

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14583

研究課題名(和文) マウスとラット肝外胆管発生におけるシグナル経路の異種間比較解析

研究課題名(英文) Heterogeneous comparative analysis of signal pathways in extrahepatic bile duct development in mice and rats

研究代表者

鎌田 麻実(上村麻実)(Mami, UEMURA)

東京医科歯科大学・統合研究機構・非常勤講師

研究者番号：20596001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：in silicoによる比較ゲノム解析結果より、げっ歯類で保存されたSOX17プロモーター領域のCrisper/Cas9欠損マウスの作成に成功し、胆嚢発生における細胞自律的な影響を解析することが可能となった。現時点では胆嚢特異的なSOX17上流領域は見つかっておらず、周囲の環境(間充織)における胆嚢上皮への影響も課題として残されている。さらに、本研究ではヒト胆道閉鎖症(BA)患者での胆嚢を含む肝外胆管の病態について、疾患モデルマウスと比較した結果、胆嚢上皮におけるSOX17の発現低下や傍胆管腺の増加、胆嚢のサイズと肝臓障害の相関などSOX17関連BA特有の病態を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの胆道閉鎖症(BA)は、小児生体肝移植の70%を占める指定難病であるが、その病因や発症機序は未だ分かっていない。本研究では、ヒト患者においてSOX17が関連するBAの病態を明らかにしただけでなく、胆嚢の形態形成がどのようにBA発症に影響を与えるかを調査した初めての研究である。また、胆嚢を持たないラットと胆嚢を持つマウスの比較ゲノム解析を活用し、それらの進化的な意義を考察することで、学術的にも興味深い知見が得られた。今後、胆嚢上皮におけるSox17上流領域やその発現維持機構が解明されれば、ヒトや家畜のBAの治療や予防法の確立に繋がるだけでなく、動物種ごとの進化的な胆嚢の違いに迫れると考える。

研究成果の概要(英文)：From the results of comparative genome analysis by in silico, we succeeded in creating Crisper/Cas9-deficient mice in the SOX17 promoter region conserved in rodents, and it became possible to analyze the cell-autonomous effect on gallbladder development. At present, gallbladder-specific upstream of SOX17 region has not been found, and the effect on the gallbladder epithelium in the surrounding environment (Mesenchymal system) remains an issue. Furthermore, in this study, as a result of comparing the pathology of the extrahepatic bile duct including the gallbladder in human Biliary atresia (BA) patients with the disease model mice, we found pathologies specific to SOX17-related BA, such as decreased expression of SOX17 in the gallbladder epithelium, increase in the peribiliary gland, and correlation between gallbladder shape and liver damage.

