

## 博士論文（要約）

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

小澤 秋沙

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

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医解剖学教室

平成 23 年度入学

獣医学専攻 博士課程 小澤 秋沙

指導教員 九郎丸 正道

## 序章

### **Sox17 発現と胆嚢原基の分化**

*Sox17* (SRY-related HMG box transcription factor) は 1996 年に新たな sry-related HMG Box (SOX) 遺伝子として単離された (Kanai et al., 1996)、SOX 遺伝子群のサブグループ F に属する、脊椎動物において広く保存された遺伝子である。これまでに、*Sox17* 遺伝子は胚性内胚葉で一過性に胎齢 7.0 日から初期体節期 (胎齢 8.0 日) に発現し、*Sox17* ノックアウトマウスでは胎齢 8.5 日に前腸内胚葉でアポトーシスが誘導されることで、胎齢 10 日までに致死となること (Kanai-Azuma et al., 2002) 及び胚体外内胚葉の形成において重要であること (Shimoda et al., 2007) が報告されている。In vitro 解析においても、ヒト ES 細胞において *Sox17* 遺伝子を強制発現させると内胚葉への分化が誘導されること (Seguin et al., 2008) も報告されており、これらのことから *Sox17* は内胚葉形成のマスター遺伝子であることが知られている (Stainier et al., 2002, Tam et al., 2003)。

マウスでは腹側膵、肝臓及び肝外胆管系は後腹側前腸から発生し、特に肝臓以外の腹側膵と肝外胆管系は同じ前駆細胞から分化する可能性が示唆されており、この前駆細胞は *Pdx1* 及び *SOX17* 陽性細胞であることが報告されている (Spence et al., 2010)。さらに、*Pdx1* 陽性及び *SOX17* 陽性細胞が *Pdx1* 陽性の腹側膵、*SOX17* 陽性の肝外胆管系へと分化する際に *Sox17* 発現が必要であり、胎齢 8.5 日での *Sox17* ノックダウンにより、肝外胆管系は形成されず、肝臓原基に異所性の膵臓形成が認められている (Spence et al., 2010)。一方で、*Pdx1* 陽性領域での *Sox17* の過剰発現により、膵臓の形成は阻害され胆管様組織の形成が認められたことが報告されている (Spence et al., 2010)。当研究室では、*Sox17* 遺伝子が胎齢 10.5 日頃には肝臓、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、胆嚢予定領域における限局した発現がみられ、同時期から胆嚢・胆管系は伸長しながら形成されることを以前に報告しており

(Uemura et al., 2010)、この報告内で *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見られず、肝外胆管系及び *Pdx1* 陽性の膵臓の形成が認められないことを明らかにしている。これらの報告からマウスでの肝外胆管形成において、*Sox17* 発現は必須であると考えられ、また、後腹側前腸の膵臓及び肝外胆管系の前駆細胞の分化を方向付ける役割があることが示唆されている。さらに、*Sox17* の胆嚢原基における発現はゼブラフィッシュ (Shin et al., 2012)、カエル (Zorn and Mason, 2001)、マウス (Matsui et al., 2006 ; Uemura et al., 2010)、ヒト (Cardinale et al., 2011 ; Carpino et al., 2012) で報告されており、進化的に保存されていると考えられるが、胆嚢・胆管器官形成後期に *Sox17* 発現がどのように関わっているのかはまだ明らかとはなっていない。また、胆嚢原基の分化は *Foxf1* (Kalinichenko et al., 2002)、*Hnf6* (Clotman et al., 2002)、*Hes1* (Sumazaki et al., 2004)、*Hhex* (Hunter et al., 2007) 及び *Lgr4* (Yamashita et al., 2009) のような他の因子によって調節されていることが報告されているが、前腸内胚葉から分化後の胆嚢・胆管系形成における分子、細胞メカニズムはいまだ報告されていない。さらに、当研究室で行った *Sox17* ノックアウトマウスの C57BL/6 マウスへの戻し交配により、4 世代までは野生型と *Sox17* ヘテロマウス (*Sox17*<sup>+/-</sup>マウス) の出生割合は約 1 であったのに対し、5 世代以上では *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの出生割合が約 0.14 以下となり、急激な低下がみられた (表 0-1)。 *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの出生率低下の原因について検討が進められた結果、胎齢後期に *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスでは肝炎が高率に発症していることが明らかとなり、この肝炎が出生率低下の原因となる可能性が推察され、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの肝臓について詳細に解析が行われた。 *Sox17* 発現は血管発生 (Matsui et al., 2006) 及び血球の分化に関わっていることから (He, Kim, Lim, & Morrison, 2011)、肝臓の血管と血球について解析されたが、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスで認められた肝炎の原因は肝臓自身ではないことが示唆されたため、*Sox17* 遺伝子が前腸内胚葉から腹側膵及び肝外胆管系への分化に必要であることに着目し、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの肝外胆管系について、

解析することとした。

### 新生児胆道閉鎖症

肝内胆管と肝外胆管は後腹部前腸の肝臓と胆嚢原基に由来する (Spence et al., 2010 ; Stainier, 2002 ; Uemura et al., 2010 ; Zaret, 2008)。肝内胆管の胆管前駆細胞は肝臓の中心静脈周囲の幹細胞から発生し、輪状の形態を中心静脈の分岐周囲に形成し、毛細胆管と肝外胆管と繋がる (Clotman et al., 2002 ; Shiojiri & Katayama, 1987)。反対に肝外胆管（胆嚢、胆嚢管及び肝外肝管）は *Sox17*（SRY-related HMG box transcription factor）が発現する胆嚢原基由来である (Spence et al., 2010 ; Uemura et al., 2010)。

肝外胆管系である胆嚢・胆管系は肝臓で産生された胆汁を貯留し、腸管への胆汁の流路となっている。先天的胆管疾患やウィルス感染による胆管の傷害はこの流路の破綻を引き起こし、胆汁のうっ滞による、胆石の形成や肝炎等の疾患の原因となる (Zong and Stanger, 2011)。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)。この疾患は生後 3 か月で便の色や黄疸等の症状をきっかけとし発見される。発見時には既に肝炎が発症しており、現在の治療法としては肝炎の進行を止めるために肝外胆管の切除等の外科的処置が行われており、肝炎が重度の場合には肝臓移植が必要となる。しかし、新生児に対する外科的処置は技術等に困難な点が多く、新たな治療法の開発が望まれている。また、手術後の再燃は発見が遅くなり、肝炎が重症となることから、早期発見が重要であると考えられている。新生児胆道閉鎖症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、ヒトの新生児胆道閉鎖症では、外科的処置の際には胆嚢が線維化し痕跡程度しか認められないこ

とから、原因を解明するための詳細な検討が困難であり、疾患モデルマウスの作出が望まれている。これまでに、新生児胆道閉鎖症のモデル動物としてロタウィルスまたはサイトメガロウィルスを感染させる方法が用いられているが (Keyzer-Dekker et al., 2015、Walther et al., 2015、Wen et al., 2015)、ウィルス感染マウスでは致死率が高く、またウィルスを取り扱うため研究施設も限られており、新生児胆道閉鎖症の治療の開発等のためには改良が求められている (Squires et al., 2015)。当研究室で解析が進められていた *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスにおける胎生期の肝炎では肝臓の血管または血球系に異常が認められておらず、肝炎の一次原因が肝臓自身ではないと考えられたこと、*Sox17* 遺伝子が前腸内胚葉から腹側膵及び肝外胆管系への分化に重要な役割を担っていることが報告されていることから、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスで認められた肝炎との肝外胆管系形成の関わりを明らかにすることで、新生児胆道閉鎖症のモデルマウスとして有用である可能性を示すことが出来ると考えられた。

### ヒト疾患モデルマウスの有用性

これまでにヒトの疾患のモデルマウスが多く用いられ、医薬品の開発等に利用されているが (Bart van der Worp et al., 2010、Hackam and Redelmeier, 2006)、ヒトでの病態を模倣できたモデルマウスは数少なく、疾患モデルマウスの有用性は低いという報告がされている (Seok et al., 2013)。この報告では、ヒトの疾患に伴い見られる炎症関連遺伝子の変動について、疾患モデルマウスでの遺伝子の変動と比較し、ヒトとモデルマウス間では類似性が認められなかったこと、ヒトとマウスでは炎症の際に変動するシグナルに多くの違いがあることから、マウスを用いた炎症に関する遺伝子変動の解析のヒトでの炎症反応への外挿は困難であることが述べられている (Seok et al., 2013)。一方で、この論文で用いた遺伝子のデータは健康な人と疾患を持っている人を比較し

て発現が変動する遺伝子を抽出していたことから、データには炎症に関係ない遺伝子が含まれており、そのためマウスとの相関性が低くなったという報告もされている (Takao and Miyakawa, 2015)。この報告では、ヒトの疾患に伴う炎症で変動した遺伝子と疾患モデルマウスで変動した炎症関連遺伝子を比較すること及び統計等の解析方法を適切に選択することで、ヒトと疾患モデルマウスでの炎症時に変動する遺伝子には高い相関性が認められ、疾患モデルマウスはヒトの疾患に伴う炎症の解析に有用であると説明されている (Takao and Miyakawa, 2015)。当研究室の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスで認められた肝炎では、疾患モデルマウスとヒトで相関が認められた炎症関連遺伝子に含まれている C-X-C motif chemokine 10 (*Cxcl10*) または Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*) を含む遺伝子の変動がマイクロアレイ解析により認められていた (Takao and Miyakawa, 2015、表 0-2)。この結果は、当研究室の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスがヒトの疾患に伴う肝炎についてのモデルマウスとしての利用可能性を示唆していると考えられ、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスでの肝炎について、詳細に解析することで新たな疾患モデルマウスの作出につながると考えられる。

以上のことから、本研究では第 1 章で新生児胆道閉鎖症のモデルマウスとしての *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスを確立し、さらに新生児胆道閉鎖症の原因解明、治療法の開発、早期発見のためのバイオマーカー探索に貢献するために、第 2 章では *Sox17* 遺伝子の胆嚢・胆管形成における役割を明らかにし、その分子機構についての解析を試みた。



## 図表とその説明

表 0-1 *Sox17* ノックアウトマウスの C57BL/6 への戻し交配時の出生率

Generation	+/+	+/-	Survival ratio (+/-/+/+)	Total numbers
N2	164	140	0.85	304
N3	190	155	0.82	345
N4	113	108	0.96	221
N5	85	11	0.13	96
N6	83	10	0.12	93
N7	69	8	0.12	77
N8	28	1	0.04	29

129sv マウスで作出された *Sox17* ノックアウトマウスを C57BL/6 に戻し交配した際に得られた生存子の野生型及び *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの割合。129Sv 系統の *Sox17* ノックアウトマウスに C57BL/6 交配させ、得た子を F1 世代として、F1 に C57BL/6 を交配させ、得た子を 2 世代目 (N2) とした。N5 で、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの急激な出生率の低下が認められた。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス

