

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21248034

研究課題名（和文） 内胚葉形成因子SOX17の肝臓、胆管、膵臓発生における役割

研究課題名（英文） Crucial roles of SOX17 in liver-gallbladder-pancreas 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（和文）：胎子の発生過程において、SOX17陽性の胆嚢・胆管前駆細胞は、心臓原基・横中隔の正中部位から外側の前腸後端部(左右一対)で、肝臓、膵臓の決定と同時に分化し、腸管の管状化の過程で本来の位置である肝臓と膵臓の間にソーティングされることを見出した。SOX17は、細胞自律的に胆嚢・胆管前駆細胞の決定に必須の機能を担っており、さらに、胆嚢・胆管前駆細胞でのSOX17発現量の低下が、発生後期の胆嚢、胆嚢管の発達異常を誘導することを見出した。

研究成果の概要（英文）：The SOX17-positive gallbladder and bile-duct progenitors are specified in the paired lateral endoderm domains outside the heart field at almost the same timing as hepatic and pancreatic induction in early somite stage embryos. These paired Sox17-positive domains expand ventromedially to merge in the midline of the AIP-lip and become localized between the liver and pancreatic primordia. Genetic analyses using *Sox17*-null and chimeric embryos showed that *Sox17* functions cell-autonomously to specify the gallbladder/bile-duct progenitors at the early somite stage. During late-organogenic stages, we also found that insufficient SOX17 expression in the fetal gallbladder and bile-duct epithelia leads to aberrant formation of both gallbladder and cystic duct at the late-fetal stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,800,000	3540,000	15,340,000
2010年度	12,000,000	3600,000	15,600,000
2011年度	12,000,000	3600,000	15,600,000
年度			
年度			
総計	35,800,000	1,0740,000	46,540,000

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：SOX17、肝臓、膵臓、胆管、モデル動物、マウス

1. 研究開始当初の背景

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、この10年において、その分化機構に関わる分子メカ

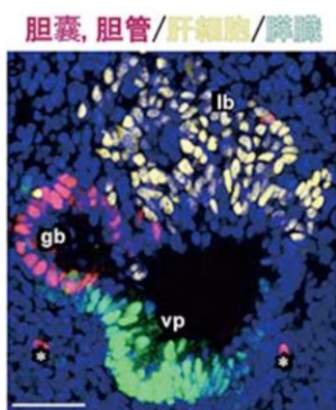
ニズムが急速に明らかになってきた。胚性内胚葉から肺・膵・肝・腸などヒト成人病疾患に深く関与する組織・器官に発生するが、この内胚葉研究の飛躍的な前進のきっかけとなった一つに、内胚葉形成因子“SOX17”の発見がある。Soxファミリーは、哺乳類の精

巢決定遺伝子 *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。

私たちが、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。私たちは、*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 β 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。

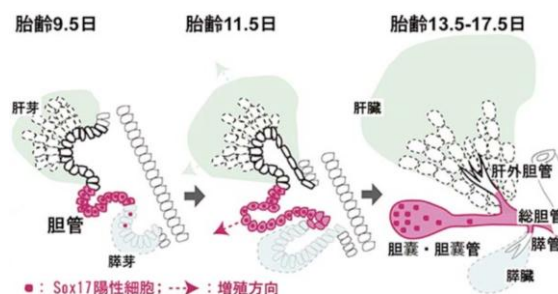
2. 研究の目的

肝臓、膵臓、胆嚢・胆管の起源は、器官形成の初期において、原始腸管の前腸の腹側後方の一部分が伸び出すことにより発生する (下図; gb: 胆嚢・胆管, lb: 肝臓, vp: 膵臓)。



肝臓と膵臓の原基は、心臓原基と隣接する横中隔からのシグナル因子により前腸の正中腹側領域から生じることが示され、その分化の制御機序についても精力的な解析がなされ多くの知見が蓄積している。しかし、残り

の胆嚢・胆管の形成機序については、前腸からの特異化およびその前駆細胞の分化の制御機序など、ほとんど理解されていない。私たちは、内胚葉への初期分化の過程で *Sox17* が一過性に発現した後、前腸組織の胆嚢・胆管原基において *Sox17* が再び活性化し、胎生後期まで胆嚢領域で *Sox17* を発現、維持していることを見出した (下図; 赤色の点)。