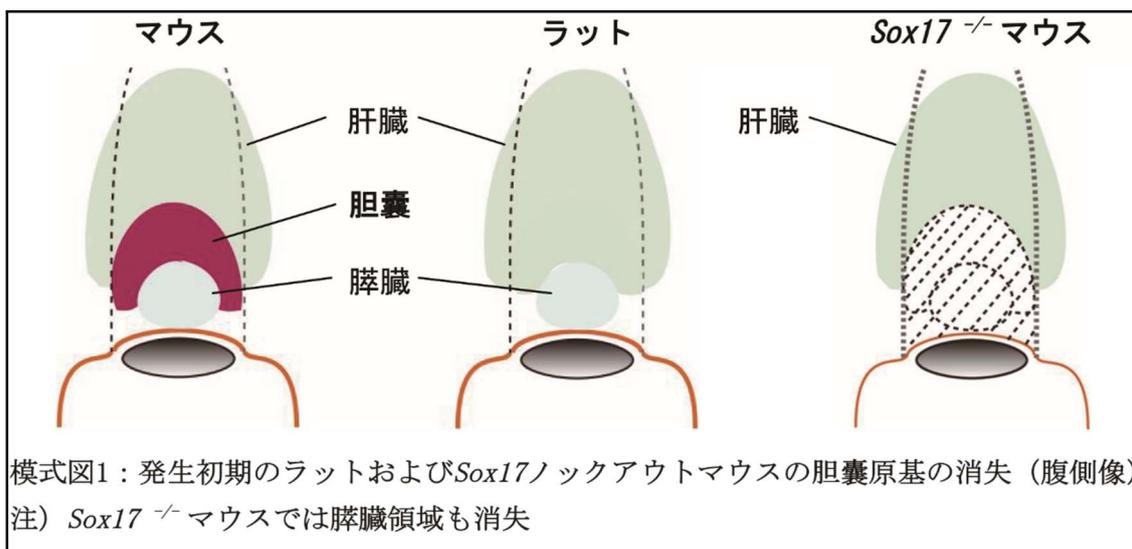
研究分野：発生生物学

キーワード：比較ゲノム解析 ヒト胆道閉鎖症 げっ歯類 疾患モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスの胆道系は、肝臓から十二指腸へと胆汁を運ぶ管で、胆嚢、胆嚢管、肝管、および総胆管からなる肝外胆管と肝臓内にある肝内胆管から構成される。ヒトでは、胆汁の鬱滞が原因で起こる胆管炎や肝障害が特徴である胆道閉塞症が報告されており (Kohsaka et al., 2002; Mieli-Vergani and Vergani, 2009)、特に胎児期に発症する胆道閉塞症に関しては、その病因や発症機序はほとんど分かっていない。今までの研究で我々は、Sox17 がマウス胚において初期の胆嚢を含む肝外胆管決定因子であることを発見した (Uemura M et al., 2010)。また、Sox17 は発生後期の肝外胆管の成熟や維持にも関与し、Sox17 のハプロ不全により、胆管上皮が破綻し、胆汁鬱滞により 70% の個体が胆道閉鎖症を発症することを見出した (Uemura M et al., 2013)。一方、マウスと進化的に近縁であるラットにおいては、解剖学的に胆嚢/胆嚢管を欠く事が報告されている。そこで我々は、Sox17 の発現パターンを初期のマウス胚とラット胚で比較した結果、ラットでは肝芽、膵芽は正常に発生する一方、Sox17 陽性の胆嚢原基が消失していることが判明した (Higashiyama H et al., 2017)。この事は、我々が以前解析した Sox17 ノックアウトマウス (Uemura M et al., 2010) の表現型と一部類似しており (模式図 1)、ラットにおける Sox17 消失の原因を調べる事で、肝外胆管における Sox17 の発現維持機構の解明、さらにその形成に関わる Sox17 上流のシグナル因子の同定に繋がると考えた。



模式図1：発生初期のラットおよびSox17ノックアウトマウスの胆嚢原基の消失 (腹側像)
注) Sox17^{-/-}マウスでは膵臓領域も消失

2. 研究の目的

Sox17 は、胆嚢を含む肝外胆管の形態形成のマスター制御因子であり、Sox17 ヘテロマウス胎仔では、その発現量の半量低下により、妊娠後期に胆管上皮細胞の脱落と肝外胆管での炎症により胆管閉塞を誘発し、胆道閉鎖症を発症する。また、獣医学領域においても胆道閉鎖症は牛、豚、羊、犬など様々な動物で報告されており、人畜共通の病態として胎仔の肝外胆管での Sox17 の発現量の低下とそれに伴う胆管上皮のバリア機能の低下が認められる。一方、ヒト胆道閉鎖症は、小児生体肝移植の 70% を占める重篤疾患であるが、その病因や発症機序は未だ分かっておらず、その解明が急がれている。特に、ヒト胆道閉鎖症における肝外胆管での SOX17 の関与ははまだ不明である。本研究はヒト疾患モデルとして有用なマウスと胆嚢/胆嚢管を欠くラットの分子メカニズムの比較解析を用いて、肝外胆管における Sox17 の発現維持機構の解明とその形成に関わる Sox17 上流のシグナル因子の同定を目的とする。さらに、これらの研究成果を基に、ヒトや家畜の先天性胆道閉塞症および胆管系疾患の治療や予防法の確立を最終目標とする。

