

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24228005

研究課題名(和文)胆嚢・胆管の形態形成・再生能と先天性疾患の分子機構の解明

研究課題名(英文) Morphogenesis, regeneration and congenital disease in gallbladder and bile duct system in mammals

研究代表者

金井 克晃 (Yoshiakira, Kanai)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：30260326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 157,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、胎生期の胆嚢上皮前駆細胞でのSOX17の発現量の半量低下により、細胞自律的に胆管上皮が管腔内への脱落(上皮破綻)し、妊娠後期で胆道閉鎖症(BA)を引き起こす疾患モデルマウスを世界で初めて開発しました。このSox17ハプロ不全により、胆嚢上皮は、1)肝内胆管に類似したSOX9+/SOX4+細胞へ脱分化し、細胞自律的に上皮細胞の脱落が生じ、胆嚢炎を引き起こすこと、さらに、2)Shhシグナルの発現低下により胆嚢周囲の平滑筋層の形成異常と収縮能の低下を招き、胆汁鬱滞が引き起こされることが判明しました。以上のBA発症の初期動態の解明は、新しい診断技術・予防法・治療法の開発に貢献します。

研究成果の概要(英文)：The gallbladder excretes cytotoxic bile acids to the duodenum through the cystic duct and common bile duct system. In this study, Sox17 haploinsufficiency causes the biliary atresia-like phenotypes and hepatitis in late organogenesis mouse embryos. Transcriptomic analyses revealed the early onset of cholecystitis in the Sox17^{+/-} embryos, together with the appearance of ectopic cystic duct-like epithelia in their gallbladders. The Sox17^{+/-} gallbladder also showed the drastic reduction in Sonic hedgehog expression, leading to aberrant smooth muscle formation and defective contraction of the fetal gallbladder. The defective gallbladder contraction positively correlated with the severity of embryonic hepatitis in Sox17^{+/-} embryos, suggesting the contribution of embryonic cholecystitis and fetal gallbladder contraction in the early pathogenesis of mammalian biliary atresia.

研究分野：獣医学、発生生物学

キーワード：応用動物学 獣医学 疾患モデル 胆道 胆嚢 肝外胆管 胆道閉鎖症 マウス

1. 研究開始当初の背景

SOX17 は、脊椎動物間で保存された内胚葉形成のマスター制御因子である。SOX17 は、初期の内胚葉に一過性に発現後、器官形成後期で腹側前腸内の胆管前駆細胞(胆嚢・胆嚢管の予定領域)で再び発現し、成体まで一部の胆管細胞で維持される。この SOX17 陽性(+)の胆管前駆細胞は、膵島の内分泌細胞や肝細胞への分化能を有し、内胚葉幹細胞様の特性を維持していることも示唆されていた。我々は、SOX17+胆管前駆細胞が、肝外胆管の形態形成、上皮バリアー構造の維持に深く関与し、その SOX17 の発現低下により、ヒト胆道閉鎖症(Biliary Atresia, BA)に類似した胆汁鬱滞が引き起され、新生子の肝障害を誘導する可能性を見出していた。当時、哺乳類の胆嚢を含む肝外胆管の発生の分子メカニズムは、ほとんど手付かずの未解明の領域であり、ヒト BA(1/1000 人の割合で発症、小児生体肝移植の7割以上の原因となる指定難病)の原因、病態も不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスの SOX17+肝外胆管前駆細胞の発生的起源、領域決定から、胆嚢原基の形成、胆嚢-胆嚢管の領域化、構造・機能的な器官の成立までの発生生物学のメカニズムの全貌を明らかにすることを目標とした(図1参照)。さらに、マウス、ラット、ヒトの肝外胆管の構造を比較し、SOX17+胆管前駆細胞の普遍性とラットでの進化的な胆嚢の消失という多様性の基盤を明らかにする。さらに、*Sox17* ハプロ不全マウスが、何時、どのようにして胆管閉塞、肝障害が誘導されるのか、その分子機序を解析し、BA の初期病因・病態の全貌を解明することを最終目標とした。