表 0-2 マイクロアレイ解析 *Sox17*<sup>+/-</sup> 肝臓で変動した遺伝子の上位 20 遺伝子

Description	Gene	Fold change	
		Severe	(Mild)
endothelial cell-specific molecule 1	<i>Esm1</i>	115.7	(10.1)
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	<i>Cxcl10</i>	49.0	(6.4)
heat shock protein 1A	<i>Hspa1a</i>	28.9	(14.2)
heat shock protein 1B	<i>Hspa1b</i>	28.8	(17.5)
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<i>Cxcl2</i>	26.6	(5.1)
patched domain containing 3	<i>Ptchd3</i>	24.7	(5.6)
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	<i>Serpine1</i>	24.2	(158.7)
kallikrein 1-related peptidase b24	<i>Klk1b24</i>	21.2	(5.1)
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha	<i>Pip5k1a</i>	20.2	(2.0)
hepcidin antimicrobial peptide	<i>Hamp</i>	19.2	(4.3)
predicted gene 6297	<i>Gm6297</i>	13.0	(3.8)
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	<i>Cxcl1</i>	12.4	(4.3)
procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	<i>Plod2</i>	11.9	(4.0)
chondroitin sulfate synthase 3	<i>Chsy3</i>	9.2	(3.3)
activating transcription factor 3	<i>Atf3</i>	8.7	(6.6)
RIKEN cDNA 4930583H14 gene	<i>4930583H14Rik</i>	8.4	(3.4)
ankyrin repeat domain 37	<i>Ankrd37</i>	8.0	(7.8)
potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 3	<i>Kcne3</i>	7.9	(5.9)
family with sequence similarity 184, member A	<i>Fam184a</i>	6.9	(6.5)
chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>Ccl2</i>	5.9	(3.9)

Severe : サンプルング時に肝炎が認められた個体

Mild : サンプルング時に肝炎が認められなかった個体

## 第 1 章

# Sox17 ハプロ不全の原因解明と新生児胆道閉鎖症 モデルマウスの作出

## 諸 言

### ***Sox17* ハプロ不全**

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*<sup>+/-</sup>マウス) の出生率が低下することから (表 0-1)、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ことが考えられたため、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの解析が行われた。*Sox17* 遺伝子ハプロ不全の表現型として、胎齢 17.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスで肝臓辺縁の炎症が認められ (図 1-1、図 1-2)、この胎齢後期における肝炎の発症により *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの出生率の低下が起こることが推測された。さらに、*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おり、*Sox17* は血球の分化に関わっていることから (He, Kim, Lim, & Morrison, 2011)、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウス肝臓での血管形成及び血球系への影響について調べられたが、いずれにおいても野生型との差は認められず、ハプロ不全と考えられる変化は認められなかった (図 1-3)。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可能性が示唆された。

### **前腸内胚葉からの胆嚢領域の分化**

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が報告されおり (Asai, Miethke, & Bezerra, 2015、Portincasa et al., 2004)、当研究室で *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスでは異所性胆管が形成されていることが確認されている (図 1-1)。以前の報告

で、*Sox17* 発現は前腸内胚葉からの胆嚢領域分化に必須であり、肝外胆管形成への関与が示唆されていたことから（Spence et al., 2010、Uemura et al., 2010）、*Sox17* ハプロ不全の肝炎の発症に胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 遺伝子発現低下が関わっている可能性が考えられる。

以上のことから本研究では、*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* 遺伝子発現の影響を検討した。

## 材料と方法

### 実験動物

すべての動物実験は東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルに沿って行われた (approval ID: 551-2327)。手順は東京大学動物実験実施マニュアルに沿って行われた。胎齢 13.5 日から 17.5 日の胎子は SLC から購入した野生型雌 (C57BL/6 (B6) 系統、ICR 系統または 129SvJ 系統) と *Sox17*<sup>+/-</sup> 雄マウス (Kanai-Azuma et al., 2002) または *Sox17*<sup>GFP/+</sup> 雄マウス (Kim, Saunders, & Morrison, 2007) とを交配させて得た。

### 組織学的解析及び免疫組織化学染色を用いた解析

ホールマウント *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA) レクチン染色のために、胆嚢・胆管を肝臓とともに 4% paraformaldehyde (PFA) -PBS で 12 時間、4°C にて固定し、Phosphate buffered saline-Tween (PBST) で洗った。透過性を増すために脱水し、数日間 70% メタノールで保存した。ローダミン付加 DBA を 10 µg/mL で、12 時間 4°C にて染色した。

パラフィン切片作製のために、胆嚢・胆管を肝臓とともに 4% PFA-PBS で 12 時間、4°C にて固定し、脱水、パラフィン包埋し、薄切 (厚さ 4 µm) した。凍結切片は厚さ 5~7 µm で作製した。切片は Hematoxylin Eosin (HE) 染色、Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色、免疫組織化学染色に用いた。

免疫組織化学染色では、マウス抗 E-cadherin (希釈 1/250 ; BD pharmingen)、

ウサギ抗 GRP78 (希釈 1/500; Affinity Bioreagents)、マウス抗 GFP (希釈 1/50; MBL)、ウサギ抗 HNF6 (希釈 1/50; Santa Cruz)、ラット抗 integrin  $\beta$ 1 (希釈 1/50; Millipore)、ウサギ抗 laminin (希釈 1/250; ICN Pharmaceuticals)、マウス抗 proliferation cell nuclear antigen (PCNA) (希釈 1/5000; DACO)、ウサギ抗 SOX9 (希釈 1/250; Kidokoro et al., 2005)、ウサギ抗 SOX17 (10  $\mu$ g/mL; Kanai et al., 1996)、ヤギ抗 SOX17 (希釈 1/100; R&D systems) 及びマウス抗 ZO1 (1/100 dilution; Invitrogen) 抗体をそれぞれ使用した。最後に免疫反応を可視化するために ABC kit (Vector laboratories) とビオチン結合二次抗体、またはアルカリフォスファターゼ/Alexa-488/Alexa-594 がそれぞれ結合した二次抗体を使用した。蛍光免疫組織化学染色では DAPI で対比染色した。オリンパス蛍光顕微鏡 (BX51N-34-FL2)、実体顕微鏡 (SZX16 plus U-LH100HG) 及びオリンパス共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i; Olympus, Japan) で解析した。

PCNA 指数と形態データのために、PCNA 陽性胆嚢上皮細胞と上皮丈はそれぞれの最大直径横断切片にて計測した。

### 胆嚢器官培養法による解析

*Sox17*<sup>+/+</sup>胆嚢・胆管の組織自律的表現型を解析するために、胎齢 13.5 日の胆嚢器官培養を行った。実体顕微鏡下にて胎齢 13.5 日の肝臓から胆嚢管に近い領域を除いた胆嚢を単離し、ISOPORE membrane filter (Millipore) 上に静置し 10% fetal calf serum-DMEM (Sigma) で 37°C 72 時間培養した。また、ゼラチンコート上での培養による、経時的形態変化観察も行った。

### 電子顕微鏡による観察

単離した肝臓と胆嚢・胆管組織を 2.5% グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸バッフ



ァー(PB) で 4 時間 4°C にて固定した。PBS で洗ったのちに、0.1 M PB 中の 1% OsO<sub>4</sub> で 2 時間 4°C で後固定した。脱水し EPON812 で包埋し、超薄切片を JEOL-1010 透過電子顕微鏡 (80 kV) で解析した。

### 統計解析

全ての定量データは平均 ± SEM で表している。データ解析は PRISM v5.0 (GraphPad Software Inc.) で行った。The Student's *t*-test or one-way ANOVA statistic は異なる 2 群以上の解析に用いた。差があった場合には Tukey test を行った。それぞれの解析で *p*-value が 0.05 以下のときに有意な差があるとした。

## 結 果

### 1. Sox17 ハプロ不全の遺伝的背景による比較

当研究室では *Sox17* ノックアウトマウス系統での *Sox17* ヘテロマウス (*Sox17*<sup>+/-</sup>マウス) の出生率の低下は C57BL/6 (B6) 系統への戻し交配により認められたことから、他の系統への戻し交配との比較を行った。その結果、ICR 系統または 129<sub>SVJ</sub> 系統への戻し交配では、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胎子の割合に減少は認められなかったが、ICR に戻し交配を 3 世代又は 4 世代行った ICR バックグラウンドの胎子では肝炎が 5.2%で認められ、異所性胆管の形成は 3 系統において野生型と比較して、*Sox17*<sup>+/-</sup>胎子で発現率が高くなっていた (図 1-4A)。肝炎の発症率では B6 バックグラウンドで ICR バックグラウンドよりも高かったが (図 1-4A)、8 週齢での *Sox17*<sup>+/-</sup>胎子の胆嚢低形成は B6 または ICR バックグラウンドで同様に認められ (図 1-4B)、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスでの胆嚢の低形成はバックグラウンドに関わらず起きることが明らかとなった。また、胎齢 15.5 日での *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮での SOX17 陽性細胞の局在は、B6 バックグラウンドで ICR バックグラウンドよりも減少していた (図 1-4C)。以上の結果から、戻し交配の系統に関係なく胆嚢の低形成は起きるが、系統による差が認められた胎生期の胆嚢上皮における *Sox17* 発現減少のタイミングが、*Sox17* ハプロ不全による肝炎の発症率に影響する可能性が考えられた。

### 2. 腸管への胆汁排出開始時期の検討

ヒトでの新生児胆道閉鎖症の原因と同様に、*Sox17* ハプロ不全による肝炎の原因が胆汁うっ滞である可能性を検討するために、マウスの腸管への胆汁排出時期について

調べた。その結果、胎齢 15.5 日では *Sox17*<sup>+/+</sup> 肝臓で肝炎は起きておらず (図 1-5A)、腸管内に胆汁は認められなかったが、胎齢 16.5 日から認められたことから (図 1-5B)、肝炎が発症する 17.5 日より 1 日早い 16.5 日から胆汁は腸管に排出されることが明らかとなり、この初期の胆汁排出障害が *Sox17* ハプロ不全による肝炎の原因となる可能性が考えられた。

### 3. 胎齢 13.5 日以降の胆嚢・胆管系での SOX17 陽性細胞の局在

前腸内胚葉からの分化後より肝炎が発症する直前の胎齢 16.5 日までの肝臓と胆嚢・胆管系での SOX17 の局在を検討した。胎齢 13.5 日から胎齢 17.5 日の胎子肝細胞には SOX17 の局在は認められなかったが、肝臓の血管内皮では SOX17 陽性細胞が認められ (図 1-6A、B)、胎齢 13.5 日から 16.5 日の胆嚢上皮では SOX17 陽性細胞の局在が確認された (図 1-6C、D の gb)。さらに SOX17 陽性細胞の局在は胆嚢管上皮の一部でも確認されたが (図 1-6C、D の cd)、総胆管、肝外、肝内胆管で局在は認められなかった (図 1-6C、D の hd)。また、PCNA 陽性細胞は胎齢 13.5 日齢の胆嚢・胆管領域遠位において SOX17 陽性胆嚢上皮細胞と共に局在が認められたことから、SOX17 陽性細胞が局在する胆嚢先端部では上皮細胞の増殖が盛んであることが示された (図 1-6E-G)。

### 4. 胎齢 15.5 日以降の野生型及び *Sox17*<sup>+/+</sup> 胆嚢上皮形態の比較

これまでの結果から、SOX17 陽性細胞は増殖活性の高い胆嚢上皮で局在が認められたことから、次に胆嚢上皮における *Sox17* 発現の低下がいつから、どのように胆嚢の