3. 研究の方法

ラットとマウスの胚盤胞置換法による先行研究 (Kobayashi T et al., 2010) において、胆嚢の無いラット型になるための条件は、周囲の環境である事が報告されている。また、ラットとマウスの肝管の分岐パターンや血管の走行などの差異は認められないが、胆嚢予定領域の周囲を囲む間葉系組織の分布に違いがある事が分かっている (Higashiyama H et al., 2017)。本研究では、ラットにおける胆嚢原基の消失の原因を、周囲の環境と細胞自律的な要因の 2 つの方向から探索した (模式図 2)

(1) マウスとラットの胆嚢上皮周囲の間葉系組織の組織学的な比較解析

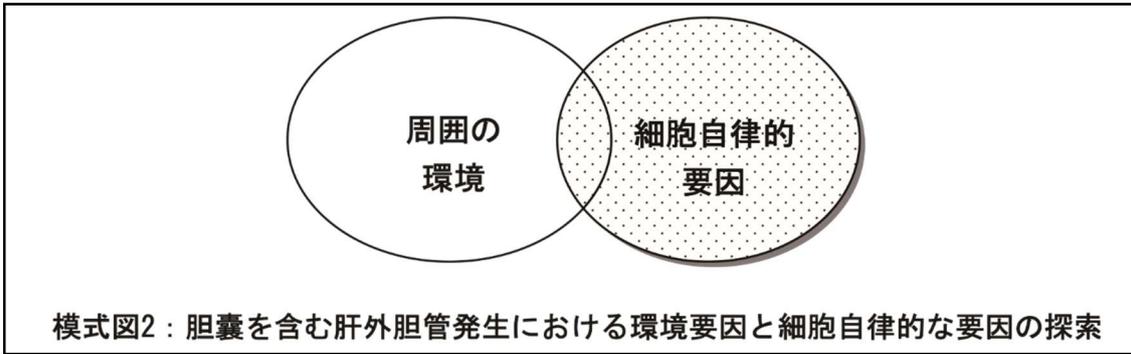
※胆嚢上皮マーカー Sox17 と間葉系マーカー α -SMA1 を用いた形態学的解析

(2) マウスとラットのゲノム配列の比較

※げっ歯類は *Mus musculus* に進化的近縁な *Apodemus Speciosus* (胆嚢消失) も加え、各動物種でマルチプルアライメントによる配列比較を実施し保存領域を決定