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の多くは、不明のままである。

また、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 (C57B6) 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、C57B6 background (以下 B6) において haploinsufficiency (1 コピー欠失によるハプロ不全) により、胆管周囲の肝細胞に小胞体ストレスによる急性肝炎が誘導される事を見出していた。本研究課題は、SOX17 の器官形成初期と器官形成後期における肝臓、膵臓、それらをつなぐ胆嚢、胆道系での機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Sox17* 欠損マウス胚と *Sox17* 欠損 ES 細胞キメラ胚の作出と解析

Sox17 ヘテロ個体同士の交配により *Sox17* 欠損胚を作出した。*Sox17* 欠損 ES 細胞を CAG-EGFP マウスに導入し、キメラ胎子を作成し、*Sox17* 欠損細胞の寄与率を解析した。

(2) 組織学的解析 (免疫組織化学)

キメラ胚、*Sox17* 欠損胚から前腸原基の器官培養した試料、戻し交配 7 代目以降の C57BL6J 系統の *Sox17* ヘテロ胎仔から胆嚢、肝臓、膵臓の組織を取り出し、固定後、様々なマーカー発現も含め組織学的解析を行った。

(3) リアルタイム PCR

胎子の胆嚢、肝臓原基から 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、胆嚢、肝臓、膵臓の分化マーカーも含め様々な遺伝子の発現解析を行った。

(4) マイクロアレイ解析

胎齢 16.0 日の野生型, *Sox17*^{+/-} の試料から 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.

(5) E13.5 胆嚢原基からの器官培養系による胆嚢, 胆嚢管形成の誘導

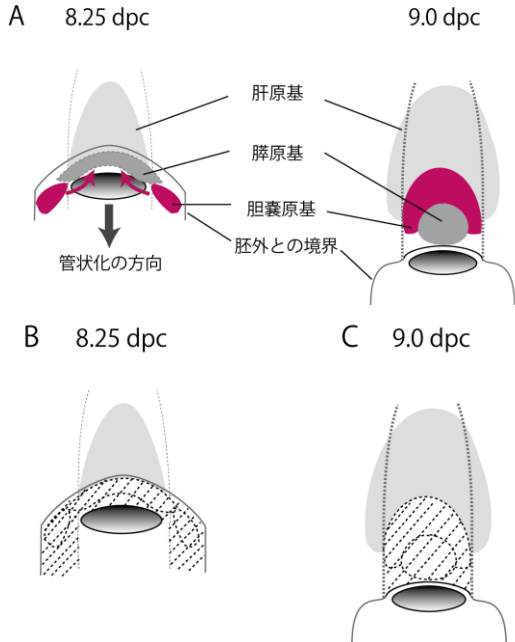
野生型と *Sox17* ヘテロの胆嚢原基をフィルター上で器官培養を行い, 継時的な組織学的解析を行った.

4. 研究成果

(1) 胆嚢・胆管の前駆細胞の分化における *Sox17* の発現パターンとその機能解析

まず, マウスの胆嚢・胆管原基の初期決定時期における詳細な発現解析と変異マウス胚を用いて機能解析を行い, 以下の結果を得た.

① 前腸領域での最初の *Sox17* 発現は, 左右の前腸門 (anterior intestinal portal; 管状化している管の開口部) の外側後方 (管状化する前のシート状の前腸内胚葉層) の部位 (下図 1A 左の赤領域) で起こる. その後, 腸管形成に伴い (管状化の形態形成運動により), *Sox17* 陽性前駆細胞の集団は, 腹側・正中方向へと伸展・移動し, 管腔の構築後には腹側正中線に沿って膵臓と肝臓間の胆嚢・胆管予定領域にすっぽり収まる (下図 A 右の赤領域).



② 胆嚢・胆管予定領域での *Sox17* の発現開始時期 (8.25dpc) は, 肝臓や膵臓の前駆細胞の分化誘導 (マーカー遺伝子の発現) とほぼ同時である (胆嚢・胆管, 肝臓, 膵臓の3つの予定領域は, ほぼ同時に決定).

③ *Sox17* 欠損マウスでは, 初期胚の前腸内胚葉の細胞数の不足により, 胆嚢・胆管の予定

領域 (*Sox17* の再活性化領域) を含む前腸の左右の外側内胚葉領域 (左下図 B, C の斜線) が欠失する. このために, *Sox17* 欠損胚は, 胆嚢・胆管 (と膵臓) の形成不全を呈する.