3. 研究の方法

Sox17 変異系統(C57BL/6 [B6], ICR)、*Sox17-EGFP* ノックイン系統、conditional-ko 系統(*Sox17^{fllox/fllox}*と *Alb-cre*, *Pdx1-cre*, *Shh-cre* との交配)、Shiva 系統(SOX17 HMG box 内の M72R 変異)の全 6 種類の変異マウスと、*Sox17* 下流シグナル因子である *Shh* 変異系統、それらの二重ヘテロ変異マウス系統を用いた(表1)。これらの胆嚢と胆嚢管、肝臓での表現型を以下の4つの異なった視点で解析を行った:①胎子全載培養,器官培養と免疫組織学,RNA 解析に

よりSOX17+胆管前駆細胞による胆管の初期分化から形態形成、機能性胆管に至るまでの発生機序、②器官培養,免疫組織学,RNA 解析,平滑筋機能の解析により *Sox17* (B6)ハプロ不全による胆管前駆細胞の異常と BA の発症機序、③胆管前駆細胞のトランスクリプトーム解析による SOX17 標的遺伝子群の同定、④ラテックス色素注入-CUBIC(透明化)法と胆管マーカーの発現解析により、*Sox17* 変異/野生型マウス、(胆嚢のない)ラットの肝外胆管の構造と、ラット胎子発生における胆嚢消失の機序について解析した。

4. 研究成果

(1)哺乳類の *Sox17*+肝外胆管前駆細胞の動態

①マウスの腹側前腸での胆嚢原基の予定領域の同定: 胎齢 8.5 日(9-11 体節期)のマウス胎子の全胚培養による fate mapping 解析により、胆嚢領域は、前腸の腹側・最外側領域の前方から 1-2 体節 (卵黄嚢静脈が裏打ち) の位置から由来することが判明した。この左右一対の最外側予定領域が、前腸の管状化に伴い中央部で融合し、胆嚢原基の腹側面を形成することも判明した。また、前腸門の中央部において背側壁を形成する胆管前駆細胞を同定し、胆嚢は3箇所の異なった前腸内胚葉領域から由来することが初めて明らかとなった(Uemura et al., J Vet Med Sci 2014)。

② *Sox17^{-/-}* (欠損)胚の胆管前駆細胞の肝・膵芽細胞への脱分化:胎齢 8.5-9.0 日における前腸全載培養法と全胚培養法を用いて、*Sox17-EGFP* ノックイン系統の胆管前駆細胞の動態を解析した。*Sox17-EGFP* ヘテロ胚(胎齢 9.5 日)からの培養では、SOX17+胆管前駆細胞は、*in vivo* の正常な胆嚢原基と同様の盲管構造を形成した。しかし、*Sox17-EGFP* ホモ(*Sox17^{-/-}*)胚からの培養片では、胆嚢原基となる EGFP 陽性の内胚葉細胞は、誘導された肝芽、膵芽領域まで幅広く分布し、同細胞は、肝芽、膵芽マーカーである HNF4 α 、SOX9 陽性を示した。以上の結果から、胆管前駆細胞は、*Sox17* 活性の消失により肝芽様細胞等に脱分化することが示唆された。

③ラット腹側前腸の胆管原基予定領域での SOX17 発現能と胆嚢の進化的な消失:色素注入-CUBIC 法により肝胆道系の構造解析の結果、

表 1. 様々な *Sox17* 変異における胎子胆管, 肝臓の表現型 (本研究課題の成果のみ)

遺伝子型	胆嚢・胆嚢管		胆道閉塞 (脱落細胞)	肝臓		致死性
	上皮	平滑筋層		形態形成	炎症	
Wild type	◎正常	◎正常	◎無	◎正常	◎無	◎発育
<i>Sox17 +/-</i>	△ 薄層化	△断片	△有	○低形成 (B6)	△有	△致死 (B6)
<i>Sox17 +/-; Shh +/-</i>	△薄層化	×断片	×有	○低形成	ND	ND
<i>Shh +/-</i>	◎正常	○低下	◎無	◎正常	◎無	◎発育
<i>Shh -/-</i>	◎正常	×断片	ND	×-△低形成	ND	×致死
<i>Sox17 fl/fl;Pdx1-cre</i>	×-△無-低形成	×断片	×有	◎正常	△有	△致死
<i>Sox17 fl/fl;Alb-cre</i>	◎正常	◎正常	◎無	◎正常	◎無	○発育
<i>Sox17 fl/fl;Shh-cre</i>	× (胆嚢管のみ)	×無	△有	ND	ND	○発育
Shiva +/-	△薄層化	ND	ND	○脂質代謝	ND	○発育

