

論文の内容の要旨

MULTIDIMENSIONAL QUANTITATIVE IMAGING OF TISSUE REGENERATION PROCESS IN CHRONICALLY INJURED MOUSE LIVER

(マウス肝臓の慢性障害時の組織再生過程の多次元定量画像解析)

神元 健児

背景・目的

肝臓は生体の恒常性維持に必須の臓器であり、薬物や毒素、ウイルス感染、外科的な肝部分切除などによる障害から回復する高い再生能力を有することが知られている。肝臓は様々な細胞種により構成されるが、肝上皮組織は、代謝や生体分子の合成などの肝機能の大半を担う肝細胞と、肝細胞の産生する胆汁を排泄する管（胆管）を形成する胆管上皮細胞に二分される。通常、発生過程を終了した成体の肝臓の上皮細胞が細胞増殖やターンオーバーを行うことはなく、ほぼ全ての細胞が静止状態で保たれる。しかし、細胞の障害や組織の損失が引き起こされると、残存する細胞が増殖し再生が行われる。通常時、胆管は肝臓中に走行する門脈の周囲に限局しているが、肝臓が重篤あるいは慢性的な障害を受けた際、胆管上皮細胞が劇的に増殖・伸展する応答反応（胆管増生）がヒトの肝疾患や動物病態モデルにおいて観察される。胆管増生は、肝臓の障害・病態時に見られる現象であり、肝障害モデルマウスで胆管増生を抑制すると病態が悪化することから、胆管増生が肝再生に重要な役割を持つことが示唆されてきた。また、胆管は複雑かつ微細な三次元組織構造を有し、肝障害時にみられる胆管増生は三次元組織構造の激しい形態変化を伴うことが当研究室の専攻研究により明らかになっている。しかし、胆管増生の肝再生における役割や、劇的な胆管上皮組織の増殖機構と構造変化に関しては不明な点が多く残されている。筆者は、多次元画像解析を中心とした新規実験系を構築し、これらの画像解析の手法を用いて、これまで不明だった胆管増生の実体や役割を明らかにすることを目的に、「組織増殖機構」と「肝再生における役割」の二つの視点から、胆管増生と肝再生の実態を明らかにすることを目指し研究を行った。

方法と結果

(1) 単一細胞の定量モデリングによる組織増殖機構の解析

胆管上皮組織は複雑な三次元立体構造を持つため、胆管上皮組織中の組織増殖過程を単一細胞レベルで定量的に解析することは従来困難であり、その増殖の実態の多くは不明であった。本研究ではまず、立体組織の三次元免疫組織化学法の改良と組織透明化法の適応により胆管の三次元構造を正確に撮影する実験法を確立し、その画像解析法と遺伝子改変マウスによる細胞系譜追跡実験と組み合わせることで、マウス体内の単一細胞を長期間追跡し、細胞分裂の回数を正確に測定できる実験系を構築した。本研究では単一細胞ごとの挙動の違いに注目し、多数のサンプルについて単一細胞の細胞分裂の回数を継時的に計測し、増殖細胞の分布を調べることで、細胞増殖を定量的にモデル化することを目指した。約 1400 の単一細胞由来の細胞集団の細胞増殖の定量的結果、胆管上皮組織中の細胞には、増殖能力に関して広範な不均一性が認められた。

次にこれまで得られた定量実験データを再現するような数理増殖モデルの作成を試みた。一般的には古くから胆管上皮細胞の増殖に関しては組織幹前駆細胞の存在が示唆されていたが、その実態は不明であった。自己複製を安定的に行いながら娘細胞を供給するような古典的な幹細胞の分裂の数理モデルのシミュレーションでは、本研究の定量的結果得られた広範な不均一性を伴う細胞数の分布は説明できず、増殖性細胞集団に属する細胞が、高増殖状態から静的な状態へと一定の確率で不定期に遷移するような、確率的な運命変化を伴う増殖モデル（確率モデル）により説明できることが明らかになった。作成したモデルの妥当性を検証するため、得られた増殖モデルにより推定されたパラメータに関する追加の検証実験を行い、推定されたモデルの妥当性の確認を行った。