④ *Sox17* 欠損 ES 細胞とのキメラ解析により, *Sox17* 欠損内胚葉細胞は, 前腸の左右の外側内胚葉領域 (左下図 B, C の斜線) への寄与率は著しく低い. さらに, まれに寄与した少数の *Sox17* 欠損細胞において, 胆嚢・胆管マーカーの発現が特異的に消失しており, 胆嚢・胆管前駆細胞への自律的な分化能が欠失している.

上記の結果により, SOX17 の活性が, 胆嚢・胆管前駆細胞への分化に細胞自律的に必須であり, 胆管前駆細胞は, 心臓原基・横中隔の正中部位から外側の前腸後端部 (左右一対) で, 肝臓, 膵臓の決定と同時に起こり, 腸管の管状化の形態形成の力により, 本来の位置である肝臓と膵臓の間にソーティングされることを示唆された.

(2) 胎齢 16.0 日以降の *Sox17*^{+/-} (C57B6 系統) の肝臓, 胆嚢原基の発達異常

① *Sox17*^{+/-} (B6) 肝臓の表現型

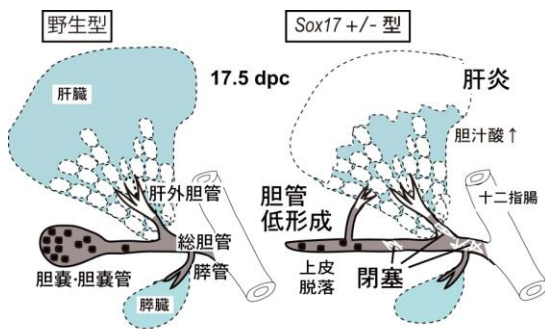
Sox17^{+/-} (B6) の肝臓領域の詳細な解析の結果, 肝臓内の造血細胞や血管系のマーカー遺伝子の発現については異常が見られなかった. 肝臓の変性部では, 小胞体ストレスによる肝炎が, 判明していたが, マイクロアレイ解析の結果, ヘテロ変異により発現上昇する 59 遺伝子を同定し, 様々な炎症サイトカインや肝毒性マーカー遺伝子 (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl10*, *Ptgs2*, *Esm1*, *Serpine1*) の発現上昇が確認された. リアルタイム PCR 解析の結果, これらの炎症性マーカーの発現は, 肉眼レベルでの肝炎の重篤度に依存して発現の増加傾向を示した. ALT や ALP の肝炎マーカーの血清レベルは 17.0dpc の野生型同腹子に比較し *Sox17*^{+/-} 胚で顕著に上昇した. ER ストレスマーカーである GRP78 の発現も, *Sox17*^{+/-} 肝臓における変性領域の周辺肝細胞で上昇しており, 微細形態学的な解析においても, 変性領域の周辺肝細胞における毛細胆管に面した細胞質領域の特徴的な ER の拡張を示した.

② *Sox17*^{+/-} (B6 系統) 胆嚢, 胆嚢管での表現型

13.5-17.5dpc において, 胎仔肝細胞, 肝内胆管, 肝外胆管, 総胆管では SOX17 の発現は検出できなかった. しかし, 胆嚢原基の遠位端の胆管上皮細胞で, 胎生後期まで SOX17 の強い発現が維持されていることが判明した. 抗 PCNA, Ki67 染色, BrdU の取り込み実験により, SOX17 陽性の胆管上皮細胞において有意に高い増殖活性をもつことが判明した. さらに, 組織学的な解析により, 野生型と比べ,

Sox17 +/- (B6) 胎子の胆嚢上皮が低形成を呈し、*Sox17* +/- 上皮細胞の増殖の有意な低下、一部の胆嚢管や肝外胆管の管腔が閉塞することが判明した。13.5dpc の *Sox17* +/- と野生型の胆嚢原基を器官培養し、胆管構造の伸長と形態形成を誘導する培養系を新たに開発した。本培養下でも *Sox17* +/- 胆管構造の伸長障害と胆管上皮の低形成を示し、生体での表現型を再現することが明らかとなった。

これらの結果から、新生子期に、胆管前駆細胞での SOX17 発現の半量程度の低下により肝外胆管の上皮破綻/胆管閉鎖と急性肝炎を引き起こすことが示唆された (下図)。