形成へ影響を与えるのかを検討するために、B6 バックグラウンドで他の系統よりも胆嚢上皮での SOX17 陽性細胞の局在の減少が認められた胎齢 15.5 日以降を経時的に調べた。野生型では胎齢 15.5 日から 16.5 日にかけて胆嚢上皮細胞は円柱状となり、胎齢 17.5 日には偽重層円柱上皮となるが（図 1-7A、B 左図）、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢では形成不全となり、偽重層化せず単層立方上皮であった（図 1-7A、B 右図）。形態学的解析では胎齢 17.5 日において *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮の丈が野生型と比較して約 8μm 有意に低くなっていることが明らかとなった（野生型：25.8 ± 1.0 μm (n=9)、*Sox17*<sup>+/-</sup>：17.4 ± 0.6 μm (n=14)）。さらに単層の *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮では基底膜の線維網状板の形成不全が電子顕微鏡観察により確認され（図 1-7B 下段）、上皮内で剥離している細胞が認められた（図 1-7A、B 矢印）。

また、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮での PCNA 陽性細胞率は野生型と比較して胎齢 15.5 日及び 16.5 日で有意に低下し（図 1-7C）、加えて Ki-67 陽性細胞率及び BrdU 標識細胞率は胎齢 15.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮で有意に低下していたことから（図 1-7D、E）、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮では細胞増殖活性が低下していることが明らかとなった。

## 5. *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢における脱落した上皮細胞による胆嚢管・肝外胆管の閉塞の解析

胎齢 15.5 日から 17.5 日での *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢及び胆管の詳細な観察から、管腔内に胆管上皮マーカーである DBA 陽性及び HNF6 陽性細胞の脱落（図 1-8A、B）、胆嚢管と肝外胆管の腔内への凝集が認められた（図 1-8A-E）。また、脱落した細胞および胆嚢上皮における細胞間接着因子である E-cadherin の局在は正常であった（図 1-8B）。電子顕微鏡観察から胆管上皮細胞と脱落細胞の間に密接な接触が観察された（図 1-8C C1、C3）。さらに、胆嚢管と肝外胆管では、管腔内に脱落した細胞による閉塞（図

1-8C-E 矢頭)及び DBA 陽性細胞による胆管の完全な閉塞も認められた(図 1-8D、E 右図)。また、脱落している細胞の中心部ではネクロシスを起こしている細胞が観察された(図 1-8C C2)。

これらの結果から、胎齢 15.5 日に *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢・胆管系上皮では増殖が低下し、一部分では上皮細胞が管腔内に脱落し、二次的に胆管狭窄と閉塞を引き起こし、胎齢 16.5 日から排出される胆汁のうっ滞を引き起こす可能性が示唆された。

## 6. 胆嚢器官培養法を用いた胆嚢形成における組織自律性の解析

これまでに明らかとなった胆嚢上皮での *Sox17* 発現低下による胆嚢形成への影響について、胆嚢での *Sox17* 発現低下による組織自律的变化であるのか、またはまだ明らかとなっていない他器官からの影響があるのかについて調べるために、*in vivo* で SOX17 陽性細胞局在の減少が認められた胎齢 13.5 日から、*Sox17*<sup>+/-</sup>と野生型それぞれの胆嚢原基を用いて器官培養を行い、胆嚢形成について解析を行った。培養期間中、野生型では遠近軸に沿った伸長が認められ、管状構造が形成された(伸長：39/45、伸長不良：6/45、図 1-9B 左図)。*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢では伸長は認められず、膨化し球状の形態を示した(膨化：33/39、発達不全：6/39、図 1-9B 右図、図 1-9F)。3 日間培養後の胆嚢上皮では PCNA 陽性上皮細胞は野生型で胆嚢の先端側(遠位側)での局在が認められ(図 1-9C 白矢印：近位側)、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢では PCNA 陽性上皮細胞の局在に極性は認められなかった(図 1-9C)。さらに、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢では 4/14 で細胞が断片化し、腔内に脱落している像が観察され(図 1-9C 白矢頭)、脱落した細胞近くの基底膜ではラミニンの局在がまばらになっていた(図 1-9C 白抜き矢頭)。また、野生型胆嚢では上皮の構造が偽重層を呈したが(図 1-9D 左図)、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢の上皮は丈の低い立

方単層であった（上皮丈：野生型=  $30.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$  (n=7)、*Sox17*<sup>+/-</sup>= $10.4 \pm 1.1 \mu\text{m}$  (n=6)）。

細胞間接着因子である E-cadherin と ZO-1 の局在には変化はなかったが、細胞外基質との細胞接着受容体である Integrin  $\beta 1$  局在は *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢で野生型と比較して減少が認められた（図 1-9D、E）。

以上の結果から、胆嚢原基における *Sox17* 活性の低下による上皮構造の破綻は胆嚢組織自律的であることが示唆され、胆嚢上皮の破綻による細胞の脱落は *in vivo* で得られた表現型と類似していることから、*Sxo17* 発現低下による胆嚢低形成は周囲の器官による影響を受けない胆嚢組織自律的变化であることが示唆された。また、胆嚢器官培養法が胆嚢形成を詳細に解析することが出来る有用な方法として確立されたと考えられる。

## 考 察

*Sox17* の胆嚢原基におけるノックダウンにより胆嚢形成が阻害されることから、*Sox17* 遺伝子発現は前腸内胚葉から胆嚢への分化に必須であることが報告されている (Spence et al., 2010 ; Uemura et al., 2010)。本研究では、前腸内胚葉から分化後の胆嚢・胆管系形成において *Sox17* 発現の低下は胆嚢の形成不全を引き起こし、胎齢 17.5 日での肝炎の発症に関与する可能性が示唆され、*Sox17* 発現は胎生期における胆嚢・胆管系上皮の正常な形成に必須であることを示した。

### **Sox17 ハプロ不全のバックグランドによる表現型の差**

マウスの疾患モデルにおいて遺伝的バックグランドが表現型や生存率に影響を与えることが報告されており (Doetschman, 1999)、当研究室で認められた *Sox17* ハプロ不全による肝炎の発症も遺伝的バックグランドによる違いが確認された。当研究室での *Sox17* ノックアウトマウスの C57BL/6 系統 (B6) マウスへの戻し交配により 4-5 世代目から *Sox17*<sup>+/+</sup> 胎子の生存率が低下し (表 0-1)、新生子肝炎の発症率の増加が認められた (表 0-1, 図 1-2A)。B6 バックグランドでの *Sox17* ハプロ不全による肝炎の発症は ICR バックグランド胎子よりも高い肝炎の発症率が認められ (図 1-4A)、このバックグランドによる肝炎の発症率の差の原因として、B6 バックグランドでの胎齢 15.5 日の胆嚢上皮での *Sox17* 発現の低下が関係していることが推察された (図 1-4C)。

### ***Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢と脱落細胞による胆道閉塞**

前腸内胚葉から分化後の胎齢 13.5 日から 16.5 日での胆嚢・胆管領域で *Sox17* 陽性細胞は胆嚢領域に限局して局在が認められ、PCNA 陽性細胞も同様の部分に限局して観察された（図 1-6）。また、*Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢上皮では PCNA 陽性細胞率、Ki67 陽性細胞率、及び BrdU 標識細胞率が有意に低下していたことから（図 1-7）、*Sox17* 発現は胆嚢上皮での細胞増殖活性を調節していると考えられ、8 週齢で認められた *Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢の低形成は胆嚢上皮での増殖活性の低下が一因と考えられる。また、*Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢では管腔内への DBA 陽性及び HNF6 陽性の胆管上皮細胞の脱落が認められ、脱落細胞による胆管上皮への密着が胆管閉塞を引き起こす原因となる可能性を示した（図 1-8）。さらに、*Sox17* ハプロ不全による肝炎は胎齢 17.5 日から認められたが（図 1-1）、胎齢 16.5 日に初めて腸管内に胆汁が確認されたことから（図 1-5）、肝炎の発症には管腔内に脱落した上皮細胞によって胆道閉鎖が起こることによる、胆汁うっ滞が関係していると推察される。

### **胆嚢器官培養法による *Sox17*<sup>+/−</sup> 胆嚢の形成不全の解析**

*Sox17* を含む SOX F グループでは基底膜を構成するフィブロネクチンとラミニン  $\alpha$  1 の遺伝子発現との関係（Niimi et al., 2004、Shirai et al., 2005）や *Sox17* 遺伝子が胚性内胚葉 と胚外内胚葉における基底膜のラミニン形成を調節していることが報告されている（Artus et al., 2011、Shimoda et al., 2007）。本研究では、*Sox17*<sup>+/−</sup> 胆嚢上皮における基底膜減少が電子顕微鏡解析によって明らかとなり（図 1-7B）、さらに、胆嚢上皮基底膜におけるラミニンの部分的欠損と細胞と細胞外基質の接着因子であるインテグリン  $\beta$  1 局在の低下が認められ（図 1-9C、E）、ラミニンの欠損部で上皮細胞の脱落が



起きていたことから、*Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮では *Sox17* 発現の低下により上皮細胞と細胞外基質を接着させているインテグリン  $\beta 1$  やラミニンの局在が減少することによる基底膜の低形成が起こり、上皮細胞との接着が不安定となったため、上皮細胞の脱落が起こっていることが示唆された。また、*Sox17* 発現が前腸内胚葉での上皮構造を調節している Rho GTPase 遺伝子発現を抑制することが報告されており (Loebel et al., 2011)、本研究での細胞外基質との細胞接着障害が *Sox17*<sup>+/-</sup> 胆嚢上皮の腔内への脱落を引き起こす可能性を示唆していると考えられる。

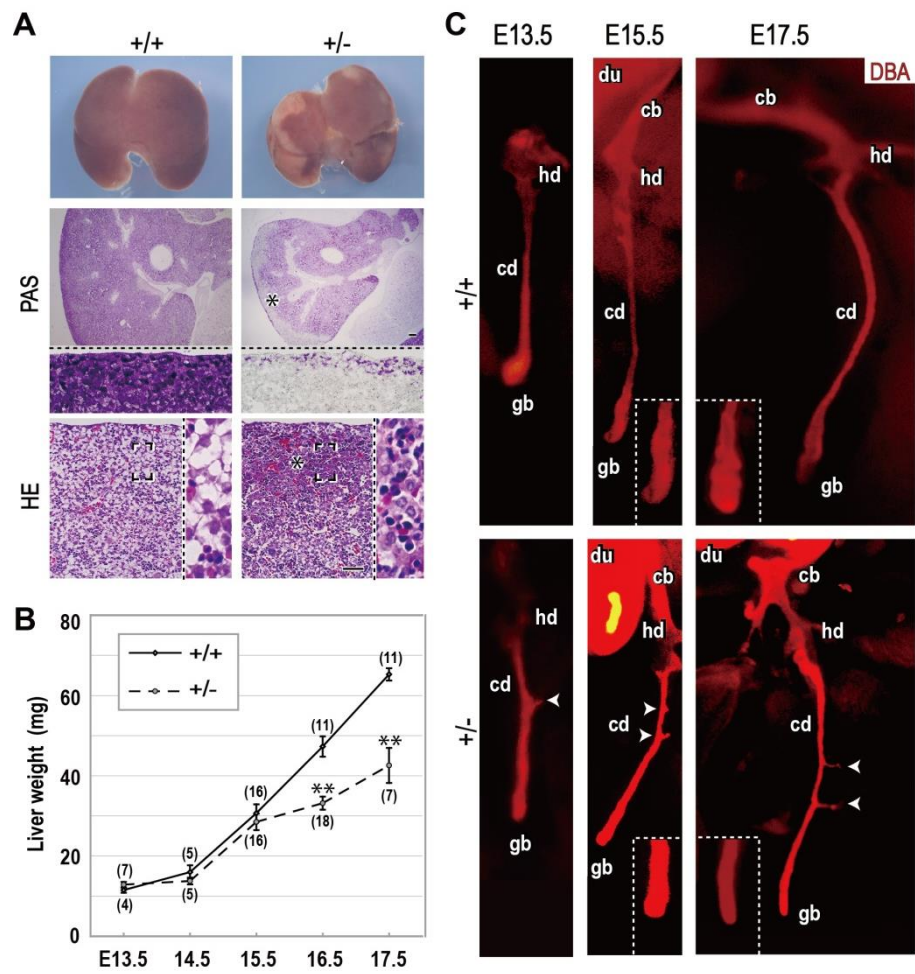
## まとめ

本研究において、*Sox17* 発現の低下により、胆嚢上皮細胞の増殖活性の低下と基底膜成分の減少や細胞外基質との接着因子の低下による管腔内への上皮細胞の脱落が起こり、脱落した細胞により胆管の狭窄または閉塞が生じ、二次的に肝炎を誘発することが明らかとなった。