(3) 胆嚢上皮の Single cell RNA Sequence などの public database の活用

(4) 細胞自律的な要因の探索：(2)、(3) で特定した候補領域の Crisper/Cas9 欠失変異体を作成し、表現型解析



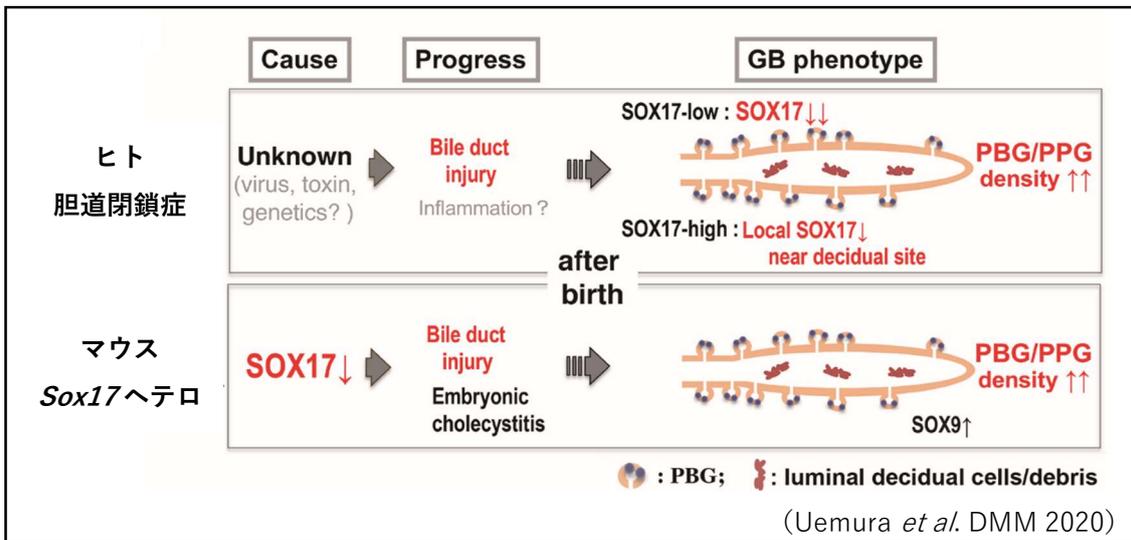
4. 研究成果

(1) *in silico* による比較ゲノム解析結果および胆嚢上皮の Single cell RNA Sequence の database の情報により、げっ歯類で保存された Sox17 プロモーター領域の Crisper/Cas9 欠損マウスの作成に成功し、胆嚢発生における細胞自律的な影響を解析することが可能となった。表現型解析を実施した結果、胆嚢特異的な Sox17 上流領域は見いだせず、さらなる解析が必要である。また周囲の環境（間充織）における胆嚢上皮への影響も課題として残されている。

(2) 今までに我々は、Sox17 ヘテロモデルマウスと同様に、一部のヒト胆道閉鎖症患者において胆嚢上皮における SOX17 の発現低下や傍胆管腺 (SOX17/SOX9 陽性) の増加 (Uemura et al. DMM 2020)、胆嚢のサイズと肝臓障害の相関 (Takami et al. unpublished data) など SOX17 が関連する胆道閉鎖症の病態を発見したが、ヒト胆道閉鎖症発症メカニズムにおける上皮破綻の原因や再生過程の傍胆管腺細胞の動態については不明のままである。

さらに近年、ヒト胆道閉鎖症の全ゲノムデータが解明されたが、ヒト胆道閉鎖症患者の SOX17 の変異は見つかっておらず、本疾患は複数の遺伝子と環境要因が複合的に関与することが示唆される。

以上から我々の研究成果は、一部のヒト胆道閉鎖症患者における SOX17 発現維持の重要性を裏付けるとともに、胆嚢の上皮破綻における再生過程での SOX17 の重要性を示唆している。



<引用文献>

- ① Kohsaka, T., Yuan, Z. R., Guo, S. X., Tagawa, M., Nakamura, A., Nakano, M.,Kawasasaki, H., Inomata, Y., Tanaka, K. and Miyauchi, J. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 36(4 Pt1): 904-912. 2002.
- ② Mieli-Vergani, G. and Vergani, D. Biliary atresia. *Semin. Immunopathol.* 31(3):371-381 . 2009
- ③ Uemura, M., Hara, K., Shitara, H., Ishii, R., Tsunekawa, N., Miura, Y., Kurohmaru, M., Taya, C., Yonekawa, H., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y. Expression and function of mouse Sox17 gene in the specification of gallbladder/bile-duct progenitors during early foregut

morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1): 357-363. 2010.