マウスの肝胆道系の胆道とそれに伴う血管・神経・平滑筋の立体構造は、3点のマイナーな構造変化(肝膵管括約筋の有無、膵管の分岐点、一部の動脈の走行パターン)の差を除けば、ヒトの肝胆道系と全く同じ解剖学的構造を示すことが判明した(ヒト肝胆道系の疾患モデルとしてのマウスの有用性の裏付け)。ラットの胆道系とマウスとの形態的な差異は、胆嚢-胆嚢管の欠失にのみ限局し、それ以外の構造は全く同じパターンであることも確認できた。発生過程の免疫組織学的解析により、ラット胎子では胆嚢予定領域内にSOX17陽性の肝外胆管前駆細胞を完全に欠き、ラットでの胆嚢の進化的な消失は腹側前腸での *Sox17* 発現能の消失に起因することが示唆された。また、*Sox17* ゲノムの 5' 側の 上流領域において、胆嚢の存在するマウス、ヒトで保存され、胆嚢を持たないラットで欠いた候補制御領域を同定した(Higashiyama et al., *Anat Rec*, 2016; *J Anat*, 2018)。

(2) *Sox17*^{+/-}胎子の胆嚢、胆嚢管の病態解明

①マウス系統差による胎子肝炎の発症と胆汁形成、ヒト症例との関連性:胎生期の肝炎マーカーの発現上昇のタイミングを解析した結果、胆汁の十二指腸への分泌開始後すぐに、肝炎が発症することが判明した。マウス系統差を解析した結果、肝炎を発症するB6系統で、肝炎を発症しない系統(ICR, 129)と比べ、胆嚢上皮でのSOX17の発現レベルが顕著に低下していること、異所性の肝管の形成率が有意に高いことが判明し、肝炎の発症と異所性肝管の有無は、*Sox17*^{+/-}胆嚢原基での *Sox17* 発現量に依存していることが明らかとなった。しかし、一部のヒトの先天性胆管閉鎖に認められる左右軸の側性には異常が無く、*Sox17*^{+/-}胆管上皮の線毛数に、有意な変化は認められなかった。また、従来から提唱されていた胆管形成に関わる Notch, Nodal シグナル関連遺伝子の発現レベルに関しても、*Sox17*^{+/-}マウスにおいて有意な発現低下は認められなかった。内胚葉形成での *Sox17* 上流因子であり、胆嚢形成に関与すると考えられていた WNT シグナルについても、*Wnt4*^{-/-}胎子(*Wnt4*^{-/-};*Sox17*^{+/-}胎子)、WT1-cre;*Wls*^{flox/flox}胎子(胆嚢原基周囲のWT1+の間質領域での *Wntless* 遺伝子の欠損胚で、胆嚢原基特異的に Wnt 分泌を抑制した胚)を作出・解析した結果、残念ながらこれらの胎子の胆嚢を含む胆道系の発生異常は認められなかった。以上の結果から、*Sox17*^{+/-}マウス(B6)は、既存の想定されているシグナル経路とは異なる、新しい胆嚢・胆管上皮破綻による BA の病態モデルであることが判明した(Uemura et al., *Development*, 2013)。

②*Sox17*^{+/-}胎子の「胆嚢の胆嚢管化」と胆嚢炎の発症: *Sox17*^{+/-}マウス(B6, ICR 系統)における器官形成期の SOX17+胆管前駆細胞のトランスクリプトーム解析の結果、*Sox17*^{+/-}胆嚢では、胆嚢特異的な遺伝子の 74.4%が低下し、対して胆嚢管に特異的な遺伝子(*Sox9*, *Sox4*, etc を含む)の 44.1%が上昇していたことから、*Sox17*^{+/-}胆嚢が、「胆嚢管化」していることが判明した。

また *Sox17*^{+/-}胆嚢では、肝炎の発症前の胎齢 15 日までに初期炎症マーカーが上昇し、胆嚢炎が発症することが判明した。胎子の胆嚢領域に Gr1+骨髄球が浸潤していることを免疫組織化学、Tal1, Klf1 etc の qPCR により確認した。炎症マーカーの qPCR により、胆嚢炎の重篤な個体ほど肝炎を発症するという正の相関も確認された。また、培養下の *Sox17*^{+/-}胆嚢原基でも、組織自律的に上皮の脱落、初期炎症マーカーの発現が上昇したことから、胆汁形成とは無関係に細胞自律的に上皮バリアーの破綻が起こることが判明した。

