

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19380168

研究課題名（和文） 肝臓発生における内胚葉形成因子 SOX17 の役割

研究課題名（英文） Crucial roles of SOX17 in fetal liver development

研究代表者

金井 克晃（KANAI YOSHIKIRA）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30260326

研究成果の概要：

Sox17 遺伝子は脊椎動物間で保存された内胚葉形成因子である。本研究課題により、*Sox17*^{+/-} マウス(1C57BL/6(B6))のヘテロ個体の約 90%が、胎生後期に肝臓変性により致死となり、ハプロ不全を示すことを見いだした。さらに、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析の結果、肝細胞の小胞体ストレスによる肝細胞壊死が誘導されることが明らかとなった。本成果は、SOX17 遺伝子が新生仔肝炎の原因遺伝子の有力な候補であることを示唆しており、今後の先天性の肝疾患の克服への重要な研究成果となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：肝臓形成、SOX17、ハプロ不全、モデル動物、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 21世紀の移植医療創出の観点から、哺乳類の胚性内胚葉の初期分化、さらに各種内胚葉系組織への発生のメカニズムについて、国内外において精力的な研究がなされ、ここ5-6年において、その分化機構に関わる分子メカニズムが急速に明らかになってきた。胚性内胚葉から肺・膵・肝・腸などヒト成人病疾患に深く関与する組織・器官に発生するが、

この内胚葉研究の飛躍的な前進のきっかけとなった一つに、内胚葉形成因子“SOX (Sry-related HMG box) -17”の発見がある。Soxファミリーは、哺乳類の精巣決定遺伝子SryのDNA結合領域であるHMGボックスと高い相同性を示す一連の転写因子群である。マウスおよびヒトにおいては、現在までに20数種類のSox遺伝子が同定されており、様々な細胞・組織の分化決定に重要な役割を担っ

ている。

(2)申請者らが、1996年当初、マウス精巢に発現する新規の Sox 遺伝子として Sox17 を同定、単離した後(Kanai, Y. et al., J Cell Biol, 1996) Sox17 相同遺伝子が、下等脊椎動物(Xenopus, zebrafish など)において内胚葉への運命決定に必須の機能を担っていることが示唆された(Hudson et al., Cell, 1997; Alexander & Stainier, Curr Biol, 1999)。我々は、Sox17 欠損マウスの作出・表現系の解析、Sox17 欠損 ES 細胞のキメラ解析を行い、哺乳動物においても、Sox17 が胚性内胚葉への分化・維持に必須因子であることを証明し(Kanai Azuma, M., Kanai, Y., et al., Development, 2002) Sox17 が脊椎動物を通して保存された内胚葉形成因子であることを示した(Tam P, Kanai Azuma M, & Kanai Y, Curr Opin Genet Dev, 2003)。さらに、再生医療の分野で注目される ES 細胞からの移植細胞の作出技術において、Sox17 遺伝子発現を指標に、あるいは Sox17 発現を直接制御することにより、ES 細胞から内胚葉幹細胞の樹立、さらに膵臓の細胞、肝細胞、腸管上皮細胞への分化誘導が可能であることが申請者らとの共同研究も含め複数の研究グループから報告されている。これらの研究成果は、再生医療研究のみならず、試験管内で作成した様々な内胚葉系細胞を用いた毒性試験、創薬研究など、将来的に多方面での応用が広がることが期待されている。

(3) Sox17 は、初期の内胚葉形成だけでなく、その後の肺、肝臓、膵臓などの器官の発達・維持過程にもその発現が認められることから、内胚葉系臓器の発達・維持にも Sox17 の重要性が示唆されている。しかしながら、Sox17 欠損マウスは、初期の内胚葉形成の異常により早期に胎生致死であるため、その後の内胚葉系組織での役割については、現時点では全く不明のままである。

2. 研究の目的

我々は、Sox17 改変マウスの維持、掛け合わせの過程で、Sox17 +/-(129/Sv) マウスの遺伝的背景を C57BL/6 (B6) に戻し交配した結果、戻し交配の5代目以降、ヘテロ個体の約90%が致死となり、Sox17 遺伝子が、B6 background において haploinsufficiency (1コピー欠失によるハプロ不全)を示すことを数年前に見出した (Sox17 +/-(マウス生存率は、B6 への戻し交配の5~7代目で、生存率は約12%、8代目以降で4%)。予備実験の段階ではあるが、発現解析・病理学的検討の結果、胎齢14.5日頃から辺縁部の肝細胞から Sox17 が発現すること、さらに、Sox17 発現開始約1日後の胎齢15.5日において、Sox17 +/-(B6) 胎子では、肝臓の辺縁部から

顕著な空胞化変性を伴う肝臓壊死を発症することが明らかとなっている。この結果は、妊娠後期の肝臓発生、成熟過程において、辺縁部の肝細胞から Sox17 が特異的に発現し、肝臓の正常な形成・発達に重要な機能を担っていることを強く示唆するものである。本研究課題は、肝臓における SOX17 の作用機序を明確にし、肝臓の発生・発達・成熟過程の分子機構の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織学的解析(免疫組織化学など)
戻し交配6代目以降の胎仔から肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法を用いてパラフィンで包埋したサンプルを用いて解析を行っている。電子顕微鏡を用いた解析では、2倍濃度のカルノフスキー液を用いて固定し、EPON樹脂に包埋したサンプルを用いて解析を行った。

(2) リアルタイム PCR
胎仔の肝臓の変性が認められる辺縁部と変性が認められない中心部にトリミングし、それぞれから mRNA を抽出した。この mRNA を鋳型とし、逆転写反応により cDNA を作製した。この cDNA を用いて、SYBR Green 法により、それぞれの遺伝子の発現について解析を行った。

