

審査の結果の要旨

氏名 山田 みなみ

本論文は5章からなり、第1章は序論、第2章は実験材料と方法、第3章は結果、第4章は考察、第5章は結論について述べられており、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について研究した成果が記述されている。

肝臓は元来、様々な障害に対して高い再生能を有する臓器であるが、重篤または慢性的な障害に晒されると、その再生過程において胆管の増生および浸潤といった生体応答が認められる。この現象は細胆管反応とも呼ばれており、ダイナミックな胆管組織構造の再構築を伴う組織修復のプロセスと捉えられるが、その制御機構については未だ不明な点が多く残されている。論文提出者らは、これまでに、肝内の胆管組織で発現する転写因子として Kruppel-like factor 5 (以下、Klf5) を同定しており、この因子が胆管上皮細胞の増殖を正に制御することで、肝障害時における胆管増生および肝再生に寄与することを既に報告している (Okada H, Yamada M et al. JBC 2018)。この報告で用いた Klf5 欠損 (KO) マウスの慢性障害肝の解析では、既存の胆管組織構造から遊離した胆管マーカー陽性細胞が認められており、胆管組織の構造維持機構に何らかの異常があることが示唆されていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで、論文提出者は、細胆管反応において Klf5 は細胞増殖を誘導するだけでなく、「胆管組織構造の維持」という別の細胞機能にも関与しているとの仮説を立て、その検証を行なった。また、胆管組織構造の維持に関わる Klf5 制御下の因子についても網羅的遺伝子発現解析から探索し、候補分子について検証を行なった。

まず、Klf5 KO マウスで見られた胆管組織構造から遊離した胆管マーカー陽性細胞の由来について検討を行なった。その由来には2つの可能性が考えられた。1つは仮説通り、構造が維持できなくなることで胆管から分離した断片に由来する可能性、もう1つは、胆管から離れた肝細胞が胆管細胞に分化転換することで生じた可能性である。まず、後者の可能性を検討するため、アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子導入系で、肝細胞のみをラベルした Klf5 KO マウスに肝障害を与え、免疫組織化学的手法により遊離した細胞の解析を行なった。その結果、遊離した胆管マーカー陽性細胞は肝細胞に由来しないことが明らかとなった。しかし、マウスより採取した肝臓組織の組織学的解析では、経時的なモニターができないため、「遊離した胆管マーカー陽性細胞」が必ずしも「既存の胆管組織から分離した」ものであるとは結論づけることができなかった。そこで、論文提出者は、ライブイメージング観察が可能な新規 *in vitro* 解析系を構築することで、そうした問題点の打開を図った。その結果、単一遺伝子の欠損により胆管組織構造が崩壊する様子を観察することに成功し、胆管組織の構造を維持する機構が確かに存在することを初めて明らかにした。

さらに、論文提出者は、この *in vitro* 解析系による Klf5 欠損の有無、および、野生型マウスと KO マウスの RNA-seq 解析による比較から、Klf5 下流の候補因子として Lamb3 を同定した。その KO の解析から胆管組織構造の維持に関わる責任分子の1つが Lamb3 であることを証明した。

細胆管反応に関するこれまでの研究では、胆管細胞の増殖や分化の制御に焦点を当てた解析

が数多く行われてきたが、本論文では、胆管組織がダイナミックに形態変化する際の構造維持機構の重要性、および **Klf5** による新たな細胞機能を見出した点が高く評価できる。本研究では、マウスの生体内の解析だけでは困難であった胆管組織の連続的な構造変化を解析するために、新規の *in vitro* 評価系を開発しており、他の上皮組織の再構成に関わる研究にも応用できる可能性を示した。さらに、その系を利用することで **Klf5** の下流に存在する **Laminin-332** を見出し、その **KO** マウスを用いた解析から、ラミニンを介した胆管組織の構造維持機構が存在することを初めて明らかにした。

なお、本論文は、岡田 甫氏、吉川 大和氏、宮島 篤氏、伊藤 暢氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。また、審査員は以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が本研究の意義と目的を理解し、本学問領域の十分な学識を備えていると判断した。また本研究成果は、細胆管反応という胆管組織の形態変化を、構造の維持という新たな視点から解析し、それに関わる **Laminin-332** を見出した新規性、およびその制御機構の仕組みの一端を解明した点から評価に値する。

よって、本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1996 字