③Shh-cre;*Sox17*^{flox/flox}, Pdx1-cre;*Sox17*^{flox/flox}の胆嚢原基(胆嚢上皮の一部の細胞で *flox* が抜ける2種類の変異胚)での *Cxcl10* などの炎症マーカーの発現が上昇し、Alb-cre;*Sox17*^{flox/flox}(肝細胞、肝内胆管で *flox* が抜ける変異胚)で正常であったことから、胆嚢炎の発症は、胆嚢上皮での SOX17 活性の低下が原因であることが遺伝学的に証明できた。Shh-cre;*Sox17*^{flox/flox} の表現型解析では、胆嚢領域は完全に消失し、胆嚢管のみで構成された肝外胆管を形成することが新たに判明した。

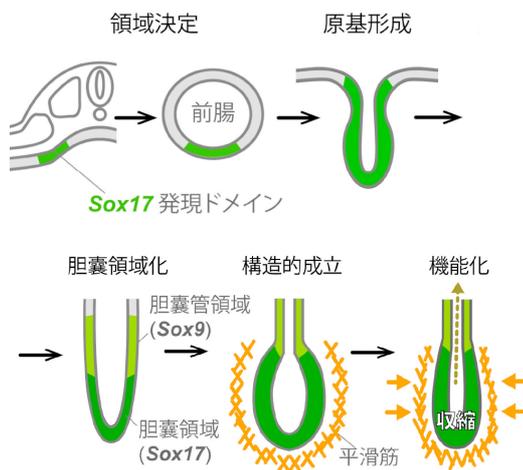


図1. 胆嚢・胆嚢管の発生

(3) *Sox17*^{+/-}胆嚢での下流シグナル因子 SHH (Sonic hedgehog) の同定と平滑筋形成不全による胆嚢収縮不全

①胆嚢、胆嚢管原基のトランスクリプトーム、qPCR 解析により、*Sox17*^{+/-}胆嚢においてヘッジホッグシグナル関連遺伝子 *Shh*, *Hhip* の顕著な発現低下が明らかになった。正常な胆嚢形成過程において、*Shh* は、胆嚢-胆嚢管原基内の SOX17+胆管前駆細胞で強く発現し、その受容体である *Gli2*, *Hhip* 遺伝子は、胆嚢-胆嚢管周囲の間質領域に発現していることが判明した。その後、胎子胆嚢は、その間質周囲に平滑筋層を形成し、出生前に自律的な収縮を開始することも判明した(図1下)。Shh 欠損胎子での胆嚢の表現型解析の結果、SOX17+胆嚢上皮細胞は正常に形成されるが、その周囲の平滑筋層の形成不全が生じることが判明した。*Sox17*^{+/-}と *Shh* の二重変異マウスでの胆嚢平滑筋の形成について、*Sox17*^{+/-};*Shh*^{+/-}胎子では、単独の *Sox17*^{+/-}胎子と比べ、平滑筋形成不全、胆管上

皮の脱落、胆道閉鎖が重篤化することも判明した。器官培養系でも *Sox17*^{+/-}胆嚢の平滑筋の形成不全が誘導され、培養下での *Shh* の添加により平滑筋層、上皮肥厚などの一部の表現型が正常に回復することが判明した。以上の結果、胎子胆嚢上皮細胞で、*Sox17* の下流で *Shh* 発現が誘導され、胆嚢特異的に平滑筋形成を誘導していること、*Sox17*^{+/-}胎子の BA 発症に *Shh* の低下が関与していることが遺伝学的に証明された (Higashiyama et al., *Development*, 2017)。 *Shh* 遺伝子の上流領域において、既に内胚葉特異的な MACS エンハンサーが同定されている (Sagai et al., *Development*, 2009)。胎子胆嚢の既知の *Shh* エンハンサー、プロモーター領域の Chip 解析、ヒト胆管細胞株を用いたレポーター解析の結果、SOX17 は、直接 MACS1 等の既知のエンハンサー、プロモーターには結合しておらず、MACS1 等を介した転写活性化にも影響しないことが判明し、新しい別の経路での *Shh* の発現制御の可能性が示唆された (未発表)。

