

## <要約公表>

### Characterization and role of collagen gene expressing hepatic cells following partial hepatectomy in mice

(マウス肝切除後のコラーゲン遺伝子発現細胞の特徴と役割について)

背景と目的：一般臨床において肝切除後に肝再生が起こることは既知の事実であるが、そのメカニズムについては今日明らかでないことも多い。当研究はマウス肝切除後にコラーゲン遺伝子を発現する細胞がどのような特徴を有しているのか、またこれらの細胞が肝再生において果たす役割について明らかにすることを目的としている。

方法：コラーゲン遺伝子プロモーター下に GFP 遺伝子組み込んだトランスジェニックマウス (Col-GFP マウス) をコラーゲン遺伝子発現細胞の同定に用いた。Col-GFP マウスに対して 70%肝切除を行い、術後 3 日目に下大静脈からコラーゲナーゼ還流を行い、細胞間接着の溶解を行った後、密度勾配遠心法により Non-parenchymal cell を分離した。この Non-parenchymal cell から GFP 陽性細胞を FACS により抽出し、シングルセル RNA シークエンスにて網羅的な遺伝子解析を行った。さらにコラーゲン遺伝子プロモーター下に ER Cre 遺伝子を組み込んだマウス (Col-ER Cre マウス) をレポーターマウス (ROSA-RFP マウス、ROSA-DTA マウス) とそれぞれ交配させた仔マウス (Col-ER Cre/RFP マウス、Col-ER Cre/DTA マウス) をコラーゲン遺伝子発現細胞の追跡、もしくはコラーゲン遺伝子発現細胞の細胞死による肝再生への影響の解析に用いた。

結果：肝切除後 3 日目の肝組織標本にて GFP 蛍光面積の増加を認め、7 日目以降では減少した。免疫染色では parenchymal area にて GFP 陽性となっている細胞は desmin 陽性、 $\alpha$  SMA 一部陽性であり、肝星細胞であると考えられた。肝切除後 3 日目の肝組織内の GFP 陽性細胞をシングルセル RNA シークエンスにより解析を行った。コントロールは四塩化炭素による肝硬変モデルにおける GFP 陽性細胞とした。この中でコラーゲン遺伝子を発現する肝星細胞は 3 つのクラスターに分かれることが確認され、それぞれ "Classic myofibroblast cluster"、"Intermediately activated hepatic stellate cell cluster"、"Proliferating hepatic stellate cell cluster" とラベリングした。この Proliferating hepatic stellate cell cluster は *Cenpf*, *Mki67*, *Cdk1* などの細胞増殖に関する遺伝子の高発現を特徴とするクラスターであるが、四塩化炭素モデル由来の細胞でこのクラスターに含まれる細胞はほぼ認められず、肝切除特異的なクラスターであると考えられた。また Col-ER Cre/RFP マウスに肝切除を行ったところ、術後 28 日目においても術後 3 日目と同様に RFP 陽性細胞の増加を認め、肝切除後にコラーゲン遺伝子を発現する細胞は術後 28 日目においても肝内に残存していることが確認された。Col-GFP マウスでの結果と合わせて考えると、肝切除後にコラーゲン遺伝子を発現する細胞はその後細胞死を迎えるのではなく、コラーゲン遺伝子の発現が低下し不活性化し

た状態に戻り、肝組織に残存することが確認された。また Col-ER Cre/DTA マウスにも同様に肝切除を行うと術後 7 日目の肝重量はコントロールと比べ有意に低く、肝再生が阻害されていることが確認された。

結論：肝切除後にコラーゲン遺伝子を発現する肝星細胞は 3 つのクラスターに分類され、その内 1 つは肝切除後に特異的なクラスターであった。またこれらのコラーゲン遺伝子を発現する細胞は肝切除後の肝再生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