- ④ 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. Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. *Development.* 140(3): 639-648. 2013.
- ⑤ Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Ito M, Yamazaki Y, Iyata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell.* 142(5):787-99. 2010
- ⑥ 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. Embryonic cholecystitis and defective gallbladder contraction in the Sox17-haploinsufficient mouse model of biliary atresia. *Development.* 144(10): 1906-1917. 2017.
*共同第一著者
- ⑦ Uemura, M., Higashi, M., Pattarapanawan, M., Takami, S., Ichikawa, N., Higashiyama, H., Furukawa, T., Fujishiro, J., Fukumura, Y., Yao, T., Tajiri, T., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y. Gallbladder wall abnormality in biliary atresia of mouse Sox17^{+/-} neonates and human infants. *Dis Model Mech.* 13(4): dmm042119. 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Pattarapanawan Montri, Uemura Mami, Miyazaki Nanae, Takami Shohei, Tomiyasu Hirotaka, Tsunekawa Naoki, Hirate Yoshikazu, Fujishiro Jun, Kurohmaru Masamichi, Kanai Azuma Masami, Higashiyama Hiroki, Kanai Yoshiakira	4. 巻 303
2. 論文標題 Anatomical and histological characteristics of the hepatobiliary system in adult Sox17 heterozygote mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 3096 ~ 3107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ar.24466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Mami, Higashi Mayumi, Pattarapanawan Montri, Takami Shohei, Ichikawa Naoki, Higashiyama Hiroki, Furukawa Taizo, Fujishiro Jun, Fukumura Yuki, Yao Takashi, Tajiri Tatsuro, Kanai-Azuma Masami, Kanai Yoshiakira	4. 巻 -
2. 論文標題 Gallbladder wall abnormality in biliary atresia of mouse Sox17+ neonates and human infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.042119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saba Rie, Kitajima Keiko, Rainbow Lucille, Engert Silvia, Uemura Mami, Ishida Hidekazu, Kokkinopoulos Ioannis, Shintani Yasunori, Miyagawa Shigeru, Kanai Yoshiakira, Kanai-Azuma Masami, Koopman Peter, Meno Chikara, Kenny John, Lickert Heiko, Saga Yumiko, Suzuki Ken, Sawa Yoshiki, Yashiro Kenta	4. 巻 9
2. 論文標題 Endocardium differentiation through Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48321-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Igarashi Hitomi, Uemura Mami, Hiramatsu Ryuji, Hiramatsu Ryuto, Segami Saki, Pattarapanawan Montri, Hirate Yoshikazu, Yoshimura Yuki, Hashimoto Haruo, Higashiyama Hiroki, Sumitomo Hiroyuki, Kurohmaru Masamichi, Saijoh Yukio, Suemizu Hiroshi, Kanai-Azuma Masami, Kanai Yoshiakira	4. 巻 99
2. 論文標題 Sox17 is essential for proper formation of the marginal zone of extraembryonic endoderm adjacent to a developing mouse placental disk†	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 578 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iocy079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Norika (Mengchia) Liu, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yusuke WATANABE, Yuji ARAI, Yoshie ISOMOTO, Atsushi NAKANO, Mami UEMURA-KAMATA, Yoko FUKUSHIMA, Yoshiaki KUBOTA, Akiyoshi UEMURA, Yoshiakira KANAI, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 A novel transmembrane protein Tmem100: regulatory mechanisms of endothelial-specific expression and cellular functions during vascular formation