② *Sox17*^{+/-}胎子胆嚢の収縮能の異常と BA 発症の正の相関: *Sox17*^{+/-}胎子の胆嚢の収縮能を解析した結果、野生型と比べ *Sox17*^{+/-}において自律的な収縮運動は顕著に抑制されていることが判明した。さらに、培養下での KCl による収縮率を比較した結果、*Sox17*^{+/-}において肝障害を呈する個体ほど、有意に胆嚢の収縮率が低下していることが判明した。以上の結果により、SOX17 下流の *Shh* シグナルが正常な胆嚢平滑筋層の形成に必須であり、かつ胎子期の自律的な胆嚢収縮能の低下が胆汁うっ滞、その後の BA 発症に深く関与することを示唆している (図2)。

(4) BA 発症を逃れた *Sox17*^{+/-}マウス (生後1週

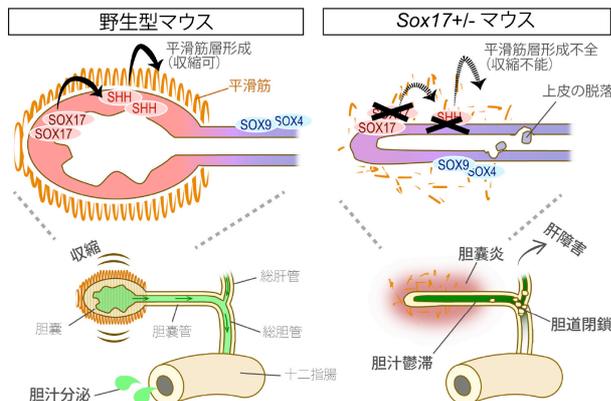


図2. *Sox17*ハプロ不全によるBAの発生機序

齢～成体)の胆嚢・胆嚢管の病態解明
生後1週齢以降、生存した *Sox17*^{+/-}マウスは、成体まで成長し、BA 発症を免れることになる (現在、3割程度が免れ、1年以上の生存)。BA を免れた *Sox17*^{+/-}個体においても、生後1週齢までは胆嚢、胆嚢管内に死細胞、粘液様物質が蓄積し、*Cxcl10*などの炎症マーカーの発現が上昇していることから、生存する個体も、胎子期に胆嚢炎を発症していることが示唆された。成体 *Sox17*^{+/-}マウス (生存個体)での肝胆道系の色素注入-CUBIC 法による解析の結果、マウスの肝胆道

系の胆道の分岐パターンの立体構造は、野生型と全く同じ解剖学的構造を示したが、異所的な肝管の形成が有意に増加していることが判明した。さらに、成体でも、*Sox17*^{+/-}マウスは、肝臓重量、胆嚢のサイズが有意に低下し、一方、脾臓重量は増加する傾向が認められた (自己免疫疾患の可能性)。以上の結果は、BA を免れた生存個体においても胆嚢炎は生じていたが、異所的な肝管の形成等により胆道閉鎖の重篤化を回避し、生存に繋がったものと想定された (Pattarapanawan et al., 投稿準備中)。

本研究課題により、SOX17 は、胆嚢・胆嚢管のマスター制御因子であることを証明することができた。*Sox17*^{+/-}胆嚢・胆嚢管でのトランスクリプトーム解析により、肝外胆管系の発生過程の分子基盤の大まかな全貌を明確化することができた。*Sox17* ハプロ不全により、胎子胆嚢内での「胆嚢管様上皮への脱分化、脱落による上皮バリアー能の低下、胆嚢炎と *Shh* シグナルの減少による自律収縮不全と胆汁鬱滞」という BA 発症の初期病態が初めて明らかとなった。この胎子期の胆嚢炎と胆嚢平滑筋の収縮能の異常 etc の知見から、今後のヒト BA の診断技術、予防法、治療法の新しい開発に繋がるものと信じている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件) (全て査読あり)