*Sox17* ハプロ不全による肝炎とヒトの新生児胆道閉鎖症では胎生期の胆道閉鎖による肝炎の発症という共通点があり、本研究で認められた *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢での細胞自律的な胆管上皮の障害はヒトの新生児胆道閉鎖症の直接的な原因の一つとなる可能性があり、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスは新生児胆道閉鎖症モデルマウスとして有用であると考えられる。今後は、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスを用いて胆嚢・胆管形成における *Sox17* 発現の詳細な役割を解明することで新生児胆道閉鎖症のさらなる原因解明につながることを期待される。

## 図表及びその説明

Fig 1-1



### 図 1-1 胎齢 17.5 日における Sox17 ハプロ不全による肝炎

胎齢 17.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス及び野生型マウスの肝臓像 (A 上段、組織切片の PAS 染色 (A 中段) 及び HE 染色 (A 下段) 並びに肝臓重量の定量 (B)。胎齢 13.5 日、15.5 日及び 17.5 日での *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス及び野生型マウスの胆嚢・胆嚢管領域のホール DBA 染色 (C)。

(A、B) 胎齢 17.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス肝臓では辺縁が白くなり、PAS 陰性、細胞の集簇 (A)、肝臓重量の有意な減少が認められた (B)。(\*\**p*<0.01)

(C) 胎齢 13.5 日から胎齢 17.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス胆嚢管領域では異所性胆管の形成が認められ (下図、矢頭)、胎齢 17.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス胆嚢では野生型と比較して先端の膨らみが小さい傾向が認められた (左端図の拡大図)。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス

gb : 胆嚢、cd : 胆嚢管、duo : 十二指腸、hd : 肝管

グラフは平均値± SEM にて表記

Scale bars: 50 µm

Fig 1-2

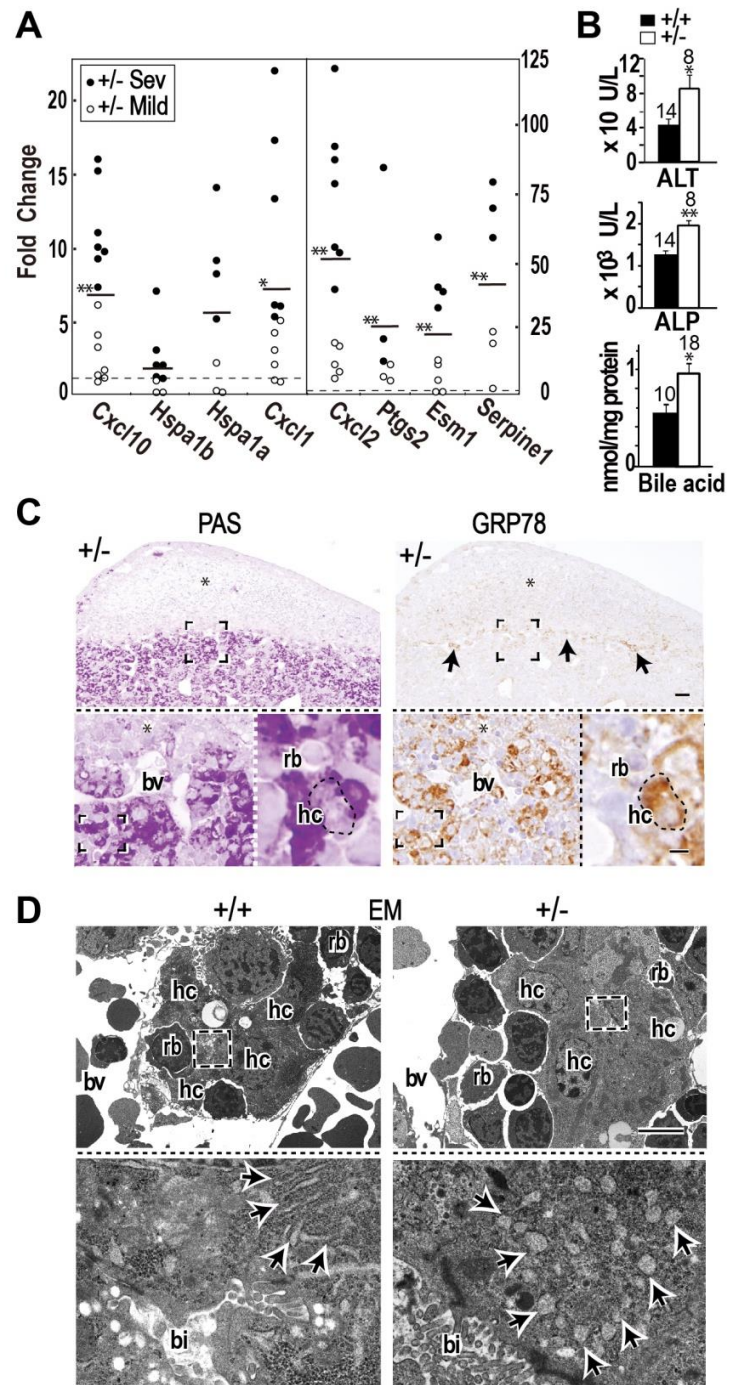


図 1-2 胎齢 17.5 日での *Sox17* ハプロ不全における肝臓の解析

- (A) C-X-C motif chemokine 10 (*Cxcl10*)、Heat shock 70 kDa protein 1A (*Hspa1a*)、Heat shock 70 kDa protein 1B (*Hspa1b*)、C-X-C motif chemokine 1 (*Cxcl1*)、C-X-C motif chemokine 2 (*Cxcl2*)、Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*)、Endothelial cell-specific molecule 1 (*Esm1*) 及び Serine peptidase inhibitor, clade E, member 1 (*Serpine1*) 発現の定量解析。*Cxcl10*、*Cxcl1*、*Cxcl2*、*Ptgs2*、*Esm1* 及び *Serpine1* で *Sox17*<sup>+/+</sup>肝臓では野生型と比較して、有意な発現の増加が認められた。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )
- (B) *Sox17*<sup>+/+</sup>肝臓では野生型と比較して、Alanine transaminase (ALT)、Alkaline Phosphatase (ALP) 及び胆汁酸レベルの有意な増加が認められた。
- (C) *Sox17*<sup>+/+</sup>肝臓での炎症部位及び同様の部位の野生型肝臓の PAS 染色及び抗 Glucose-regulated protein78 (GRP78) 抗体を用いた免疫染色像。*Sox17*<sup>+/+</sup>肝臓では GRP78 陽性の肝細胞が PAS 陰性領域の周囲に認められた。(矢印)
- (D) *Sox17*<sup>+/+</sup>肝臓での炎症部位及び同様の部位の野生型肝臓の電子顕微鏡像。*Sox17*<sup>+/+</sup>肝臓では野生型と比較して、粗面小胞体の大型化が認められた (矢頭)。

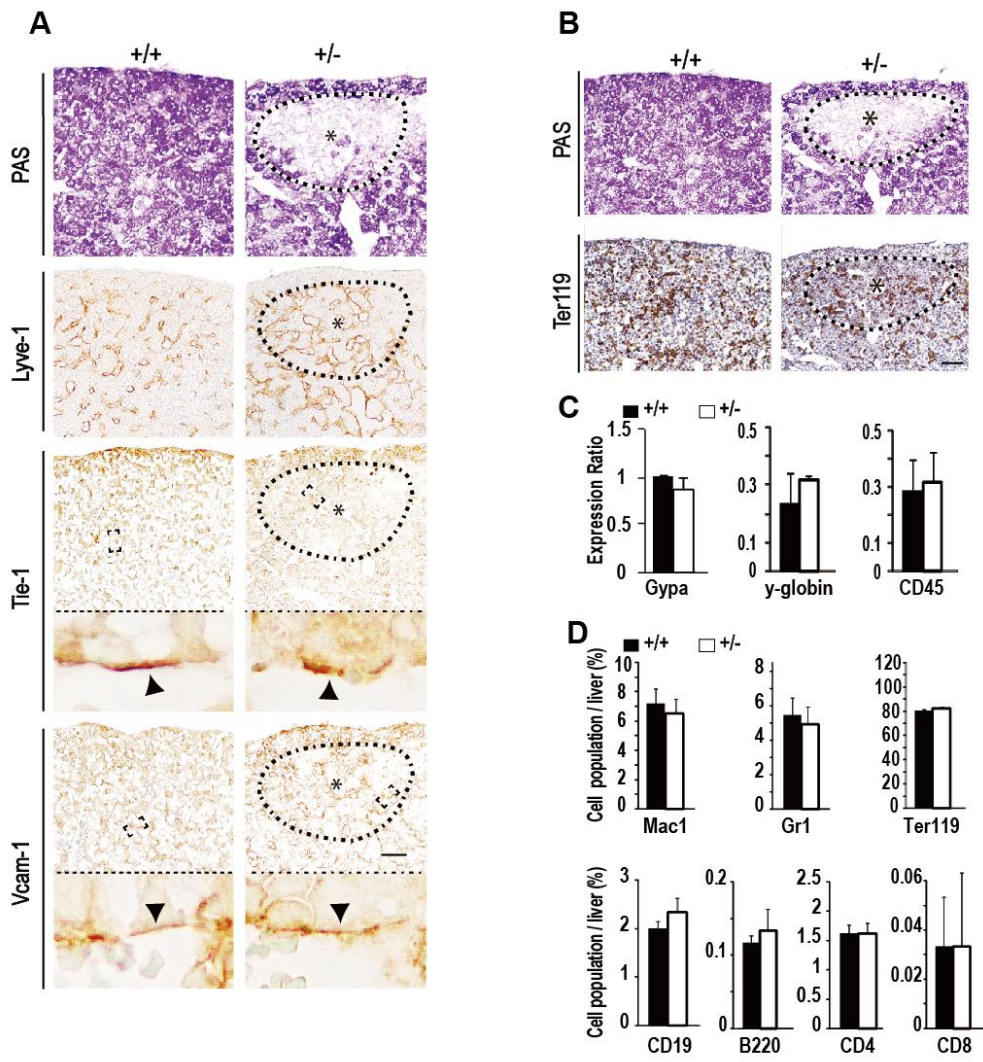
+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/+</sup>マウス

hc : 肝細胞、rb : 赤芽球、bv : 血管、bi : 毛細胆管

グラフは野生型の平均値を 1 として相対値を表記

Bars : 50  $\mu\text{m}$  (C 上段)、 5  $\mu\text{m}$  (C 下段、D)

