

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 23 年度博士課程入学

氏名：小澤 秋沙
指導教員名：九郎丸 正道

論文題目：マウス胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 遺伝子の
役割解明及び新生児胆道閉鎖症モデルマウスの作出

Sox17 はマウスで 1996 年に新たな sry-related HMG Box (SOX) 遺伝子として単離され (Kanai et al.,1996)、脊椎動物において広く保存された遺伝子である。これまでの報告から、*Sox17* は内胚葉形成におけるマスター遺伝子として知られている (Kanai-Azuma et al.,2002、Shimoda et al.,2007、Stainier et al.,2002、Tam et al.,2003)。

当研究室で行った *Sox17* ノックアウトマウスの C57BL/6 マウスへの 5 世代以上の戻し交配により *Sox17* ヘテロマウス (*Sox17*^{+/-}マウス) の出生率が低下することから、これまでに報告されていない *Sox17* 遺伝子のハプロ不全が起きていると考え、*Sox17*^{+/-}マウスの解析を行った。*Sox17* 遺伝子ハプロ不全の表現型として、胎齢 17.5 日の *Sox17*^{+/-}マウスで肝臓辺縁の炎症が認められ、この肝炎により *Sox17*^{+/-}マウスの出生率の低下が起こることが推測された。*Sox17* は血管発生に関わっていること (Matsui et al.,2006) 及び胎齢 17.5 日のマウス肝臓では造血が行われていることから、*Sox17*^{+/-}マウス肝臓での血管形成及び血球系について検討されたが、いずれにもハプロ不全と考えられる変化は認められなかった。以上のことから、*Sox17* ハプロ不全による肝炎の一次原因は肝臓以外にあると考えられた。

Sox17 遺伝子発現は内胚葉の初期分化後に消失し、肝臓、膵臓及び胆嚢の原

基である前腸領域の分化の際に再発現し、胎齢 10.5 日ごろには胆嚢予定領域における限局した発現がみられる。同時期から胆嚢・胆管系は伸長しながら形成される。*Sox17* ノックアウトマウスの内胚葉細胞では胆嚢・胆管系マーカー発現がみられないことから、胆嚢・胆管系への分化には *Sox17* の再発現が必須であること (Uemura et al., 2010) が報告されているが、*Sox17* 遺伝子が前腸から分化した後の胆嚢・胆管系形成にどのように関わっているかは、まだ明らかにされていない。また、胆嚢・胆管系の形成不全は胆石の形成、慢性炎症や胆道閉鎖を引き起こすこと (Portincasa et al., 2004; Asai et al., 2015) が報告されていることから *Sox17* ハプロ不全の肝炎の発症に胆嚢・胆管系形成での *Sox17* 遺伝子発現低下が関わっている可能性が考えられる。

新生児胆道閉鎖症は新生児の 1 万人に 1 人が発症し、進行性の肝炎により、重度の場合には肝臓移植が必要となる疾患である (Kohsaka et al., 2002; Mieli-Vergani & Vergani, 2009)。この疾患での肝炎は胆道閉鎖による胆汁うっ滞が原因で起こると考えられており、胆道閉鎖の一因として、胎児期の胆管形態形成不全が考えられているが、ヒトで新生児胆道閉鎖症と診断され、治療される際には胆嚢は線維化し痕跡程度しか認められず、原因を解明するための詳細な検討が困難となっている。そのため、疾患モデルマウスの作出が望まれている。

以上のことから本研究では、第 1 章で *Sox17* ハプロ不全による肝炎への胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 遺伝子発現低下の影響を検討し、第 2 章では第 1 章で明らかとなった *Sox17*^{+/-}マウスでの胆嚢形成不全から、*Sox17* 遺伝子の胆嚢・胆管系形成における役割を解明することで、胆嚢・胆管系形成の分子機構を明らかにするために解析を行った。

〈第 1 章〉

はじめに、前腸内胚葉から分化後の胆嚢・胆管系形成において胎齢 15.5 日まで胆嚢領域で SOX17 局在が認められたことから、*Sox17* 遺伝子発現低下の影響を調べるために、胆嚢・胆管系形成後の成体の胆嚢を調べ、*Sox17*^{+/-}胆嚢では低形成が起こっていることが明らかとなった。この結果から、*Sox17* 遺伝子には胆嚢・胆管系の初期分化だけではなく、形成過程においても、重要な働きがあると考えられた。