- ① *Higashiyama H, Uemura M, Igarashi H, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, *Kanai Y. (2018) Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *J Anat* 232:134-45. doi: 10.1111/joa.12707.
- ② Igarashi H, Uemura M, Hiramatsu R, Hiramatsu R, Segami S, Pattarapanawan M, Hirate Y, Yoshimura Y, Hashimoto H, Higashiyama H, Sumitomo H, Kurohmaru M, Saijoh Y, Suemizu H, Kanai-Azuma M, *Kanai Y. (2018) *Sox17* is essential for proper formation of the marginal zone of extraembryonic endoderm adjacent to a developing mouse placental disk. *Biol Reprod* (in press). doi: 10.1093/biolre/iy079.
- ③ Saito K, *Nobuhisa I, Harada K, Takahashi S, Anani M, Lickert H, Kanai-Azuma M, Kanai Y, *Taga T. (2018) Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortic hematopoietic clusters by the *Sox17*-Notch1-Hes1 axis. *Exp Cell Res* 365: 145-55. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.014.
- ④ Higashiyama H, Ozawa A, Sumitomo H, Uemura M, Fujino K, Igarashi H, Imaimatsu K, Tsunekawa N, Hirate Y, Kurohmaru M, Saijoh Y, Kanai-Azuma M, *Kanai Y. (2017) Embryonic cholecystitis and defective gallbladder contraction in the *Sox17*-haploinsufficient mouse model of biliary atresia. *Development* 2017 144: 1906-17. doi: 10.1242/dev.147512.

- ⑤*Shitara H, Cao L, Yamaguchi M, Yonekawa H, Taya C. (2017) Establishment of a heteroplasmic mouse strain with interspecific mitochondrial DNA haplotypes and improvement of a PCR-RFLP-based measurement system for estimation of mitochondrial DNA heteroplasmy. **Transgenic Res** 26:559-65. doi: 10.1007/s11248-017-0009-2.
- ⑥ Hirate Y, Suzuki H, Kawasumi M, Takase HM, Igarashi H, Naquet P, Kanai Y, *Kanai-Azuma M. (2016) Mouse *Sox17* haploinsufficiency leads to female subfertility due to impaired implantation. **Sci Rep** 6:24171. doi: 10.1038/srep24171.
- ⑦○Higashiyama H, Sumitomo H, Ozawa A, Igarashi H, Tsunekawa N, Kurohmaru M, *Kanai Y. (2016) Anatomy of the murine Hepatobiliary System: A whole-organ-level analysis using a transparency method. **Anat Rec** 299:161-72. doi: 10.1002/ar.23287.
- ⑧ Aiyama Y, Tsunekawa N, Kishi K, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, *Kanai Y. (2015) A niche for GFR α 1-positive spermatogonia in the terminal segments of the seminiferous tubules in hamster testes. **Stem Cells** 33:2811-24. doi: 10.1002/stem.2065.
- ⑨ ○Uemura M, Igarashi H, Ozawa A, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, *Kanai Y. (2015) Fate mapping of gallbladder progenitors in posteroventral foregut endoderm of mouse early somite-stage embryos. **J Vet Med Sci** 77:587-91. doi: 10.1292/jvms.14-0635.
- ⑩ Shinomura M, Kishi K, Tomita A, Kawasumi M, Kanezashi H, Kuroda Y, Tsunekawa N, Ozawa A, Aiyama Y, Yoneda A, Suzuki H, Saito M, Picard JY, Kohno K, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, *Kanai Y. (2014) A novel AMH-Treck transgenic mouse line allows toxin-dependent loss of supporting cells in gonads. **Reproduction** 148: H1-9. doi: 10.1530/REP-14-0171.
- ⑪○Rommelaeere S, Millet V, Vu Manh TP, Gensollen T, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M, Bourges C, Escalière B, Du X, Xia Y, Imbert J, Beutler B, Kanai Y, Malissen B, Malissen M, Tailleux A, Staels B, Galland F, *Naquet P. (2014) *Sox17* regulates liver lipid metabolism and adaptation to fasting. **PLoS One** 9:e104925. doi: 10.1371/journal.pone.0104925.
- ⑫ ○Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, *Taga T. (2014) *Sox17*-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. **Mol Cell Biol** 34:1976-90. doi: 10.1128/MCB.01485-13.
- ⑬○*Matsuoka K, Saito M, Shibata K, Sekine M, Shitara H, Taya C, Zhang X, Takahashi TA, Kohno K, Kikkawa Y, Yonekawa H. (2013) Generation of mouse models for type 1 diabetes by selective depletion of pancreatic beta cells using toxin receptor-mediated cell knockout. **Biochem Biophys Res Commun** 436:400-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.114.
- ⑭ Harikae K, Miura K, Shinomura M, Matoba S, Hiramatsu R, Tsunekawa N, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Morohashi K, *Kanai Y. (2013) Heterogeneity in sexual bipotentiality and plasticity of granulosa cells in developing mouse ovaries. **J Cell Sci**. 126:2834-44. doi: 10.1242/jcs.122663.
- ⑮○Uemura M, Ozawa A, Nagata T, Kurasawa K, Tsunekawa N, Nobuhisa I, Taga T, Hara K, Kudo A, Kawakami H, Saijoh Y, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, *Kanai Y. (2013) *Sox17* haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. **Development** 140:639-48. doi: 10.1242/dev.086702.
- ⑯*Matsuoka K, Shitara H, Taya C, Kohno K, Kikkawa Y, Yonekawa H. (2013) Novel basophil- or eosinophil- depleted mouse models for functional analyses of allergic inflammation. **PLoS One** 8:e60958. doi: 10.1371/journal.pone.0060958.
- ⑰○Saund RS, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Kim I, Lucero MT, *Saijoh Y. (2012) Gut endoderm is involved in the transfer of left-right asymmetry from the node to the lateral plate mesoderm in the mouse embryo. **Development** 139:2426-35. doi: 10.1242/dev.079921.