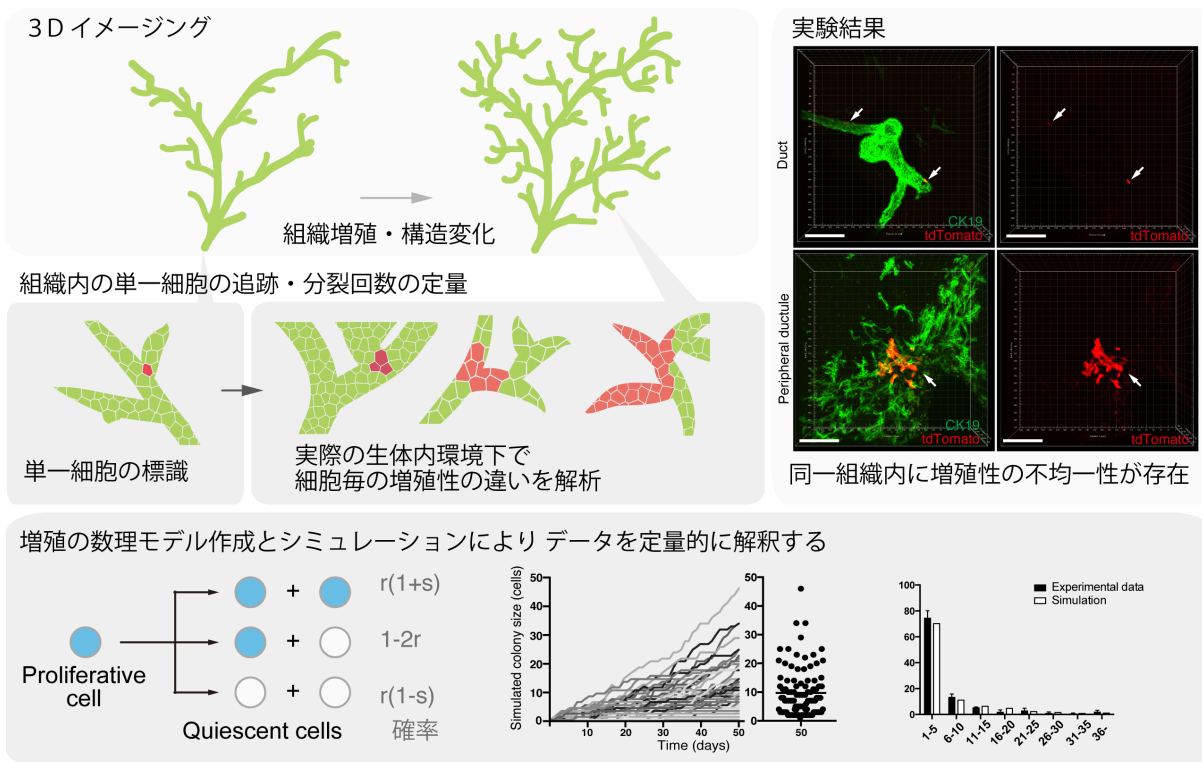


図 1：胆管上皮細胞増殖の定量モデル化の概略

(2) 成体マウス肝臓のライブイメージングによる胆管増生の肝再生に対する役割の解析

肝臓の再生過程において胆管増生の必要性は示されてきたが、胆管増生がどのように肝再生に寄与するのか、またどのように胆管増生が誘導されるのかは不明なままであった。本研究課題では、胆管の主要な機能の一つである胆汁運搬に焦点をおき、肝障害・再生時の胆管増生の役割を明らかにする事を試みた。

まず、マウス生体内の胆汁運搬を直接可視化する実験系の構築を行った。胆汁流は固定した組織サンプルでは失われてしまうため、一般的な組織切片の観察では解析することが困難であり、その微細な流れの解析には成体の条件下で解