Fig 1-3



### 図 1-3 胎齢 17.5 日の肝臓における血球系、血管系、及びリンパ管系マーカーの発現解析

(A、B) *Sox17*<sup>+/-</sup>肝臓での炎症部位及び同様の部位の野生型肝臓の PAS 染色、抗 Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve-1) 抗体、抗 Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 (Tie-1) 抗体、抗 vascular cell adhesion molecule-1 (Vcam-1) 抗体 (A) 及び抗 Ter-119 抗体 (B) を用いた免疫染色像。局在に野生型との違いは認められなかった。破線部に囲まれた部分は炎症部位を示している。

(C) Glycophorins A (Gypa)、 $\gamma$ -globin 及び CD45 発現は野生型と比較して、有意な差は認められなかった。

(D) Macrophage-1 antigen (Mac-1)、granulocyte-differentiation antigen-1 (Gr-1)、Ter-119、CD19、B220、CD4 及び CD8 の各プローブを用いたフローサイトメトリーでは、野生型肝臓と比較して、*Sox17*<sup>+/-</sup>肝臓で分布に有意な差は認められなかった。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス

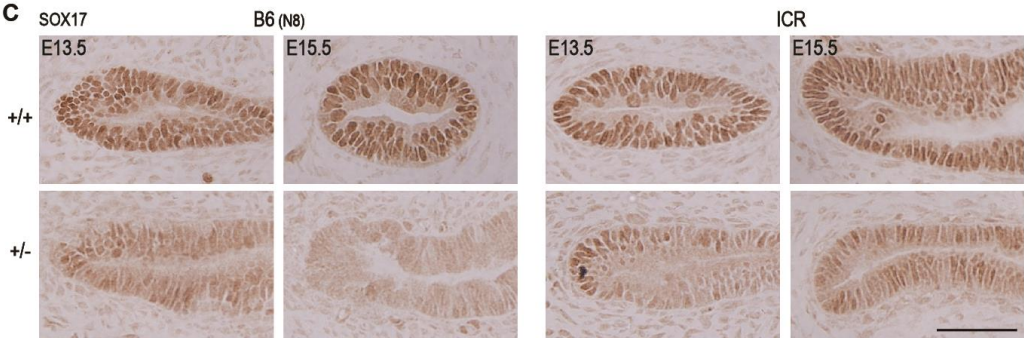
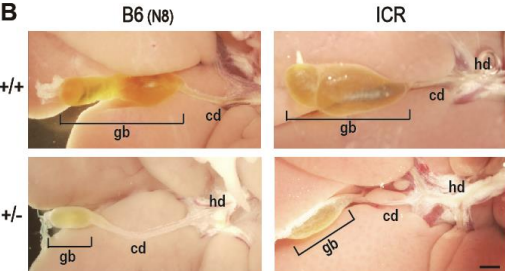
グラフは平均値 $\pm$ SEM にて表記

scale bar:50  $\mu$ m



## 图 1-4

A	Liver				Bile duct	
		Liver weight (mg)	ratio of (+/-)/(+/+)	Incidence ratios of embryonic hepatitis	Ectopic hd formation	
B6	+/+	65.0±2.0		0/90 (0%)	5/28	(17.9%)
(N <sub>7.8</sub> )	+/-	43.0±4.0	(0.66)	55/88 (62.5%)	21/22	(95.5%)
ICR	+/+	97.7±2.5		0/33 (0%)	1/35	(2.9%)
	+/-	92.5±2.2	(0.95)	2/38 (5.2%)	13/38	(34.2%)
129 <sub>SvJ</sub> /B6	+/+	64.8±4.2		0/15 (0%)	0/15	(0%)
(N <sub>1.2</sub> )	+/-	59.3±2.1	(0.92)	0/12 (0%)	2/12	(16.7%)



#### 図 1-4 Sox17 ハプロ不全のバックグランド比較

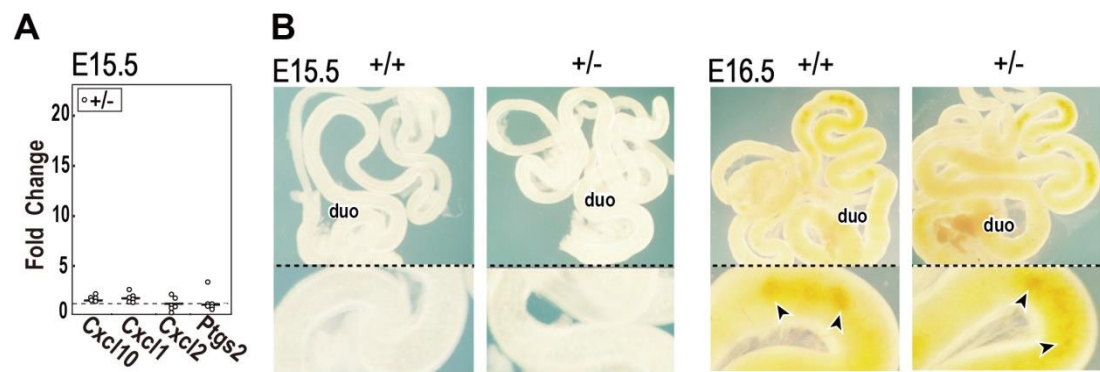
- (A) *Sox17* ノックアウトマウスの B57BL/6 (B6)、ICR、及び 129sv への戻し交配による各系統での胎齢 17.5 日の肝臓重量及びヘテロマウスの割合は、B6 バックグランドでは野生型と比較して *Sox17*<sup>+/-</sup>では減少し、肝炎発症割合は B6 バックグランドの *Sox17*<sup>+/-</sup>では他の系統よりも高く、異所性胆管形成割合は 3 系統ともに野生型と比較して *Sox17*<sup>+/-</sup>で高い発現率が認められた。
- (B) 8 週齢で *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢は B6 及び ICR バックグランドで低形成が認められた。
- (C) 胎齢 13.5 日、15.5 日の B6 及び ICR バックグランド胆嚢上皮の抗 SOX17 抗体を用いた免疫染色像。胎齢 15.5 日の B6 バックグランドの *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮では ICR バックグランドよりも SOX17 陽性細胞局在の減少が認められた（下段左 2 枚目）。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス

gb : 胆嚢、cd : 胆嚢管、hd : 肝外胆管

Bar : 1 mm (B)、50  $\mu$ m (C)

图 1-5



### 図 1-5 腸管への胆汁排出時期の検討

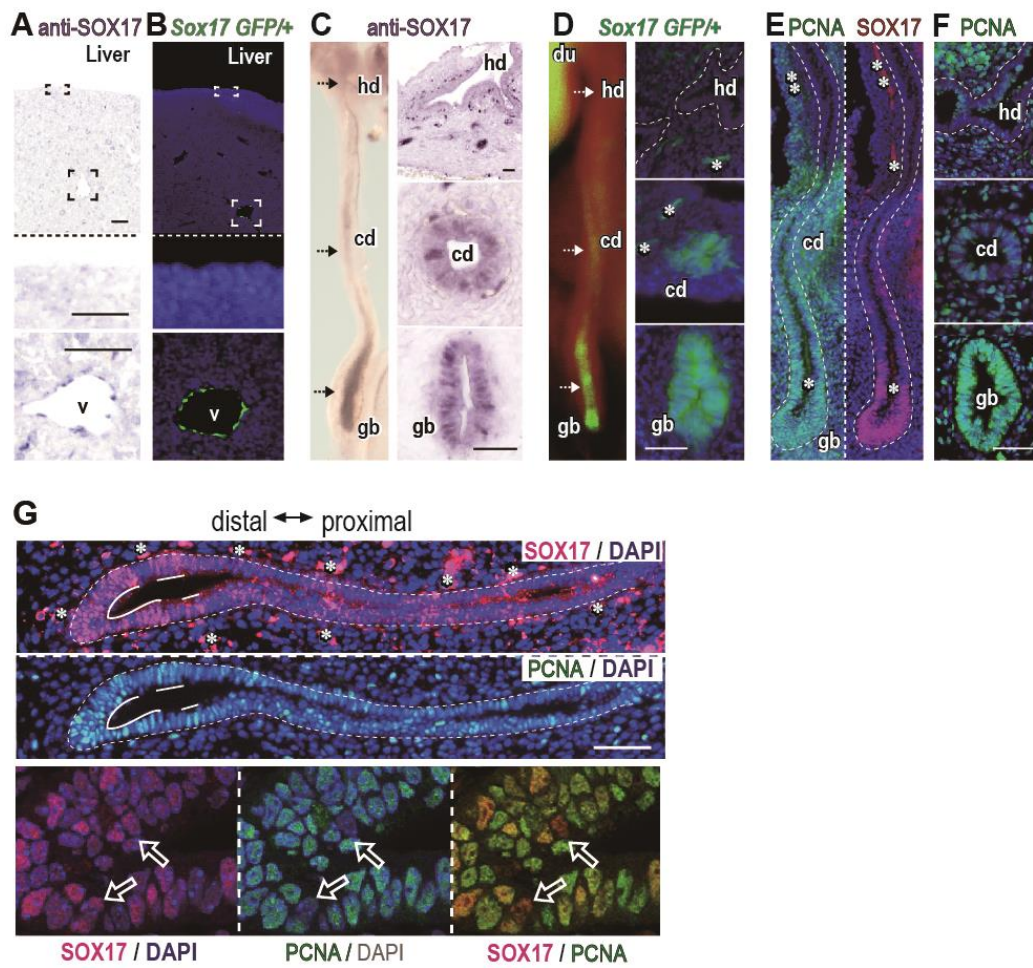
- (A) 胎齢 15.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>での *Cxcl10*、*Cxcl1*、*Cxcl2*、及び *Ptgs2* 発現は野生型と比較して差は認められなかった。
- (B) 胎齢 15.5 日では腸管内に胆汁は認められなかったが、胎齢 16.5 日では野生型及び *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスで腸管内に胆汁が認められた。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス

グラフは野生型の平均値を 1 として相対値を表記

duo : 十二指腸

Fig 1-6



**図 1-6 胎齢 13.5 日及び胎齢 16.5 日での胆嚢・胆管系における SOX17 陽性細胞及び PCNA 陽性細胞の局在**

野生型胆管系における胎齢 13.5 日及び 16.5 日の抗 SOX17 抗体 (A、C、E の右図)、及び抗 PCNA 抗体 (E の左図、F) を用いた免疫染色像。Sox17<sup>GFP/+</sup>胆嚢における GFP 局在像及び抗 GFP 抗体を用いた免疫染色像 (B、D)。

