

論文審査の結果の要旨

氏名 岡田 甫

本論文は5つの章からなる。第一章での序論に続き、第二章では材料と方法、第三章は研究結果が、第四章では考察、第五章では結論が記述されている。

代謝や解毒の中心器官である肝臓は、様々な化学物質・薬物や腸管から侵入する生体異物による障害に常に曝されている。そのため、肝臓は障害から速やかに回復する高い再生能を有する。肝再生は、肝臓の実質細胞である肝細胞の高い自己増殖能に加えて、免疫系細胞による異物の除去や線維芽細胞の線維産生による一過性修復など、肝臓を構成する様々な非実質細胞も関与する複雑なプロセスである。

肝非実質細胞の一種である胆管上皮細胞により構成される胆管は、肝細胞で産生される胆汁を腸管に排出する。正常時には静的な器官である胆管は、肝障害時には高い増殖活性を示し、障害部位に向かって樹枝構造を進展して肝障害の緩和に寄与する。このような現象はウイルス性肝炎やアルコール性肝障害等の様々なヒトの病態やマウスモデルでの重篤な障害肝において認められる。この胆管のリモデリングは障害に応じて異なる形態様式を呈する事が知られている。そのため、発生期の一様な管腔構造形成に対して、管腔構造を種々の障害適応的に再構成する特有な分子制御機構の存在が想定される。しかし、胆管リモデリングを惹起する胆管外からのシグナルについてはいくつかの報告があるものの、胆管上皮細胞の動態を制御する細胞内の分子機構に関しては不明な点が多く、包括的な理解はなされていない。

既報の胆管外からのシグナル分子は、相互に協調して胆管のリモデリングを誘導しており、各個別因子の解析では胆管のリモデリングの全体像を明らかにすることは困難である。そこで申請者は、胆管のリモデリングの分子機構を包括的に理解するために、それらシグナルが入力・統合された細胞内シグナル因子に着目して研究を行なうことにした。

申請者は、障害肝において胆管の細胞内遺伝子発現プログラムの制御に関わる転写因子を同定することを起点として研究を行った。既報の Microarray による胆管の遺伝子発現データの比較解析から候補転写因子を絞り込み、その中から、既報の胆管リモデリング因子である Fgf7 の下流で働きうるという報告および他の上皮組織の形成や構造維持に関与するとの報告がある Krüppel-like factor 5 (Klf5) に着目してマウスモデルを用いた解析を行った。本研究において申請者は、① 肝臓における Klf5 の発現解析

② 肝臓特異的な Klf5 欠損マウス (Klf5-LK0 マウス) の作製 ③ 種々の肝障害投与や既報の胆管リモデリング因子の人為的発現に対する Klf5-LK0 マウスの表現型解析 ④ RNA-Seq による網羅的な遺伝子発現解析による Klf5 の標的遺伝子の探索を行い、Klf5 による細胞内での胆管リモデリング制御に関して解析を行った。

免疫染色や定量的 PCR による解析から Klf5 が肝臓において胆管特異的に発現していることを見出した。この結果を受け、Klf5-LK0 マウスの作製を行った。Klf5-LK0 マウスは肝臓や胆管に異常は認められず正常に発生したので、胆汁うっ滞性の肝障害モデル (肝毒素 DDC の食餌投与モデル、Abcb4 遺伝子欠損マウスモデル)、活性酸素による肝障害モデル (肝毒素 TAA の飲水投与モデル) を試した。その結果、Klf5-LK0 マウスは胆汁うっ滞性の肝障害モデルにおいてのみ、肝障害が増悪・生存率の低下・胆管のリモデリング不全が認められた。この結果から Klf5 が胆汁うっ滞性の肝障害時における胆管のリモデリング制御因子であることが明らかになり、胆汁うっ滞によらない肝障害には別の胆管のリモデリング制御機構があることが想定された。次にこの Klf5-LK0 マウスにおいて、既報の胆管のリモデリング因子である、Fgf7 および Tweak との関わりを解析した。これら因子は、各々単独での過剰発現によって胆管のリモデリングを誘導できることが知られている。各々の過剰発現を行ったが、予想に反して Klf5-LK0 マウスにおいても胆管のリモデリングが正常に誘導され、Klf5 はこれら因子の主要な標的因子ではないことが明らかになった。次に Klf5 の制御する分子機構を明らかにするために、DDC 肝障害時の胆管の遺伝子発現を RNA-Seq により網羅的に解析した。Gene Set Enrichment Analysis 等による発現変動遺伝子のバイオインフォマティクスの解析により、Klf5 がサイクリン等の発現を制御することで細胞増殖を制御することを明らかにし、リモデリングした胆管の構造維持に関わる可能性のある Klf5 の標的因子候補を同定した。

本研究によって、胆管リモデリングに関わる新規転写因子 Klf5 の同定およびその機能の一端が明らかになった。更に、胆管のリモデリングの制御分子・分子機構に多様性があることで原因の異なる障害に応じて、胆管が適応的に構造変化できる事が示唆された。本研究の成果は、多様なストレス環境に対する組織応答の理解を進展させる非常に意義深いものである。

なお、本論文は、山田みなみ、神元健司、Cindy Yuet-Yin Kok、金子洸太、依馬正次、宮島篤、伊藤暢との共同研究であるが、申請者が主体となって実験及び考察を行なったものであり、申請者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。