析することが求められる。そこで、麻酔下で開腹した生体マウス肝臓を二光子顕微鏡で観察し、実際の成体の条件下での解析を行った。その際、肝臓を二光子顕微鏡のステージに固定するための新規デバイスの開発により、従来法よりもより組織へのダメージを抑えつつ、高解像度で複雑な三次元構造を可視化することが可能になり、繊細かつ複雑な三次

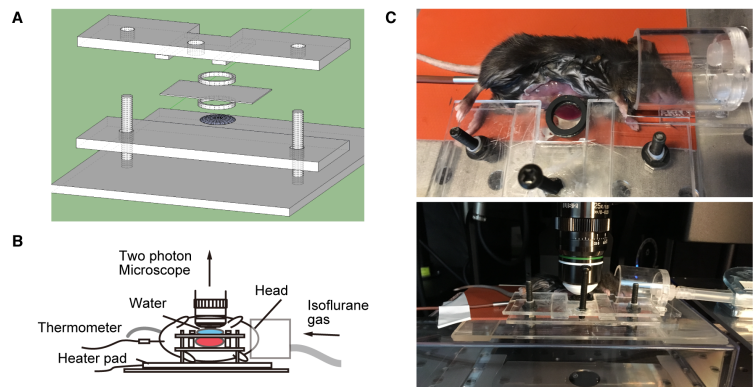


図2：マウス肝臓の生体観察

元構造をもつ胆汁の流路の解析が可能になった (図2)。胆汁を可視化する蛍光プローブをマウス静脈に投与すると、蛍光胆汁が肝細胞に取り込まれて胆管に排出されるので、この実験系で胆汁の流路を可視化し、(1)の研究課題で作成した三次元組織染色・可視化の実験系と組み合わせて、胆管増生時の胆汁の流路、およびそれに関連する組織構造変化の解析を行った。その結果、様々な肝再生モデルにおいて「毛細胆管網の崩壊」が障害初期に生じ、その崩壊に応答するように胆管増生が起こることが示された。毛細胆管網は、肝細胞同士の細胞接着により形成される微細な細胞間隙ネットワークであり、通常は胆汁の流路の一つとして機能しているが、肝障害に付随する様々な要因により破壊されることがわかった。

これまでの結果から、胆管増生は失われた毛細胆管のネットワーク構造を代償するための新たな胆汁排出ネットワークを形成する役割を担うことが示唆された(図3)。この仮説の検証の一つとして、マウス肝臓への *in vivo* 遺伝子導入と、CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子ノックアウト法を利用し、毛細胆管の構造と機能の維持に必須の遺伝子をマウス肝臓でノックアウトする実験系を新たに構築し、それを用いて遺伝子ノックアウトに基づく「人為的な毛細胆管の崩壊」をマウスに誘導し、それにより胆管増生が生じるかどうかを検証した。その結果、人為的な胆管網の崩壊により、肝障害時にみられるような胆管増生が引き起こされることがわかった。