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野愛里、上村-鎌田麻実、モントリーパタラパナワン、金井克晃、高島誠司
2. 発表標題 パーキンソン病様症状を呈する遺伝子改変マウスの雌性不妊解析
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村麻実、松本悠貴、高見尚平、平松 竜司、平手 良和、藤代 準、金井正美、金井克晃、石原玄基
2. 発表標題 獣医療保険金情報を用いた犬・猫の胆汁うっ滞性疾患における候補品種の選抜および遺伝子多型解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	高見 尚平、上村 麻実、Watcharapon Promsut、宮崎 奈々恵、平松 竜司、平手 良和、金井 正美、藤代 準、金井 克晃
2. 発表標題	Indocyanine Greenを用いたSox17+/-胆道閉鎖症モデルマウスの肝外胆管ライブイメージング
3. 学会等名	第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	平手 良和、中野 有紀、吉田 達見、伊藤 日加瑠、上村 麻実、金井 克晃、金井 正美
2. 発表標題	TRECK法による細胞死の誘導と細胞移植による子宮内膜上皮置換法の確立
3. 学会等名	第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	上村 麻実、高見 尚平、Montri PATTARAPANAWAN、五十嵐 瞳、平松 竜司、平手 良和、藤代 準、九郎丸 正道、金井 正美、金井 克晃
2. 発表標題	胆嚢組織におけるWntファミリー を中心としたSox17 誘導シグナルの探索
3. 学会等名	第162 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	高見 尚平、上村 麻実、Montri PATTARAPANAWAN、宮崎 奈々恵、平松 竜司、平手 良和、藤代 準、金井 正美、金井 克晃
2. 発表標題	マウスSox17の発現低下に依存した胆のう領域の低形成と胆道閉鎖症の病態
3. 学会等名	第162 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 劉 孟佳、片山 由美、渡邊 裕介、荒井 勇二、磯本 祥恵、中野 厚史、上村-鎌田 麻実、福嶋 葉子、久保田 義顕、植村 明 嘉、金井 克晃、中川 修
2. 発表標題 胎生期血管内皮遺伝子Tmem100の転写制御機構と血管形成における意義
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会 (CVMW)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村麻実、東真弓、古川泰三、パタラパナワン モントリー、市川直樹、東山大毅、九郎丸正道、金井正美、田尻達郎、金井克晃
2. 発表標題 ヒトとマウス胆嚢での胆道閉鎖症の比較病態
3. 学会等名 第161 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Montri PATTARAPANAWAN、 Mami UEMURA、 Hiroki HIGASHIYAMA、 Ryuji HIRAMATSU、 Naoki TSUNEKAWA、 Masamichi KUROHMARU、 Mizami KANAI-AZUMA、 Yoshiakira KANAI
2. 発表標題 Phenotypes of Adult Sox17+/- Hepatobiliary System in a Mouse Model of BiliaryAtresia
3. 学会等名 第161 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 潮田裕紀、高瀬比菜子、上村麻実、平手良和、平松竜司、金井正美、金井克晃
2. 発表標題 luminal flow を形成する精巣網上皮でのマウスSox17 遺伝子の役割
3. 学会等名 第161 回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 有紀、平手 良和、上村 麻実、金井 克晃、金井 正美
2. 発表標題 TRECK 法を用いた子宮内膜上皮置換法の確立
3. 学会等名 つくば国際会議場
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村-鎌田 麻実
2. 発表標題 胆道閉鎖症における胆嚢組織の比較病態解析：ヒトとマウスの類似点とは？
3. 学会等名 第31回モロシヌス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平手 良和、早川 佳那、中野 有紀、上村 麻実、三浦 健人、金井 克晃、金井 正美
2. 発表標題 子宮SOX17の着床受容期における下流候補遺伝子の探索
3. 学会等名 第65 回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村麻実、東真弓、古川泰三、Montri Pattarapanawan、市川直樹、東山大毅、田尻達郎、金井正美、金井克晃
2. 発表標題 ヒト・マウス間の胆道閉鎖症での胆嚢上皮の病態の差異と共通点
3. 学会等名 第41 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Montri PATTARAPANAWAN、 Mami UEMURA、 Hiroki HIGASHIYAMA、 Ryuji HIRAMATSU、 Naoki TSUNEKAWA、 Masamichi KUROHMARU、 Masami KANAI-AZUMA、 Yoshiakira KANAI
2. 発表標題 Morphological Changes in Hepatobiliary Tract of Adult Sox17+/-, a Mouse Model of Biliary Atresia
3. 学会等名 第41 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平手 良和、早川 佳那、中野 有紀、上村 麻実、三浦 健人、金井 克晃、金井 正美
2. 発表標題 子宮内膜上皮SOX17 の胚盤胞接着および脱落膜形成への関与
3. 学会等名 第41 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

獣医解剖学教室 http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/kaibo/ 東京医科歯科大学 疾患モデル動物解析学分野 www.tmd-cea.jp

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------