次に胆嚢へと分化した後の胆嚢・胆管系形成過程における *Sox17* 発現の低下による胆嚢低形成と *Sox17* ハプロ不全による肝炎にどのような関係があるのかを明らかにするために、肝炎が起こる胎齢 17.5 日までの胆嚢・胆管系の形成について解析した。胆嚢・胆管の形態的には、*Sox17*^{+/-}マウスでは胆嚢管に異所性の肝外胆管の形成がみられた。組織学的には、野生型で胎齢 15.5 日から 17.5 日にかけて胆嚢上皮細胞の増殖が盛んに起こって、紡錘形となり上皮は偽重層上皮を形成する一方、*Sox17*^{+/-}マウスで胆嚢上皮細胞の増殖率は野生型と比較して低く、立方形で、偽重層上皮化は起こらないことが明らかとなった。さらに、

Sox17^{+/-}マウスでは、上皮の一部が脱落し管腔内にとどまっているのが確認され、この脱落細胞により胆管の閉塞が起こっていることが示唆された。

上皮細胞の脱落が胆嚢における *Sox17* 遺伝子発現低下によるものかを調べるために、胆嚢の器官培養を行った。3 日間の胆嚢器官培養により、野生型では生体内と同様に方向性を持った胆嚢の伸長が見られたが、*Sox17*^{+/-}胆嚢では胆嚢は伸長せず、方向性のない均一な膨化が認められた。さらに、細胞と細胞外基質との細胞接着分子であるラミニン及びインテグリン $\beta 1$ の減少が *Sox17*^{+/-}胆嚢上皮で見られ、ラミニンが減少した部分での上皮細胞の脱落が認められた。

ヒトの新生児胆道閉鎖症では胆管閉塞による胆汁の鬱滞が肝炎を引き起こすことが報告されており (Kohsaka et al.,2002、Mieli-Vergani and Vergani.,2009)、*Sox17* ハプロ不全による肝炎は、*Sox17*^{+/-}胆嚢上皮の破綻により脱落した細胞が胆管を閉塞することで胆汁鬱滞が起こることが原因であると考えられた。また、マウスにおける胆汁の腸管への排出は胎齢 16.5 日からみられることから、胎齢 17.5 日以降に起こる肝炎が胆汁の鬱滞による可能性が示唆されている。

以上のことから、胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 遺伝子発現の低下により細胞接着分子が減少し、上皮細胞の脱落が起こり、胆管を閉塞することで胆汁が鬱滞するために *Sox17* ハプロ不全である胎齢後期の肝炎が発症すると考えられる。

〈第 2 章〉

第 1 章で明らかとなった *Sox17*^{+/-}マウスでの胆嚢形成不全から、*Sox17* 遺伝子発現は前腸内胚葉から胆嚢・胆管系へと分化した後も、形成において重要な役割があると考えられたが、その詳細な役割及び *Sox17* 遺伝子の下流は明らかとなっていない。*Sox17* 遺伝子の胆嚢・胆管系形成における役割を解明することは、先天的胆道閉鎖症等の疾患の原因解明にもつながると考えられる。そのため、第 2 章では胆嚢・胆管系形成の分子機構を明らかにするために *Sox17*^{+/-}マウスの胆嚢・胆管の形成期における遺伝子発現の網羅的解析を用いて、*Sox17* 遺伝子の胆嚢・胆管系形成における役割について解析し、検討を行った。