参考文献：

1. Agrawal S, Belghiti J. Oncologic resection for malignant tumors of the liver. *Ann Surg* 2011;253:656-665.
2. Dittmar Y, Altendorf-Hofmann A, Schüle S, Ardelt M, Dirsch O, Runnebaum IB, Settmacher U. Liver resection in selected patients with metastatic breast cancer: a single-centre analysis and review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:1317-1325.
3. Boudjema K, Locher C, Sabbagh C, Ortega-Deballon P, Heyd B, Bachellier P, Métairie S, et al. Simultaneous Versus Delayed Resection for Initially Resectable Synchronous Colorectal Cancer Liver Metastases: A Prospective, Open-label, Randomized, Controlled Trial. *Ann Surg* 2021;273:49-56.
4. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, Koch M, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery* 2011;149:713-724.
5. Gong WF, Zhong JH, Lu Z, Zhang QM, Zhang ZY, Chen CZ, Liu X, et al. Evaluation of liver regeneration and post-hepatectomy liver failure after hemihepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep* 2019;39.
6. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Faseb j* 1995;9:1527-1536.
7. Ezzat TM, Dhar DK, Newsome PN, Malagó M, Olde Damink SW. Use of hepatocyte and stem cells for treatment of post-resectional liver failure: are we there yet? *Liver Int* 2011;31:773-784.
8. Cook D, Achanta S, Hoek JB, Ogunnaike BA, Vadigepalli R. Cellular network modeling and single cell gene expression analysis reveals novel hepatic stellate cell phenotypes controlling liver regeneration dynamics. *BMC Syst Biol* 2018;12:86.
9. Karin D, Koyama Y, Brenner D, Kisseleva T. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation* 2016;92:84-92.
10. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* 2017;127:55-64.

11. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest* 2013;123:1902-1910.
12. Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 2013;3:485-513.
13. Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18:40-55.
14. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006;45:429-438.
15. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E3297-3305.
16. Koyama Y, Wang P, Liang S, Iwaisako K, Liu X, Xu J, Zhang M, et al. Mesothelin/mucin 16 signaling in activated portal fibroblasts regulates cholestatic liver fibrosis. *J Clin Invest* 2017;127:1254-1270.
17. Nishio T, Hu R, Koyama Y, Liang S, Rosenthal SB, Yamamoto G, Karin D, et al. Activated hepatic stellate cells and portal fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice. *J Hepatol* 2019;71:573-585.
18. Rockey DC, Du Q, Weymouth ND, Shi Z. Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol* 2019;189:2209-2220.
19. Rosenthal SB, Liu X, Ganguly S, Dhar D, Pasillas MP, Ricciardelli E, Li RZ, et al. Heterogeneity of HSCs in a Mouse Model of NASH. *Hepatology* 2021;74:667-685.
20. Yata Y, Scanga A, Gillan A, Yang L, Reif S, Breindl M, Brenner DA, et al. DNase I-hypersensitive sites enhance alpha1(I) collagen gene expression in hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003;37:267-276.
21. Luche H, Weber O, Nageswara Rao T, Blum C, Fehling HJ. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* 2007;37:43-53.
22. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc* 2008;3:1167-1170.
23. Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, Weiskirchen R. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp* 2015.
24. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc*

2015;10:305-315.

25. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;13:1324-1332.
26. Morini S, Carotti S, Carpino G, Franchitto A, Corradini SG, Merli M, Gaudio E. GFAP expression in the liver as an early marker of stellate cells activation. *Ital J Anat Embryol* 2005;110:193-207.
27. Zhou W, Inada M, Lee TP, Benten D, Lyubsky S, Bouhassira EE, Gupta S, et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2005;85:780-788.
28. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *J Gastroenterol* 2018;53:6-17.
29. Rocha AS, Vidal V, Mertz M, Kendall TJ, Charlet A, Okamoto H, Schedl A. The Angiocrine Factor Rspodin3 Is a Key Determinant of Liver Zonation. *Cell Rep* 2015;13:1757-1764.
30. Sackey-Aboagye B, Olsen AL, Mukherjee SM, Ventriglia A, Yokosaki Y, Greenbaum LE, Lee GY, et al. Fibronectin Extra Domain A Promotes Liver Sinusoid Repair following Hepatectomy. *PLoS One* 2016;11:e0163737.
31. Grgurevic L, Erjavec I, Grgurevic I, Dumic-Cule I, Brkljacic J, Verbanac D, Matijasic M, et al. Systemic inhibition of BMP1-3 decreases progression of CCl(4)-induced liver fibrosis in rats. *Growth Factors* 2017;35:201-215.
32. Liu Q, Lv C, Huang Q, Zhao L, Sun X, Ning D, Liu J, et al. ECM1 modified HF-MSCs targeting HSC attenuate liver cirrhosis by inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Cell Death Discov* 2022;8:51.
33. Zhang W, Conway SJ, Liu Y, Snider P, Chen H, Gao H, Liu Y, et al. Heterogeneity of Hepatic Stellate Cells in Fibrogenesis of the Liver: Insights from Single-Cell Transcriptomic Analysis in Liver Injury. *Cells* 2021;10.
34. Yang W, He H, Wang T, Su N, Zhang F, Jiang K, Zhu J, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell-Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology* 2021;74:2774-2790.
35. Krenkel O, Hundertmark J, Ritz TP, Weiskirchen R, Tacke F. Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Cells* 2019;8.
36. Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21 Suppl 3:S84-87.
37. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 2012;22:1166-1175.

