

論文の内容の要旨

論文題目：新規 *in vitro* 解析系を用いた Klf5 による胆管組織の構造変化と
安定性の制御機構の解明

(Unraveling a regulatory mechanism by Klf5 for tissue dynamics and stability
of the biliary epithelium using a novel *in vitro* system)

氏名：山田 みなみ

上皮組織は、多細胞生物において外界との境界を構成し、内部を保護する基盤的構造である。そうした機能を発揮するために、上皮組織は細胞同士を互いに強固に接着させることで、その構造を堅牢に維持する必要がある。そのような構造維持の仕組みを理解することは、生体内部環境の保護や恒常性維持の観点から、様々な疾患の発症メカニズムを解明する上で、非常に重要である。

肝臓は、代謝や解毒など極めて多岐にわたって生命維持に必須の機能を担う臓器である。肝臓には、それら機能の大部分を担う実質細胞である肝細胞と、胆汁(肝細胞により産生され、腸管において働く消化液)の排出路として機能する胆管を構成する胆管上皮細胞の、二種類の上皮細胞が存在する。胆管組織は、正常な肝臓内では門脈という血管に隣接する位置に限局して存在する。しかしながら、重篤あるいは慢性的な障害をうけた肝臓では、胆管組織が増生して実質領域中の障害部位へと進展する現象(胆管増生)が誘導され、肝再生に寄与する。その実態は、肝疾患の病態に応じた胆管樹状組織のダイナミックな形態変化であるが、そうした形態変化を担う分子メカニズムについては、未だに多くの点が不明である。

我々はこれまでに、肝臓の上皮細胞(肝細胞および胆管上皮細胞) 特異的に転写因子 Klf5 を欠損するマウス(以下、Klf5-LK0マウス)の解析から、Klf5が胆汁うっ滞性肝障害時の胆管上皮細胞の増殖を制御することを明らかにしている。この時、Klf5-LK0マウスでは本来の胆管組織構造から遊離した細胞塊が観察され、肝障害によって変化した胆管組織の構造を維持できていない可能性が示唆されていた。本研究ではこうした現象に注目することで、胆管組織構造の維持機構が存在する可能性を検討するとともに、その分子機序を明らかにすることを目的とした。

はじめに、胆管組織構造から遊離した細胞塊の由来を調べるために、アデノ随伴ウイルスベクター系を用いて、Klf5-LK0マウスの肝細胞のみに特異的に蛍光レポーター遺伝子を導入し、肝障害時の挙動を追跡した。その結果、「遊離した細胞塊」には蛍光標識は認められなかった。すなわち、それらが肝細胞から分化転換したものではなく、胆管組織構造が崩壊し、これから分離して生じたものである可能性が強く示唆された。

このような胆管組織の崩壊をより直接的に捉えるために、これを再現する新規in vitro解析系の構築を試みた。まず、Cre-loxPシステムによりヒドロキシタモキシフェン誘導的にKlf5を欠損させることが可能なマウス胆管上皮細胞株を樹立した。これを用いてコラーゲンゲル中での3次元培養を行うことで、胆管様の樹状組織を形成・成長させた。培養液中にヒドロキシタモキシフェンを添加したところ、in vivoにおいて観察されたのと同様に、胆管様組織構造から遊離した細胞の出現が認められた。さらにライブイメージング解析を行ったところ、Klf5の欠損にともなう胆管様組織構造の崩壊が誘導され、細胞が分離していく様子が明確に観察された。この結果から、胆管組織構造を安定に保つ機構の存在と、これをKlf5が制御することが明らかとなった。

Klf5下流の分子機構を明らかにするために、この新規in vitro解析系を用いたRNA-seq解析を行い、候補因子としてLaminin subunit beta-3 (Lamb3)を同定した。Lamb3のマウス肝臓における発現は、定常状態においては胆管組織中の「小葉間胆管 (interlobular bile duct)」と呼ばれる部分に局限して認められる一方で、胆汁うっ滞性肝障害時には増生部分も含めた胆管組織全体で誘導されるという、興味深いパターンを示した。胆管組織構造の変化や維持におけるLamb3の機能を解析するため、Lamb3 floxedマウスを用いて肝臓上皮特異的Lamb3欠損マウス(以下、Lamb3-LK0マウス)を作製した。Lamb3-LK0マウスは正常に発生し、定常状態では肝臓や胆管に顕著な異常は認められなかった。一方で、胆汁うっ滞性肝障害を誘導したLamb3-LK0マウス肝臓の三次元レベルでの組織構造解析から、本来の胆管から遊離した細胞塊が顕著に観察され、胆管の形態変化にともなう組織構造維持の異常が明らかとなった。一方で、Ki67免疫染色の定量解析の結果、Lamb3-LK0マウスとコントロールとの間で胆管上皮細胞の増殖レベルに有意な差は認められなかった。以上の結果から、Klf5は障害時の胆管組織において細胞増殖と組織構造の安定性という二つの異なる細胞機能を制御すること、後者の機能発現にLamb3が関与することが明らかとなった。

本研究では、生体マウス胆管組織の動態をリアルタイムで解析できない問題を新規in vitro解析系の樹立によって克服し、肝障害時に変化する胆管組織構造を安定に維持する機構の存在と、その破綻による組織崩壊という現象の存在を明らかにした。さらに、RNA-seq解析によりKlf5下流因子としてLamb3を同定し、そのノックアウトマウスの作製・解析から胆管組織構造の維持機構への関与を証明した。

胆管増生に関するこれまでの研究では、胆管上皮細胞の増殖や分化の制御に焦点を当てた解析が数多く行われているが、本論文では、胆管組織のダイナミックな形態変化を実現する上で重要な細胞機能を見出した。胆管組織構造を維持する機構は、本来強固で安定な組織である上皮において、組織形態のダイナミックな変化を実現する上で重要な細胞機能だと想定される。