第 1 章の結果で *Sox17*^{+/-}胆嚢は単層立方状上皮であり、胆嚢管の上皮と同様の形態であることから、*Sox17*^{+/-}胆嚢が胆嚢管化している可能性について検討した。胆嚢管の分子マーカーは明らかとなっていなかったが、肝内胆管では形成時に *Sox9* が発現し、肝内胆管のマーカーとして報告されていることから (Antoniou et al.,2009)、胆嚢管での *SOX9* 局在を調べた。その結果、野生型の胆嚢管では *SOX9* が局在しており、胆嚢では局在はほとんどみられなかったことから、*Sox9* 発現は胆嚢管マーカーとなることが示された。さらに、*Sox17*^{+/-}胆嚢では *SOX9* 局在が野生型と比較して増加していることが明らかとなり、*SOX17*^{+/-}胆嚢は胆嚢管化していることが示唆された。この結果を踏まえて、*Sox17*^{+/-}胆嚢、野生型胆嚢及び胆嚢管を比較することで、胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 遺伝子の役割とその下流を明らかにできると考え、*Sox17*^{+/-}胆嚢と野生型の胆嚢及び胆嚢管を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、*Sox17*

遺伝子の下流には *Sonic hedgehog* (*Shh*) 遺伝子があることが示唆された。野生型では *Shh* は胆嚢上皮で発現し、その下流である *Ptch* 及び *Gli* は胆嚢周囲の間葉系組織に発現し、*SOX17*^{+/-}胆嚢では発現が低下していた。*Shh* シグナルの胆嚢形成における役割を調べるために、*Ptch* 及び *Gli* が胆嚢周囲の間葉系組織に発現していることから、間葉系組織への影響を検討した。胎齢 13.5 日の野生型では胆嚢周囲の間葉系組織には平滑筋が分布しており、*Sox17*^{+/-}胆嚢周囲の間葉系組織では平滑筋の密度が低くなっていることが明らかとなった。次に、胆嚢上皮の偽重層上皮化と *Shh* 発現による平滑筋の形成との関連を明らかにするために、*Sox17*^{+/-}胆嚢とリコンビナント SHH を結合させたビーズを共培養し、調べた。その結果、*Sox17*^{+/-}胆嚢上皮周囲の間葉系組織の平滑筋は野生型と同様の密度がみられ、上皮の偽重層上皮化が起こった。第 1 章の結果と合わせて考えると *Sox17*^{+/-}胆嚢では、胆嚢上皮の細胞増殖率が減少すること及び *Shh* 発現低下により胆嚢周囲の間葉系組織での平滑筋の密度が低下することによる形態の保持不全により、胆嚢上皮は偽重層上皮化せず、単層立方上皮となると考えられる。

以上の結果から、*Sox17* 遺伝子は胆嚢・胆管系形成において、下流に *Shh* シグナルを有し、胆嚢周囲の間葉系組織での平滑筋の形成によって、胆嚢の形態保持の役割があることが明らかとなった。また、*Sox17*^{+/-}胆嚢は胆嚢管化していることが示され、同じ SOX ファミリーである *Sox9* との発現バランスが正常な胆嚢・胆管系形成には重要であると考えられる。

本研究では、第 1 章で *Sox17* ハプロ不全の肝炎は胆嚢低形成により引き起こされること、第 2 章で *Sox17* 遺伝子は胆嚢・胆管系形成において下流の *shh* 発現を増加させることによって胆嚢周囲の間葉系組織での平滑筋形成を促すことにより、胆嚢の形態を維持する働きがあること及び *Sox17* 遺伝子発現の低下は *Sox9* 発現を増加させ、胆嚢管化させることを明らかにした。

新生児胆道閉鎖症は原因がまだ解明されていない難病であり、胎生期の胆汁鬱滞、新生児肝炎などが特徴である (Kohsaka et al.,2002、Mieli-Vergani and Vergani.,2009)。本研究の第 1 章で *Sox17*^{+/-}マウスで認められた胎生期の胆管閉塞による肝炎はヒトでの新生児胆道閉鎖症の病態と類似点が多いことから、原因が不明である新生児胆道閉鎖症の発症機序及び治療法の研究におけるモデルマウスとして活用され、診断又は治療法の開発に貢献することが期待される。また、新生児胆道閉塞症は生後約 3 か月以降に黄疸等の症状が現れることで発見され、症状が現れる時には肝炎が発症しているため、早期の発見が重要である。第 2 章で明らかにした胆嚢・胆管形成における分子機構はヒトで調べることが困難である胆道の閉塞の有無、つまり、正常な胆嚢・胆管系形成が行われているかを知るためのマーカー探索等の重要な情報であると考えられる。