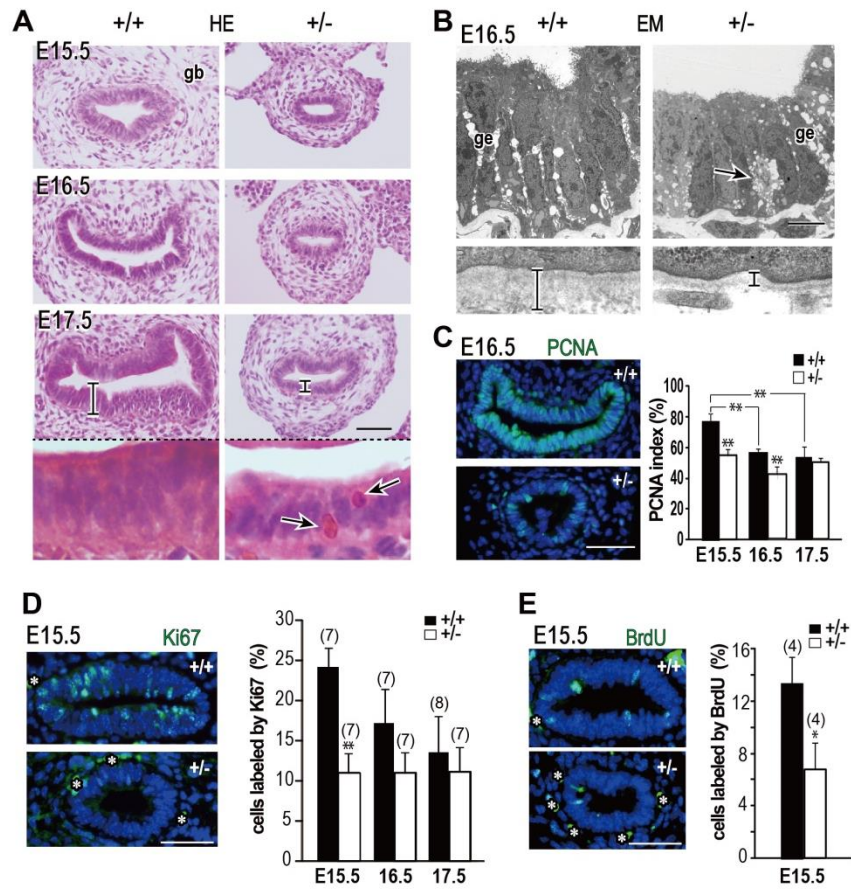
(A-D) 胎齢 16.5 日の肝臓では野生型及び Sox17<sup>+/-</sup>マウスで肝細胞には SOX17 陽性細胞は認められず、血管内皮細胞にのみ認められた。(A、B)。野生型では、胆嚢上皮及び一部の胆嚢管上皮に SOX17 陽性細胞が認められ (C)、Sox17<sup>GFP/+</sup>マウスでは GFP 陽性細胞が胆嚢上皮及び胆嚢管に認められた (D)。

(E-G) 胎齢 13.5 日の野生型では、PCNA 陽性細胞が胆嚢と胆嚢管に認められ、SOX17 陽性細胞は胆嚢上皮に局在していた (E)。胎齢 16.5 日の野生型では、PCNA 陽性細胞は胆嚢上皮に多く局在し、胆嚢管の一部の上皮細胞にも局在が認められた (F)。胎齢 15.5 日の野生型では、胆嚢先端部で SOX17 陽性かつ PCNA 陽性細胞の局在が多く認められた (G)。

gb : 胆嚢、cd : 胆嚢管、hd : 肝外胆管、v : 中心静脈

Bar : 50  $\mu$ m.

图 1-7



## 図 1-7 胎齢後期での胆嚢上皮形態の解析

- (A) 胎齢 15.5 日から 17.5 日までの胆嚢上皮の HE 染色像。野生型では胆嚢上皮の偽重層化が認められたが、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮は胎齢 17.5 日においても単層であった。また、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮では凝集した細胞が認められた（矢印）。
- (B) 胎齢 16.5 日の胆嚢上皮の電子顕微鏡像。野生型と比較して、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮の基底膜は薄く（下図）、上皮に脱落している細胞が認められた（矢印）。
- (C-E) 胆嚢上皮の抗 PCNA 抗体、抗 Ki67 抗体または抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色像と胎齢 15.5 日から 17.5 日までの増殖率グラフ。野生型では PCNA 陽性細胞が多く認められ、胎齢 15.5 日では約 80%が PCNA 陽性細胞であった。、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮では野生型と比較して局在が少なく、胎齢 15.5 日及び 16.5 日では PCNA 陽性細胞率が有意に減少し（C）、Ki67 陽性細胞及び BrdU の局在率は胎齢 15.5 日の *Sox17*<sup>+/-</sup>上皮で有意に減少した（D、E）。(\**p*<0.05、\*\**p*<0.01)

C のグラフは各群 n=10 の平均値。D、E のグラフ上の数字は個体数を示す。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/-</sup>マウス

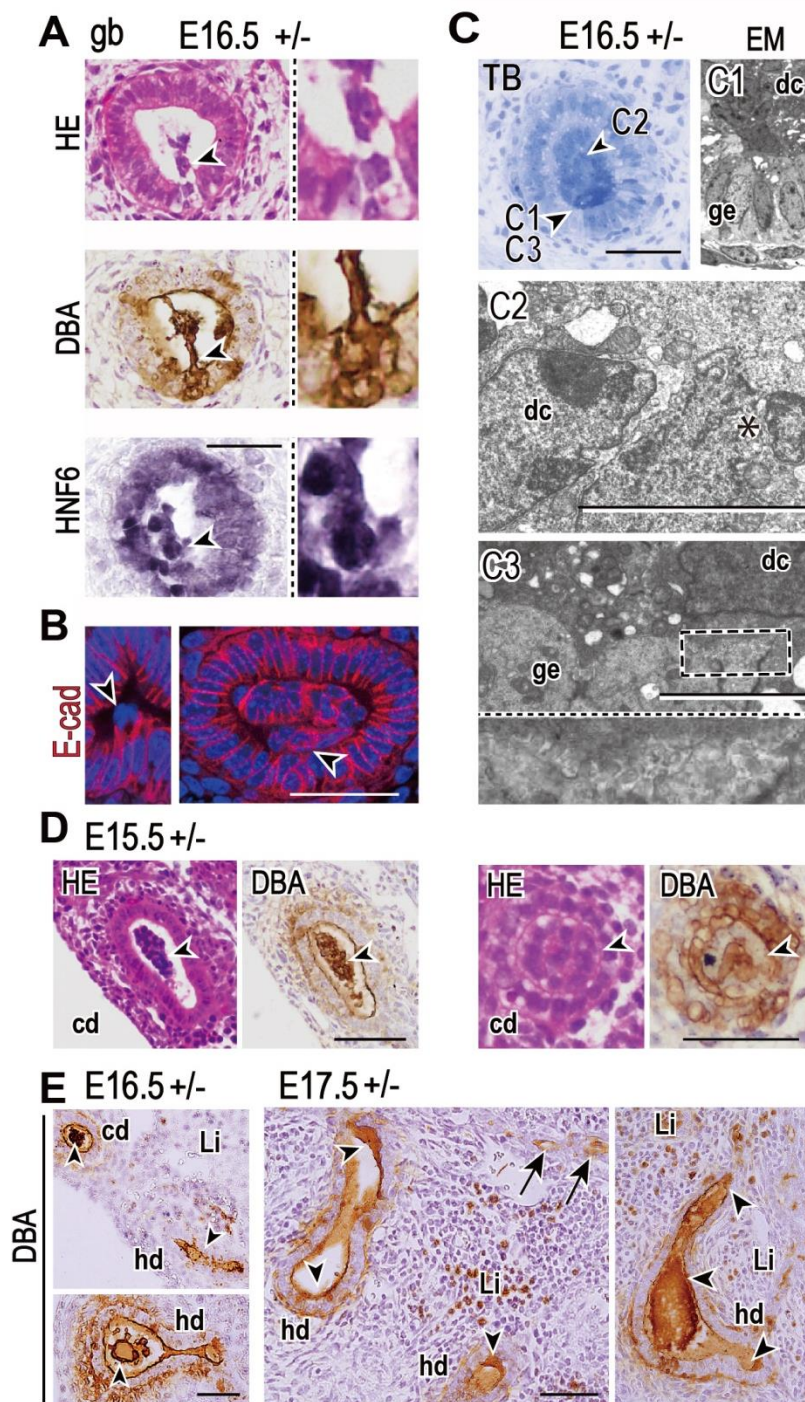
グラフは平均値±SEM にて表記

gb : 胆嚢

Bar : 50 μm. (A、C-E)、Bar : 5 μm. (B)



图 1-8



## 図 1-8 Sox17<sup>+/-</sup>-マウスにおける胆道閉鎖

(A-C) 胎齢 16.5 日の Sox17<sup>+/-</sup>-胆嚢上皮の HE 染色、DBA 染色及び抗 Hepatocyte Nuclear Factor 6 (HNF6) 抗体 (A)、抗 E-cadherin (E-cad) 抗体 (B) を用いた免疫染色像並びに電子顕微鏡像 (C)。DBA 陽性、HNF6 陽性または E-cad 陽性の胆嚢上皮細胞が管腔内に脱落していた (A、B、矢頭)。管腔内に脱落した細胞はネクロシスを起こしており (C2)、胆嚢上皮に密着していた (C3)。

(D、E) Sox17<sup>+/-</sup>-マウスの胎齢 15.5 日の胆嚢管 (D)、胎齢 16.5 日及び 17.5 日の肝管、及び胆嚢管の HE 染色及び DBA 染色像。胎齢 15.5 日及び 16.5 日の胆嚢管で脱落した胆嚢上皮がつまり、管腔を閉塞していた (D 及び E の左図、矢頭)。肝管内で胆道閉塞が認められた (E の右図、矢頭)。

