の存在については依然として議論の余地がある領域だが、申請者らの scPCR 解析の結果は肝前駆細胞の存在に関して直接的な証拠を示しており、*Lgr5<sup>+</sup>Prom1<sup>+</sup>Axin2<sup>+</sup>* の細胞がその候補であると考えられた。

今後は同様のコンセプトをさらに single-cell RNA sequencing に広げることで、肝細胞の倍数性および肝前駆細胞についてより深い知識が得られるものとする。

#### 審査結果の要旨

肝細胞における倍数性は広く認知されているが、その生物学的重要性についてはほとんど知られていない。本研究ではマイクロアレイ解析の手法を用いて、倍数性の違いによる肝細胞の不均一性を調べることとした。加えて、single cell PCR (以下 scPCR) 解析の手法を用いることで、2倍体肝細胞および4倍体肝細胞の集団内における不均一性にも着目することとした。8倍体肝細胞において cell cycle 関連の遺伝子が増加していることを確認した。2倍体肝細胞で zone3 に特徴的な遺伝子発現が有意に高くなっていることを確認し、2倍体肝細胞は中心静脈周囲に多く分布している可能性が示された。scPCR 解析では *Epcam*, *Lgr5*, *Prom1*, *Axin2* といった肝前駆細胞のマーカーが2倍体肝細胞で上昇していることが明らかとなり、特にマイクロアレイ解析では検出することができなかった。 *Lgr5* 陽性の2倍体肝細胞がごく少数存在することが示された。また、これら肝前駆細胞のマーカーを強発現する一部の2倍体肝細胞が存在することが示された。本研究は2倍体の肝細胞が優先的に中心静脈に存在し、2倍体肝細胞の一部の集団は肝前駆細胞のマーカーを発現しているという新たな知見を示した。特に肝前駆細胞の存在については依然として議論の余地がある領域だが、申請者らの scPCR 解析の結果は肝前駆細胞の存在に関して直接的な証拠を示しており、*Lgr5<sup>+</sup>Prom1<sup>+</sup>Axin2<sup>+</sup>* の細胞がその候補であると考えられた。本研究成果を *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* に誌上发表しており、学位論文として価値のある研究成果であると判断しました。