

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鎌田 麻実

初期の器官形成時期のマウス胚において、心臓に隣接する前腸の腹側後方部の内胚葉は肝臓、腹側膵臓、および胆嚢/胆管、略して肝膵胆管領域を生じる。肝臓や膵臓発生に比較し、胆嚢/胆管領域（肝外胆管、肝内胆管、胆嚢管、および胆嚢＝胆道系）の形成に関しては *Foxf1*, *Hnf6* (*Onecut1*), *Hes1*, *Hhex*, *Lgr4* などの幾つかの因子の関与が報告されているのみで、その特異化に関わる因子や発生メカニズム、さらには先天性の胆嚢/胆管領域の疾患 (i. e., 先天性胆道閉塞症) の病因や発症機序はほとんど分かっていない。

Sry-関連 HMG box 遺伝子-17 (*Sox17*) は多様な脊椎動物種の内胚葉形成因子である。マウスでは、*Sox17* 欠損胚は内胚葉細胞集団の顕著な減少を示し、胎齢 10.5 日までに胎生致死となる。また、*Sox17* 欠損マウス胚では、肝原基は存在するが膵臓原基は消失している事がマーカー発現により示されている。しかし、胆嚢/胆管系の初期の特異化とその後の発生に関わる *Sox17* の潜在的な役割はいまだ不明である。

そこで本研究では、発生初期と発生後期の二つの発生段階において肝膵胆管系領域の中で特に胆嚢/胆管系発生における SOX17 の機能解析を行っている。

第一章は、発生初期の胆嚢/胆管上皮細胞の特異化・分化におけるマウス *Sox17* 遺伝子の発現と機能について報告したものである。まず、申請者は ICR バックグラウンドの野生型胚を用いて DiI による fate mapping、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH)、および免疫組織化学染色 (IHC) により胆嚢/胆管マーカーである *Sox17* が発生初期の前腸内胚葉領域でいつどこでどのように発現するのか解析した。その結果、*Sox17* は初期の肝臓・膵臓マーカーの発現と同時に前腸の頭側側 2 体節目の腹側後方の一対の最外側内胚葉領域で発現し、腸管の管状化により胆嚢へと収束する事が明らかとなった。次に ICR バックグラウンドの *Sox17* 欠損マウス胚を用いて *in vivo* と *in vitro* の胆嚢/胆管形成における *Sox17* 活性の役割を解析した結果、DBA 陽性胆管構造の消失を示した事から、*Sox17* は胆嚢/胆管領域の発生に重要である事を示した。最後に、細胞自律的な *Sox17* の胆嚢/胆管領域への影響をキメラ胚を用いて調べた結果、胆嚢/膵臓領域に近い全ての *Sox17* 欠損前腸細胞は胆嚢/胆管マーカーに対する DBA 陽性、HNF6 陽性染色能の消失を示した。これらの結果から、*Sox17* 活性が発生中の腹側前腸上皮中で胆嚢/胆管系の特異化や分化に細胞自律的に必要である事が明らかとなった。本結果は、今まで未知であった初期器官形成期の胆嚢/胆管前駆細胞の境界の決定メカニズムを明らかにし、さらに *Sox17* が胆嚢/胆管系の特異化・分化に細胞自律的に必須である事を示した、世界的にみても非常にインパクトの大きい成果であるといえるだろう。

第二章では、ハプロ不全を呈する B6 バックグラウンドの *Sox17* ヘテロマウスを用いて発生後期の胆嚢/胆管系の成熟や維持に関わる分子機構および細胞メカニズムについて報告している。肉眼・組織学的な解析とマイクロレイ法により、*Sox17* ^{+/+} B6 肝臓における胆

汁鬱滞の進行に伴う出生時期の肝炎の発症が明らかとなった。また、免疫組織化学法や超微細構造解析により、*Sox17*^{+/-} B6 胚の胆嚢上皮細胞は、野生型に比べ上皮の低形成、基底膜の一部の菲薄化、および増殖マーカー陽性率の有意な低下を示した。さらに、胆道系の連続切片を用いた免疫組織化学法による解析の結果、*Sox17*^{+/-} B6 胚の胆嚢上皮細胞は時折胆嚢壁から剥がれ、さらにそれらの脱落片が胆嚢管や肝外胆管の管腔内へ貯留している像が観察された。また、13.5dpc の胆嚢原基を用いた *in vitro* での培養実験の結果、*Sox17*^{+/-} 胆管上皮の伸長障害と断片化が生じたことから、これらの培養産物は、*in vivo* における *Sox17*^{+/-} B6 胚の胆管上皮の低形成と脱落の表現型模写を示す事が明らかとなった。これらの結果から、*Sox17* は発生後期の胆嚢の成熟や維持にも関与し、*Sox17* がハプロになることで正常な胆嚢/胆管上皮の発生が損なわれ、異所性肝管の形成、胆嚢上皮の剥離により肝外胆管、総胆管の閉塞が誘導され、胆汁鬱滞により新生子肝炎を発症することが明らかとなった。

以上から、未解明の胆嚢/胆管系の分子機序のうち 1) *Sox17* がマウス胎子発生初期の胆嚢/胆管決定因子であり、2) 発生後期の胆嚢上皮の成熟や維持に至るまで胆嚢/胆管形成に関与する事から、*Sox17* はマウス胎子期の胆嚢/胆管発生に重要なマスター因子である事が明らかとなった。本研究は、今後の内胚葉分化に基づく再生医療分野の研究に広く影響をもたらすと考えられる。これらの研究成果は、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。