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 12 件)

① 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(3):639-648. 査読有
doi: 10.1242/dev.086702

② 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(13):2426-2435. 査読有
doi: 10.1242/dev.079921

③ Nagai R, Shinomura M, Kishi K, Aiyama Y, Harikae K, Sato T, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Tsunekawa N, Kanai Y. (2012) Dynamics of GFR α 1-positive spermatogonia at the early stages of colonization in the recipient testes of W/W ν male mice. **Dev**

Dyn, 241(8):1374-1384. 査読有
doi: 10.1002/dvdy.23824

④ Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T., Shima, Y, Kidokoro T, Kanai Y, Schedl A, Wilhelm D, Koopman P, Okuno Y, Morohashi K. (2012) Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. **Endocrinology**, 153(2):913-924. 査読有
doi: 10.1210/en.2011-1055

⑤ Pfister S, Jones VJ, Power M, Truissi GL, Khoo PL, Steiner KA, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Tam PP, Loebel DA. (2011) Sox17-dependent gene expression and early heart and gut development in Sox17-deficient mouse embryos. **Int J Dev Biol**. 55(1):45-58. 査読有
doi: 10.1387/ijdb.103158sp.

⑥ Sato T, Aiyama Y, Ishii-Inagaki M, Hara K, Tsunekawa N, Harikae K, Uemura-Kamata M., Shinomura M, Zhu XB, Maeda S, Kuwahara-Otani S, Kudo A, Kawakami H, Kanai-Azuma M, Fujiwara M, Miyamae Y, Yoshida S, Seki M, Kurohmaru M, Kanai Y. (2011) Cyclical and Patch-like GDNF Distribution along the Basal Surface of Sertoli cells in Mouse and Hamster Testes. **PLoS ONE**, 6(12): e28367. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0028367

⑦ 金井 (2011) 分担「生物機能モデルと新しいリソース, リサーチツール; series モデル動物利用マニュアル」エル・アイ・シー p. 152-166. 査読無し

⑧ Hiramatsu R, Harikae K, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Matsuo I, Kanai Y. (2010) FGF signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation. **Development**, 137(2):303-312. 査読有
doi: 10.1242/dev.040519

⑨ Uemura M, Hara K, Shitara H, Ishii R, Tsunekawa N, Miura Y, Kurohmaru M, Taya C, Yonekawa H, Kanai-Azuma M, Kanai Y. (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(1):357-363. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.063.

⑩ Hara K, Kanai-Azuma M, Uemura M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Kawakami H, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai Y. (2009) Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. **Dev Biol.** 330(2):427-439. 査読有
doi: 10.1016/j.ydbio.2009.04.012.

⑪ Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, Kurohmaru M, Morohashi K, Wilhelm D, Koopman P, Kanai Y. (2009) A critical time windows of Sry action in gonadal sex differentiation in mice. **Development**, 36(1):129-138. 査読有
doi: 10.1242/dev.029587

⑫ Bradford ST, Hiramatsu R, Maddugoda MP, Bernard P, Chaboissier MC, Sinclair A, Schedl A, Harley V, Kanai Y, Koopman P, Wilhelm D. (2009) The cerebellin 4 precursor gene is a direct target of SRY and SOX9 in mice. **Biol Reprod.** 80(6):1178-1188. 査読有
doi: 10.1095/biolreprod.108.071480

[学会発表] (計 4 件)

① Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Kudo A, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, Taga T. Sox-F family proteins have roles in the maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad mesonephros region of mouse embryo. The 10th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, June 13-16, 2012.

② Kanai Y; Invited lecture: A gene-dosage function of Sox17 in gallbladder / bile duct morphogenesis, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Feb 28th, 2012, Bangkok, Thailand.

③ Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Kudo A, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, Taga T. Hematopoietic cell clusters present in the aorta-gonad-mesonephros region exhibited long-term repopulating ability by Sox17-expression. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, December 11-14, 2011.

④ Kanai Y. Heterogeneity in Sexual Bipotentiality and Plasticity of Granulosa Cells in Mouse Ovaries. The 3rd SOX Meeting (organized by Michael Wegner). Sept 11th-14th in 2011, Grainau, Germany.

(国内学会の一般講演は、省略)

[その他]
ホームページ
<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 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)
公益財団法人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

九郎丸 正道 (KUROHMRU 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