[学会発表] (計 61 件)

国際学会 (10 件) :

- ①Pattarapanawan M, Uemura M, Higashiyama H, Hiramatsu R, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Kanai Y: Morphological change in hepatobiliary and related structures in postnatal and adult *Sox17*^{+/−} mice, [6th Congress of Asian Veterinary Anatomists], 2017, Malaysia.
- ②Higashiyama H, Kanai Y: On the whole-anatomy of the hepatobiliary system by using the transparency method. [11th International Congress of Vertebrate Morphology], 2016, Washington DC.
- ③ Kanai-Azuma M, Hirate Y, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai Y: A possible involvement of a dose-dependent *Sox17* activity of uterine epithelia in mouse implantation processes, [7th International Symposium Biology of Vertebrate Sex Determination], 2015, Kona, Hawaii.
- ④Miura K, Kanai-Azuma M, Kanai Y: Common molecular pathways between SRY-dependent and -independent testiculogenesis in mouse fetal gonads, [4th International SOX Research Conference], 2014, Ohio.
- ⑤Tsunekawa N, Nagai R, Shinomura M, Kishi K, Aiyama Y, Harikae K, Sato T, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Kurohmaru M: Visualization of spermatogonial stem cells during early

colonization in the recipient testes, [4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists], 2012, Thailand.

- ⑥ Kanai-Azuma M, Kanai Y: Haploinsufficiency of Sox17 causes biliary atresia and perinatal hepatitis in C57BL/6 mice, [Hong Kong Society for Development Biology Symposium], 2012, Hong Kong (他4件)

国内学会(46件):