(3) マイクロアレイ解析
胎齢16.0日の野生型(1個体)および Sox17+/- (2個体)の肝臓の中心部分をトリミングし、mRNA を抽出した。これから RNA プローブを作製し、アフィメトリクス社 Mouse Genome 430 2.0 Array キットで解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胎齢16.0日以降の Sox17+/- (B6 系統)の肝臓における萎縮を伴う変性

肉眼解剖の結果、胎齢16.0日以降の Sox17+/- (B6 系統)の肝臓において、図1に示すような辺縁部から白い変性が確認された。胎齢13.0日以降の肝臓の臓器質量を計測したところ、変性が生じ始める胎齢16.0日以降にて、Sox17+/- (B6 系統)の肝臓の臓器質量が、野生型に比べ有意に低下していることを明らかにした。



図1 胎齢 17.5 日の肝臓の実体顕微鏡像

(2) *Sox17*^{+/-} (B6 系統) の肝臓での肝細胞の異常

Sox17^{+/-} (B6 系統) の肝臓の変性部は、免疫組織化学による解析の結果、肝細胞マーカー遺伝子である *Hnf4-alpha* の発現が低下しており、また肝細胞の機能のひとつであるグリコーゲン蓄積も消失していた。一方、造血細胞や血管系のマーカー遺伝子の発現については異常が見られなかった。また、これらの結果は mRNA の発現レベルでも確認された。この結果、*Sox17*^{+/-} (B6 系統) の肝臓の変性は、肝細胞の発生と機能の異常が原因であり、造血や血管形成の異常が原因ではないことが明らかになった。

変性中期の胎齢 16.5 日の *Sox17*^{+/-} (B6 系統) の肝臓の微細構造について、電子顕微鏡による観察を行った結果、胆管周囲の肝細胞に小胞体の拡張が観察された。このことから、*Sox17*^{+/-} (B6 系統) の肝臓の肝細胞が小胞体ストレスを受けていることを明らかにした。

(3) マイクロアレイ解析による肝臓変性の原因遺伝子の探索

変性初期の胎齢 16.0 日の *Sox17*^{+/-} (B6 系統) マウスの肝臓から mRNA を抽出した。その結果、複数の *Sox17*^{+/-} 個体で共通して発現が野生型に比べ有意に上昇した遺伝子は 130 遺伝子、発現が有意に減少した遺伝子は 46 遺伝子あることが明らかになった。これらの遺伝子について、遺伝子オントロジーに基づく解析を行った結果、変性初期の *Sox17*^{+/-} (B6 系統) の肝臓では肝炎症および肝毒性に関連する遺伝子群の発現が変化していることが明らかとなった。特に、炎症性ケモカインである *Cxcl10* の発現が亢進しており (図 2) *Sox17*^{+/-} (B6 系統) の肝臓における変性の急激な進行に *Cxcl10* が関与しているものと考えられた。

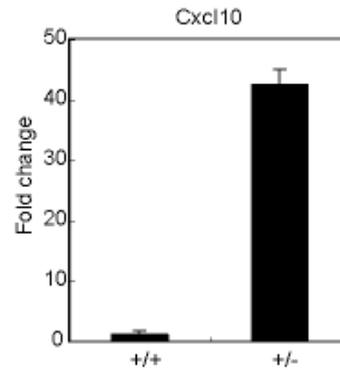


図2 .胎齢 17.5 日の肝臓中心部 (非変性部) における *Cxcl10* の mRNA 発現の変化

以上の結果から、*SOX17* 因子が、胎仔の正常な肝臓発生に重要であり、遺伝子量が半減すると胎児の肝炎を発症することが明らかとなった。本研究成果は、肝臓形成における分子メカニズムの基礎データを提示するだけでなくに終らず、*Sox17* 遺伝子が *SOX9* (屈曲肢異形成症)、*SOX10* (Hirschsprung 症候群) と同様に、haploinsufficiency を示すことを初めて明らかにした。この成果は、医学・獣医学領域における、先天性の肝臓障害の原因遺伝子の候補であり、今後の肝疾患の克服への基盤技術の開発に繋がる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Hara K, Kanai Azuma M, Uemura M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Kawakami H, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai Y. Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Dev. Biol.* 330, 427-439, 2009. 査読有

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

Sakamoto Y, Hara K, Kanai Azuma M, Matsui T, Miura Y, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Saijoh Y, Koopman P, Kanai Y. Redundant

roles of Sox17 and Sox18 in early cardiovascular development of mouse embryos. **Biochem Biophys Res Commun.** 360(3):539-544. 2007. 査読有

金井、川上、原、金井 ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション. 組織細胞化学 2008, 中西印刷 p.51-58, 2008. 査読無し

〔学会発表〕(計 2件)

三浦雄太郎, 上村麻実, 永田工, 原健士朗, 金井正美, 恒川直樹, 九郎丸正道, 金井克晃. マウス肝臓の後期発生における Sox17 のハプロ不全. 第15回肝細胞研究会 2008年6月27,28日 静岡.

Kanai Azuma M and Kanai Y. Haploinsufficiency of Sox17 results in defective maturation of fetal hepatocytes in B6 mice. The 2nd SOX Meeting (organized by Hisato Kondoh and Michael Wegner) Sept 16th-19th, 2008 淡路夢舞台国際会議場

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

多屋 長治 (TAYA CHOUJI)
(財)東京都医学研究機構・(財)東京都医学研究機構・研究員
研究者番号：90175456

九郎丸 正道 (KUROHMURU MASAMICHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00148636

恒川 直樹 (TSUNEKAWA NAOKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：50431838