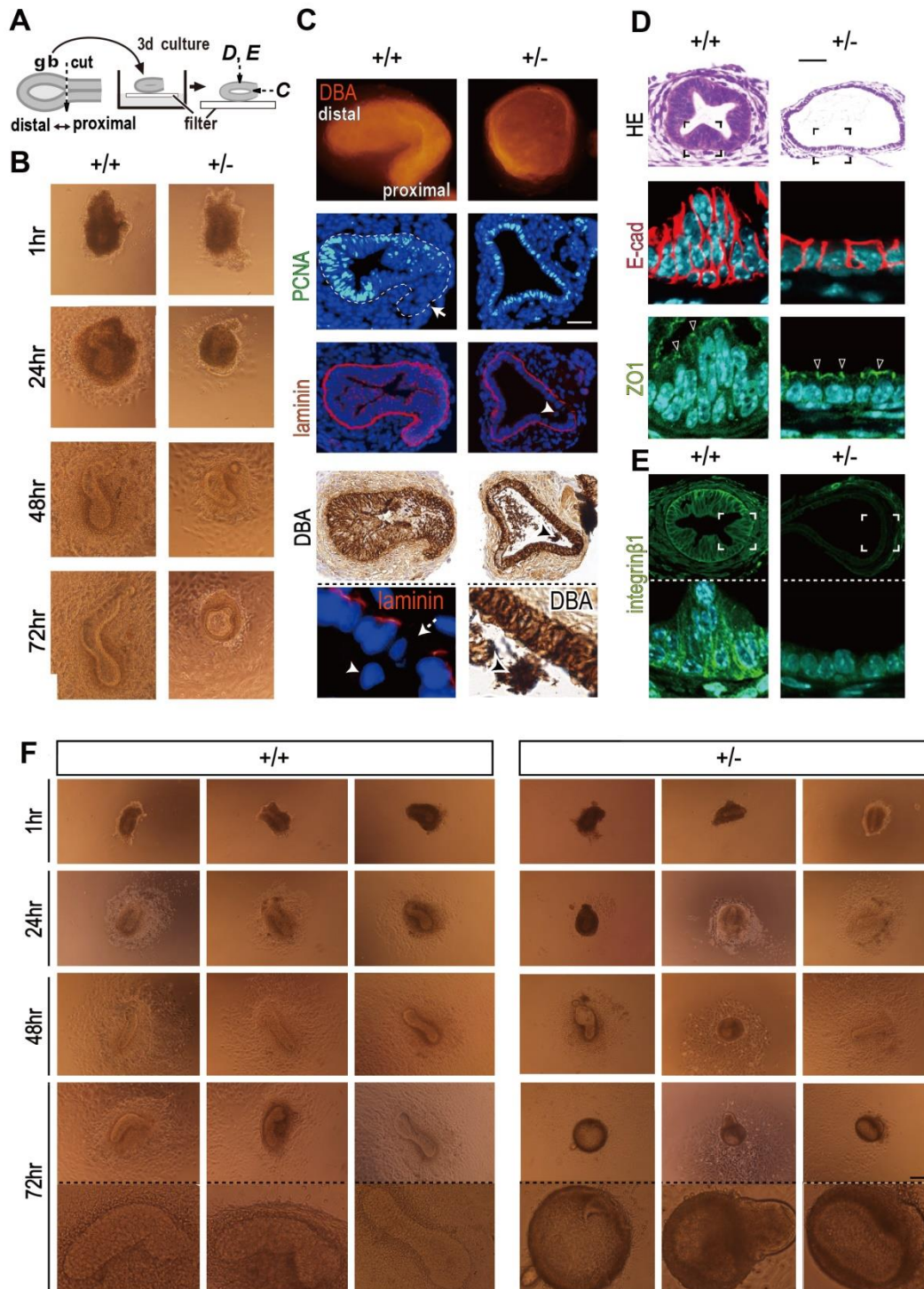
+/- : Sox17<sup>+/-</sup>-マウス

gb : 胆嚢、cd : 胆嚢管、hd : 肝外胆管、Li : 肝臓

ge : 胆嚢上皮、dc : 管腔へ脱落した細胞

Bar : 50  $\mu$ m. (C2、C3 以外)、Bar : 5  $\mu$ m. (C2、C3)

图 1-9



### 図 1-9 胆嚢器官培養を用いた *in vitro* 解析

- (A) 胆嚢の培養法の模式図。
- (B、F) 培養 1、24、48 及び 72 時間後の形態変化。野生型では、胆嚢は経時的に遠近軸に沿った伸長が認められた。*Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢では伸長は認められず、膨化が認められた。
- (C) 培養 72 時間後の胆嚢のホール DBA 染色（最上段）、抗 PCNA 抗体（2 段目）、抗ラミニン抗体（3 段及び 5 段）、及び DBA 染色（4 段及び 5 段）による免疫染色像。野生型では、胆嚢の先端部分での PCNA 陽性細胞の局在が認められ、基底膜ではラミニンが連続して確認された。*Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢では、PCNA の局在に極性は認められず、基底膜のラミニンは断続的であり、ラミニンが途切れた部分で上皮細胞の脱落が認められた（5 段）。
- (D、E) 培養 72 時間後の胆嚢上皮の HE 染色（D 最上段）、抗 E-cad 抗体（D 中段）、抗 Zonula occludens-1（ZO-1）抗体（D 下段）及び抗 Integrin  $\beta 1$  抗体（E）を用いた免疫染色像。野生型胆嚢では上皮の偽重層化が認められたが、*Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢上皮は単層であった（D 上段）。E-cad と ZO-1 局在に差は認められなかったが（D 中段、下段）、野生型と比較して *Sox17*<sup>+/−</sup>胆嚢では Integrin  $\beta 1$  局在は減少していた（E）。

+/+ : 野生型マウス、+/- : *Sox17*<sup>+/−</sup>マウス

gb : 胆嚢

Bar : 50  $\mu$ m

## 第 2 章

### *Sox17* 遺伝子の胆嚢・胆管形成における役割の解明

本章の内容は、雑誌掲載の形で出版する計画があるため公表できない。  
5 年以内に公表予定。

## 総合考察

本研究では、第 1 章で *Sox17* ハプロ不全の肝炎は胆嚢での *Sox17* 発現低下による胆嚢形成不全が原因とな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* 発現を介して、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、胆嚢を胆嚢管化させることを明らかにした。

胆嚢・胆管系は肝臓で産生された胆汁を貯留するとともに、腸管への胆汁の流路であり、先天的胆管疾患やウィルス感染による胆管の傷害はこの流路の破綻を引き起こし、胆汁のうっ滞による、胆石の形成や肝炎等の疾患の原因となる(Zong and Stanger, 2011)。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と考えられており、胆汁うっ滞の一因として、胎児期の胆管形成不全が考えられているが、ヒトの新生児胆道閉鎖症では、胆嚢が線維化し痕跡程度しか認められないことから、詳細な検討が困難であり、疾患モデルマウスの作出が望まれている。

当研究室では認められた *Sox17* ハプロ不全、*Sox17*<sup>+/−</sup>マウス出生子率の低下は胎齢 17.5 日における肝炎の発症が原因と考えられ、肝臓には一次原因がないことが示唆されたことから、前腸内胚葉から発生した原基からの分化に *Sox17* 発現が必須である胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 遺伝子の働きに着目し、研究を行った。第 1 章では、*Sox17* 発現が低下した胆嚢上皮の形成不全により胆嚢上皮細胞が脱落し、脱落した上皮細胞による胆管閉塞・胆汁うっ滞が *Sox17* ハプロ不全による肝炎を引き起こすことを明らかにし、*Sox17*<sup>+/−</sup>マウスの新生児胆道閉塞症のモデルマウスとしての有用性を示した。また、*Sox17* ハプロ不全による肝炎の発症はマウスの系統により異なるが、8



週齢での *Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの胆嚢低形成は系統に関係なく認められたことから、胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 発現の重要性が推察され、第 2 章では、マイクロアレイ解析を用いて、*Sox17* 発現の下流を探索することで、胆嚢・胆管系形成の分子機構の解明を試み、胆嚢周囲間葉系組織での平滑筋形成が胆嚢の形態維持に重要であり、*Sox17* 発現は *Shh* シグナルを介して平滑筋形成の調節を行っていることを明らかにした。また、胆嚢の平滑筋の欠損は胆管内での胆石形成や胆石形成促進食マウスで胆嚢炎症を引き起こすことが報告されており (Levoie et al., 2012)、ヒトでは胆嚢平滑筋の機能不全は胆嚢障害の主な原因と考えられている (Portincasa et al., 2004, 2008) ことから、本研究で、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮での *Shh* 発現低下により、胆嚢周囲間葉系組織での平滑筋の形成不全が認められたことが *Sox17* ハプロ不全による肝炎の原因であると推察される。さらに、*Hh* 発現が胆管傷害に反応し、胆管障害による線維化の際に増加すること (Cui et al., 2013 ; Omenetti et al., 2008) が報告されていることから、*Shh* シグナルの低下が *Sox17* ハプロ不全による肝炎を引き起こす大きな要因であると考えられる。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、症状が現れた時には肝炎が発症しているため、早期の発見が重要であり、現在、便色カードでの早期発見が試みられている。本研究によって、胆嚢・胆管系形成における *Sox17* 発現とその下流の遺伝子を同定したことは、新生児胆道閉鎖症の原因解明及び早期発見のためのバイオマーカーの探索に繋がると考えられ、*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスの新生児胆道閉鎖症モデルマウスとしての有用性を示している。

また、本研究で器官培養法を用いて *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢の形成不全状態に SHH を外部環境から加えることで、平滑筋層の形成を促し、胆嚢上皮の偽重層化が起こることを示したが、一方で、SHH ビーズ群の *Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮は SOX9 陽性ではあるが上皮は偽重層化したことから、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮が単層円柱状の胆嚢管様形態となることは、*Sox9*

発現とは独立していることが推察され、*Sox17*<sup>+/-</sup>胆嚢上皮における *Sox9* 発現については、さらなる解析が必要と考える。小腸の筋形成は HGF や WNT のような他のシグナルを介して腸陰窩の上皮のホメオスタシスを調節していることが報告されていることから (Medema & Vermeulen, 2011)、胆嚢・胆管系形成においても間葉系組織からの他のシグナルを介して、間接的に胆嚢上皮の形成に関わっていることが考えられるが今後、さらなる解析が必要である。*Sox17*<sup>+/-</sup>マウスを用いた胆嚢・胆管系形成の詳細な解析が期待される。

## 引用文献

**Apelqvist, a, Ahlgren, U. and Edlund, H.** (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol.* **7**, 801–4.

**Artus, J., Piliszek, A. and Hadjantonakis, A. K.** (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* **350**, 393–404.

**Asai, A., Miethke, A. and Bezerra, J. a.** (2015). Pathogenesis of biliary atresia: defining biology to understand clinical phenotypes. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 342–352.

**Baghdasaryan, A., Claudel, T., Gumhold, J., Silbert, D., Adorini, L., Roda, A., Vecchiotti, S., Gonzalez, F. J., Schoonjans, K., Strazzabosco, M., et al.** (2011). Dual farnesoid X receptor/TGR5 agonist INT-767 reduces liver injury in the Mdr2 <sup>-/-</sup> (Abcb4 <sup>-/-</sup>) mouse cholangiopathy model by promoting biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> output. *Hepatology* **54**, 1303–1312.

**Bart van der Worp, H., Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O’Collins, V. and Macleod, M. R.** (2010). Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* **7**, 1–8.

**Cardinale, V., Wang, Y., Carpino, G., Cui, C. Bin, Gatto, M., Rossi, M., Bartolomeo Berloco, P., Cantafora, A., Wauthier, E., Furth, M. E., et al.** (2011). Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology* **54**, 2159–2172.

**Carpino, G., Cardinale, V., Onori, P., Franchitto, A., Berloco, P. B., Rossi, M.,**

**Wang, Y., Semeraro, R., Anceschi, M., Brunelli, R., et al.** (2012). Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: An anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J. Anat.* **220**, 186–199.

**Caubit, X., Lye, C. M., Martin, E., Core, N., Long, D. A., Vola, C., Jenkins, D., Garratt, A. N., Skaer, H., Woolf, A. S., et al.** (2008). Teashirt 3 is necessary for ureteral smooth muscle differentiation downstream of SHH and BMP4. *Development* **135**, 3301–3310.

**Clotman, F., Lannoy, V. J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (2002). The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* **129**, 1819–1828.

**Cui, S., Leyva-Vega, M., Tsai, E. A., Eauclore, S. F., Glessner, J. T., Hakonarson, H., Devoto, M., Haber, B. A., Spinner, N. B. and Matthews, R. P.** (2013). Evidence from human and zebrafish That GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene. *Gastroenterology* **144**,.