- ① 東山大毅、上村麻実、五十嵐瞳、九郎丸正道、金井正美、金井克晃: 「失う」という進化: 胆嚢のあるマウス、胆嚢のないラット, 第17回東京大学生命科学シンポジウム, 2017.
- ② 五十嵐瞳、平松龍人、上村麻実、平手良和、九郎丸正道、橋本晴夫、末水洋志、金井正美、金井克晃: マウス壁側内胚葉細胞の維持とSOX17、SOX7の相補的機能、「第40回日本分子生物学会」、2017.
- ③ 上村-鎌田 麻実、Pattarapanawan Montri、金井克晃、金井正美: Sox17 ハプロ不全マウスモデルでの胆道閉鎖症の病態解析, 第44回日本胆道閉鎖症研究会, 2017.
- ④ 東山大毅、上村麻実、五十嵐瞳、パタラパナワン モントリー、藤野滉、平手良和、金井正美、九郎丸正道、金井克晃: マウス胆嚢、胆嚢はどこへ消えた? ~マウス-ラットの比較発生学より~, 第39回日本分子生物学会, 2016.
- ⑤ 藤野滉、東山大毅、Pattarapanawan Montri、上村麻実、小澤秋沙、平手良和、九郎丸正道、金井正美、金井克晃: マウス Sox17 ハプロ不全による新生子肝炎の原因細胞の特定とその病因解明, 第159回日本獣医学会, 2016.
- ⑥ 東山大毅、市川直樹、住友宏之、小澤秋沙、上村麻実、金井正美、九郎丸正道、金井克晃: Sox17 変異マウス胆嚢における傍胆管腺(PBG)の異常形成, 第159回日本獣医学会, 2016.
- ⑦ 金井正美、金井克晃: Sox17 ハプロ不全での胆嚢形成異常の分子基盤, 第29回モロシヌス研究会, 2015年.
- ⑧ 上村麻実、東山大毅、五十嵐瞳、小澤秋沙、高瀬比菜子、住友宏幸、三浦健人、九郎丸正道、金井正美、金井克晃: マウス胆嚢/胆管系発生におけるSOX17とWNTシグナル経路の役割, 第159回日本獣医学会, 2016.
- ⑨ 小澤秋沙、東山大毅、住友宏幸、内山悠紀、五十嵐瞳、上村麻実、恒川直樹、平手良和、九郎丸正道、西條幸男、金井正美、金井克晃: 機能的な胆嚢形成に対する Sox17 の恒常的発現の意義, 第38回日本分子生物学会, 2015.
- ⑩ 五十嵐瞳、瀬上紗貴、小澤秋沙、東山大毅、住友宏幸、平松龍人、上村麻実、平手良和、恒川直樹、九郎丸正道、金井正美、金井克晃: マウス壁側内胚葉細胞の運動性と Sox17 の機能, 第38回日本分子生物学会, 2015.
- ⑪ 五十嵐瞳、瀬上紗貴、小澤秋沙、東山大毅、住友宏幸、平松龍人、上村麻実、平手良和、恒川直樹、九郎丸正道、金井正美、金井克晃: 着床後の胚体外内胚葉における Sox17 の機能解析, 第29回モロシヌス研究会, 2015.
- ⑫ 五十嵐瞳、瀬上紗貴、小澤秋沙、東山大毅、住友宏幸、平松龍人、上村麻実、平手良和、恒川直樹、九郎丸正道、金井正美、金井克晃: 胎盤形成前の胚体外内胚葉における Sox17 の機能解析, 第37回日本分子生物学会, 2014.
- ⑬ 小澤秋沙、東山大毅、住友宏幸、上村麻実、

内山悠紀、五十嵐瞳、黒田淑子、恒川直樹、平手良和、川澄みゆり、九郎丸正道、西條幸男、金井正美、金井克晃: Sox17 ヘテロ変異の胆嚢形成における胆嚢管様の変化と胆嚢炎, 第37回日本分子生物学会, 2014.

- ⑭ 三浦健人、張替香生子、中口真有、富田絢子、恒川直樹、金井正美、九郎丸正道、金井克晃: HSP-SRY Tg マウスを用いた SRY 標的遺伝子の探索, 第28回モロシヌス研究会, 2014.
- ⑮ 川澄みゆり、平松龍人、鈴木仁美、金井克晃、金井正美: Sox17-GFPトランスジェニックマウスを用いた着床メカニズムの解析, 第60回日本実験動物学会総会, 2013.
- ⑯ 小澤秋沙、上村麻実、平松龍人、川澄みゆり、恒川直樹、金井正美、金井克晃、九郎丸正道: 器官培養法を用いた胆嚢形成機序の解明, 第154回日本獣医学会, 2012.(他30件)

招待講演(5件):

- ① 金井克晃: SOX17 ハプロ不全マウスでの胆道閉鎖症の発症メカニズム. 胆道閉鎖症ブレインストーミングの会 -胆道閉鎖症の病態を探るミニシンポジウム-, 2017.
- ② 金井克晃: Sox17 の胆嚢形成と胆道閉鎖症第39回日本分子生物学会シンポジウム, 2016.
- ③ 金井正美、金井克晃: Sox17 ヘテロ変異の疾患モデルへの応用, 第53回北陸実験動物研究会 2016年.
- ④ 金井克晃: ヤンソン賞受賞講演 SRY,SOX(SRY型HMG box)遺伝子と細胞運命決定, 東京大学優駿会, 2013. (他1件)

[図書](計1件)

○ Higashiyama H, Kanai Y. Biliary system; anatomy and development in “Encyclopedia of Gastroenterology 2nd Edition. eds, Bruno M, Chan F, Dube C, et al.” (in press).

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○ 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/kaibo/Sox17.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 克晃 (KANAI, Yoshiakira)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号:30260326

(2) 研究分担者

九郎丸 正道 (KUROUMARU Masamichi)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号:00148636

恒川 直樹 (TSUNEKAWA Naoki)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号:00148636

多屋 長治 (TAYA Chouji)
(財) 東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・室長
研究者番号:90175456