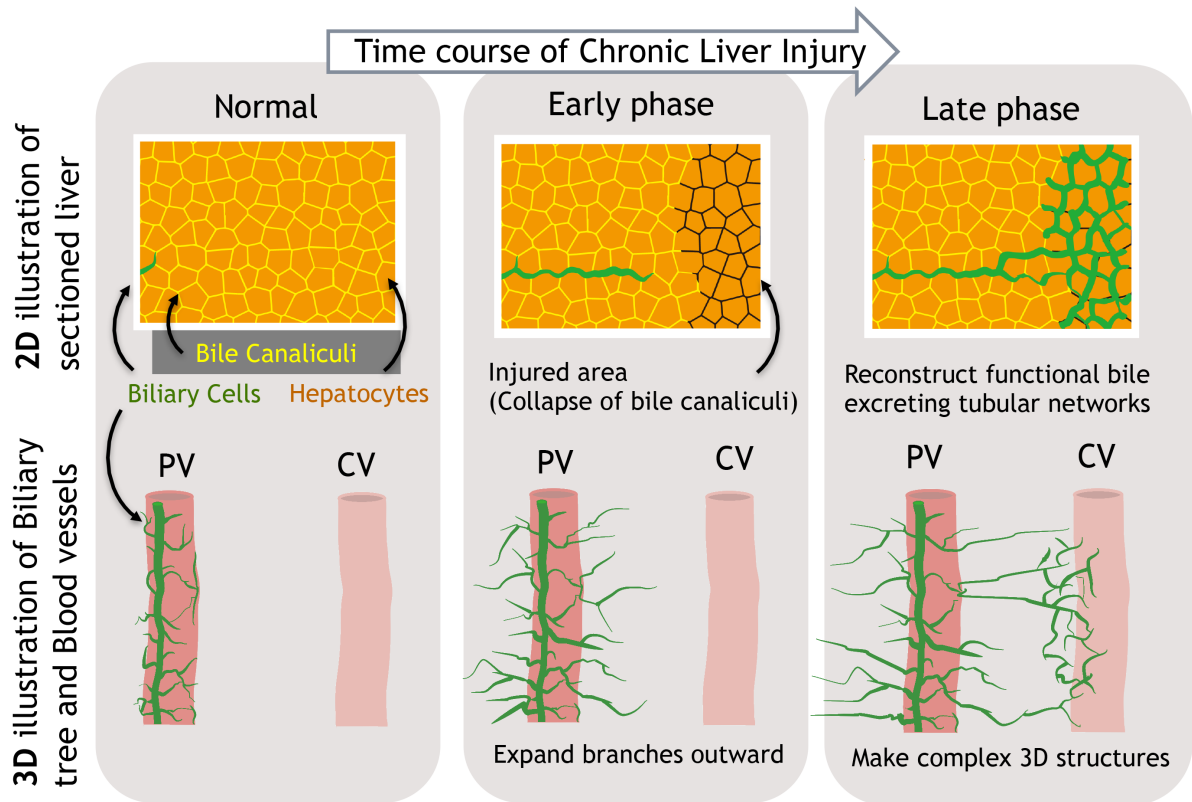


図3：研究課題2の仮説

考察

本研究では新規画像観察・解析系の構築を主軸として、肝再生時に広く見られる現象である胆管増生についての解析を2つの視点から行った(図4)。

組織増殖機構の解析から、組織中の細胞における増殖能の不均一性とそれを支持する特殊な増殖能維持機構が示された。ここで示唆された増殖機構は、造血幹細胞や表皮幹細胞で報告されたモデルとの共通点を持ち、普遍的な組織増殖機構の存在が示唆される。

また、本研究では様々な病態や動物モデルで見られる胆管増生という現象を、胆汁排出のネットワークの観点から、統一的に解釈できる仮説を提唱した。胆汁排出ネットワークの再構成が胆管増生の実態であるという仮説は、肝障害時にみられる胆管増生の新たな役割を提唱するだけでなく、複雑な三次元形態の形態形成機構も説明することが可能である。今後は、今回発見した現象や仮説の背後に存在する分子機構解明や、肝疾患への治療戦略への応用などを検討していきたい。

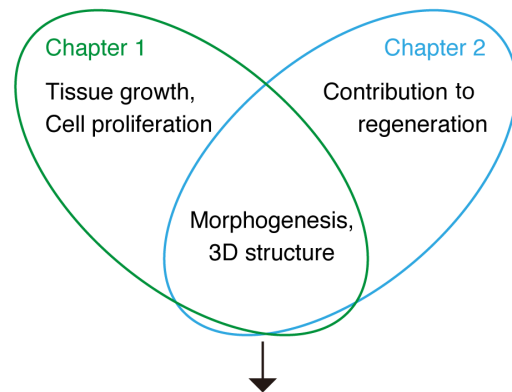


図4：本研究の目的と構成