**DeSouza, K. R., Saha, M., Carpenter, A. R., Scott, M. and McHugh, K. M.** (2013). Analysis of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Normal and Abnormal Bladder Development. *PLoS One* **8**,.

**Doetschman, T.** (1999). Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Lab Anim Sci* **49**, 137–143.

**Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., et al.** (2004). Regurgitation of bile acids

from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice.

*Gastroenterology* **127**, 261–274.

**Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., et al.** (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* **43**, 34–41.

**Gersemann, M., Becker, S., Nuding, S., Antoni, L., Ott, G., Fritz, P., Oue, N., Yasui, W., Wehkamp, J. and Stange, E. F.** (2012). Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD. *J. Crohn's Colitis* **6**, 425–434.

**Grover, P. K., Hardingham, J. E. and Cummins, A. G.** (2010). Stem cell marker olfactomedin 4: Critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 761–775.

**Hackam, D. G. and Redelmeier, D. A.** (2006). Translation of Research Evidence From Animals to Humans. *Jama* **296**, 1727–1732.

**Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. and Tabin, C. J.** (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517–528.

**He, S., Kim, I., Lim, M. S. and Morrison, S. J.** (2011). Sox17 expression confers self-renewal potential and fetal stem cell characteristics upon adult hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* **25**, 1613–1627.

**Hunter, M. P., Wilson, C. M., Jiang, X., Cong, R., Vasavada, H., Kaestner, K. H. and Bogue, C. W.** (2007). The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast

differentiation and bile duct morphogenesis. *Dev. Biol.* **308**, 355–367.

**Kalinichenko, V. V., Zhou, Y., Bhattacharyya, D., Kim, W., Shin, B., Bambal, K. and Costal, R. H.** (2002). Haploinsufficiency of the mouse forkhead box f1 gene causes defects in gall bladder development. *J. Biol. Chem.* **277**, 12369–12374.

**Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Noce, T., Saido, T. C., Shiroishi, T., Hayashi, Y. and Yazaki, K.** (1996). Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J. Cell Biol.* **133**, 667–681.

**Kanai-azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K. and Tam, P. P. L.** (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. **2379**, 2367–2379.

**Keyzer-Dekker, C. M. G., Lind, R. C., Kuebler, J. F., Offerhaus, G. J. A., Ten Kate, F. J. W., Morsink, F. H. M., Verkade, H. J., Petersen, C. and Hulscher, J. B. F.** (2015). Liver fibrosis during the development of biliary atresia: Proof of principle in the murine model. *J. Pediatr. Surg.* **50**, 1304–1309.

**Kidokoro, T., Matoba, S., Hiramatsu, R., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Taya, C., Kurohmaru, M., Kawakami, H., Hayashi, Y., Kanai, Y., et al.** (2005). Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev. Biol.* **278**, 511–525.

**Kim, I., Saunders, T. L. and Morrison, S. J.** (2007). Sox17 Dependence Distinguishes the Transcriptional Regulation of Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell* **130**, 470–483.

**Kohsaka, T., Yuan, Z. rong, Guo, S. xia, Tagawa, M., Nakamura, A., Nakano, M., Kawasasaki, H., Inomata, Y., Tanaka, K. and Miyauchi, J.** (2002). The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* **36**, 904–912.

**Li, Y., Zhang, H., Choi, S. C., Litingtung, Y. and Chiang, C.** (2004). Sonic hedgehog signaling regulates Gli3 processing, mesenchymal proliferation, and differentiation during mouse lung organogenesis. *Dev. Biol.* **270**, 214–231.

**Liu, W., Yan, M., Liu, Y., Wang, R., Li, C., Deng, C., Singh, A., Coleman, W. G. and Rodgers, G. P.** (2010). Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11056–11061.

**Loebel, D. A. F., Studdert, J. B., Power, M., Radziewicz, T., Jones, V., Coultas, L., Jackson, Y., Rao, R. S., Steiner, K., Fossat, N., et al.** (2011). Rho maintains the epithelial architecture and facilitates differentiation of the foregut endoderm. *Development* **138**, 4511–4522.

**Madison, B. B., McKenna, L. B., Dolson, D., Epstein, D. J. and Kaestner, K. H.** (2009). FoxF1 and FoxL1 link Hedgehog signaling and the control of epithelial proliferation in the developing stomach and intestine. *J. Biol. Chem.* **284**, 5936–5944.

**Mao, J., Kim, B.-M., Rajurkar, M., Shivdasani, R. A. and McMahon, A. P.** (2010). Hedgehog signaling controls mesenchymal growth in the developing mammalian digestive tract. *Development* **137**, 1721–9.

**Matsui, T., Kanai-Azuma, M., Hara, K., Matoba, S., Hiramatsu, R., Kawakami, H., Kurohmaru, M., Koopman, P. and Kanai, Y.** (2006). Redundant roles of Sox17



and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J. Cell Sci.* **119**, 3513–3526.

**Medema, J. P. and Vermeulen, L.** (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* **474**, 318–26.

**Mieli-Vergani, G. and Vergani, D.** (2009). Autoimmune hepatitis in children: What is different from adult AIH? *Semin. Liver Dis.* **29**, 297–306.

**Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. and Luo, L.** (2007). ARTICLE A Global Double-Fluorescent Cre Reporter Mouse. **605**, 593–605.

**Nakamura, M., Yasunami, M., Kondo, H., Horie, H., Aiba, Y., Komori, A., Migita, K., Yatsushashi, H., Ito, M., Shimoda, S., et al.** (2010). Analysis of HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with primary biliary cirrhosis (PBC): The HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of antinuclear antibodies for disease progression in PBC. *Hepatol. Res.* **40**, 494–504.

**Nakken, K. E., Nygård, S., Haaland, T., Berge, K. E., Arnkvaern, K., Ødegaard, A., Labori, K. J. and Raeder, M. G.** (2007). Multiple inflammatory-, tissue remodelling- and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4 (-/-) mice harbouring chronic cholangitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **42**, 1245–55.

**Niimi, T., Hayashi, Y., Futaki, S. and Sekiguchi, K.** (2004). SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin  $\alpha 1$  gene. *J. Biol. Chem.* **279**, 38055–38061.

**Omenetti, a, Popov, Y., Jung, Y., Choi, S. S., Witek, R. P., Yang, L., Brown, K. D., Schuppan, D. and Diehl, a M.** (2008). The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut* **57**, 1275–82.

**Oude Elferink, R. P. J. and Paulusma, C. C.** (2007). Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **453**, 601–610.

**Portincasa, P., Moschetta, A., Berardino, M., Di Ciaula, A., Vacca, M., Baldassarre, G., Pietrapertosa, A., Cammarota, R., Tannoia, N. and Palasciano, G.** (2004). Impaired gallbladder motility and delayed orocecal transit contribute to pigment gallstone and biliary sludge formation in  $\beta$ -thalassemia major adults. *World J. Gastroenterol.* **10**, 2383–2390.

**Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D. and Magnuson, M. A.** (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic ?? cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305–315.

**Schaap, F. G., van der Gaag, N. A., Gouma, D. J. and Jansen, P. L. M.** (2009). High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Hepatology* **49**, 1228–1235.

**Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V, Xu, W., Richards, D. R., McDonald-Smith, G. P., Gao, H., Hennessy, L., et al.** (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3507–12.

**Shimoda, M., Kanai-Azuma, M., Hara, K., Miyazaki, S., Kanai, Y., Monden, M. and Miyazaki, J.** (2007). Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J. Cell Sci.* **120**, 3859–3869.

**Shin, D., Weidinger, G., Moon, R. T. and Stainier, D. Y. R.** (2012). Intrinsic and extrinsic modifiers of the regulative capacity of the developing liver. *Mech. Dev.* **128**, 525–535.

**Shiojiri, N. and Katayama, H.** (1987). Secondary joining of the bile ducts during the hepatogenesis of the mouse embryo. *Anat. Embryol. (Berl)*. **177**, 153–163.

**Shirai, T., Miyagi, S., Horiuchi, D., Okuda-Katayanagi, T., Nishimoto, M., Muramatsu, M., Sakamoto, Y., Nagata, M., Hagiwara, K. and Okuda, A.** (2005). Identification of an enhancer that controls up-regulation of fibronectin during differentiation of embryonic stem cells into extraembryonic endoderm. *J. Biol. Chem.* **280**, 7244–7252.

**Spence, J. R., Lange, A. W., Lin, S. J., Kaestner, K. H., Andrew, M., Kim, I., Whitsett, J. A. and Wells, J. M.** (2010). NIH Public Access. **17**, 62–74.

**Squires, J. E., Shivakumar, P., Mourya, R., Bessho, K., Walters, S. and Bezerra, J. A.** (2015). Natural killer cells promote long-term hepatobiliary inflammation in a low-dose rotavirus model of experimental biliary atresia. *PLoS One* **10**,.

**Stainier, D. Y. R.** (2002). A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation. 893–907.

**Sumazaki, R., Shiojiri, N., Isoyama, S., Masu, M., Keino-Masu, K., Osawa, M., Nakauchi, H., Kageyama, R. and Matsui, A.** (2004). Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat. Genet.* **36**, 83–87.

**Takao, K. and Miyakawa, T.** (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1167–72.

- Uemura, M., Hara, K., Shitara, H., Ishii, R., Tsunekawa, N., Miura, Y., Kurohmaru, M., Taya, C., Yonekawa, H., Kanai-Azuma, M., et al.** (2010). Expression and function of mouse Sox17 gene in the specification of gallbladder/bile-duct progenitors during early foregut morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 357–363.
- van den Brink, G. R.** (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol. Rev.* **87**, 1343–75.
- Walther, A., Mohanty, S. K., Donnelly, B., Coots, A., Lages, C. S., Lobeck, I., Dupree, P., Meller, J., McNeal, M., Sestak, K., et al.** (2015). Rhesus rotavirus VP4 sequence-specific activation of mononuclear cells is associated with cholangiopathy in murine biliary atresia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **309**, G466–74.
- Wen, J., Xiao, Y., Wang, J., Pan, W., Zhou, Y., Zhang, X., Guan, W., Chen, Y., Zhou, K., Wang, Y., et al.** (2015). Low doses of CMV induce autoimmune-mediated and inflammatory responses in bile duct epithelia of regulatory T cell-depleted neonatal mice. *Lab Invest* **95**, 180–192.
- Williams, S. S., Cobo-Stark, P., James, L. R., Somlo, S. and Igarashi, P.** (2008). Kidney cysts, pancreatic cysts, and biliary disease in a mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* **23**, 733–741.
- Yamashita, R., Takegawa, Y., Sakumoto, M., Nakahara, M., Kawazu, H., Hoshii, T., Araki, K., Yokouchi, Y. and Yamamura, K. I.** (2009). Defective development of the gall bladder and cystic duct in Lgr4- hypomorphic mice. *Dev. Dyn.* **238**, 993–1000.
- Zaret, K. S.** (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons

for stem-cell differentiation. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 329–340.

**Zong, Y. and Stanger, B. Z.** (2011). The International Journal of Biochemistry  
Molecular mechanisms of bile duct development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 257–264.

**Zorn, A. M. and Mason, J.** (2001). Gene expression in the embryonic *Xenopus* liver.  
*Mech. Dev.* **103**, 153–157.