

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成24年度採択分  
平成27年3月17日現在

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

Morphogenesis, regeneration and congenital disease in  
gallbladder and bile duct system in mammals

課題番号：24228005

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



研究の概要

本研究は、先天性胆管閉塞の病因・病態を解明することを目的とし、胆管前駆細胞の起源から、領域決定、胆嚢原基の形成、特異化、構造的・機能的な器官の成立までの発生生物学的な分子メカニズムを明らかにする。さらに、先天性胆管閉塞のモデルである *Sox17* ハプロ不全マウスを利用して、何時、どのようにして胆管閉塞が生じ、新生子肝炎を発症するのかを解き明かす。

研究分野：農学

キーワード：発生、病態

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物間で保存された内胚葉形成の初期分化因子 SOX17 は、器官形成後期においても、内胚葉由来の胆管前駆細胞（胆嚢・胆嚢管・肝外胆管の予定領域）に再発現し、成体まで一部の胆管細胞で維持されることが明らかとなっている。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、胆管の形態形成、管壁の維持に深く関与し、その SOX17 の発現低下により、先天性の胆管閉塞、胆汁鬱滞を引き起こし、新生子肝炎の原因となる可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胆管前駆細胞の発生的起源から領域決定、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的メカニズムの全貌を明らかにすることである。さらに、*Sox17* ハプロ不全が、何時、どのようにして胆管閉塞、肝炎を誘導するのか、その分子機序を解析し、先天性胆管閉塞の病因・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

研究に用いたマウス系統は、様々な *Sox17* 変異系統(B6, ICR)、*Sox17-EGFP* ノックイン系統、conditional-ko 系統(*Sox17<sup>flox/+</sup>/Alb-cre*; *Sox17<sup>flox/+</sup>/Pdx1-cre*)、Shiva 系統(SOX17 HMG box 内の M72R 変異)の全5種類の変異体と、それらの二重変異体である。その表現型を4つの異なった視点[①SOX17+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*Sox17(B6)*ハプロ不全による胆管前駆細胞の異常と先天性の肝・膵・胆管疾患の発症機序、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 TRECK (Toxin Receptor Cell-Knockout)等を利用した SOX17+胆管前駆細胞の多分化能]からの実験手法により詳細な解析を行った。

4. これまでの成果

1) *Sox17*+胆管前駆細胞の動態

i) 哺乳類の腹側前腸での胆嚢原基の予定領域の同定：胎齢 8.5 日(E8.5)の胎子の全胚培養による fate mapping 解析により、9-11somite 胎子の前腸での胆嚢原基の予定領域を検討した結果、左右の前腸の腹側・最外側領域の前方から 1-2 体節の(卵黄嚢静脈が裏打ちする)腹側前腸の位置が胆嚢原基の腹側面を形成することを明らかにした。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、胆嚢原基は3種類の前腸内胚葉から由来することが初めて明らかとなった(Uemura et al., 2015)。

ii) *Sox17<sup>-/-</sup>* (欠損)の胆管前駆細胞の肝・膵芽細胞への脱分化：E8.5-9.0 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(E9.5)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<sup>-/-</sup>*)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 $\alpha$ 、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。

## 2) *Sox17*<sup>+/+</sup>胎子の胆嚢・胆管の病態解明

i) 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。さらに、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*<sup>+/+</sup>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症に認められる左右軸の側性には異常が無く、*Sox17*<sup>+/+</sup>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、ヘテロ、野生型において有意な差異は認められなかった。以上の結果から、*Sox17*<sup>+/+</sup>マウス(B6)は、胆嚢・胆管上皮破綻による新たな胆道閉鎖症の病態モデルであることが再確認できた(Uemura et al., 2013)。

ii) *Sox17*<sup>+/+</sup>胎子の「胆嚢の胆嚢管化」と胆嚢炎：*Sox17*<sup>+/+</sup>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*<sup>+/+</sup>胆嚢では、胆嚢特異的な遺伝子の 80.1%が低下し、対して胆嚢管に特異的な遺伝子の 64.1%が上昇していたことから、*Sox17*<sup>+/+</sup>胆嚢が、「胆嚢管化」していることが判明した。また *Sox17*<sup>+/+</sup>胆嚢では、肝炎の発症前に胆嚢炎マーカーが上昇した。*Pdx1-cre; Sox17*<sup>flox/+</sup>の胆嚢原基(一部 *flox* が抜ける)では発現が上昇し、*Alb-cre; Sox17*<sup>flox/+</sup>で正常レベルであることから、胆嚢炎の発症は、胆嚢上皮での SOX17 活性の低下が主因であることが判明した(投稿準備中)。

iii) *Sox17*<sup>+/+</sup>胆嚢での下流因子の同定:胆嚢、胆嚢管原基のトランスクリプトーム解析により、*Sox17*の下流で機能する複数のシグナル因子を同定した。そのうちの一部のシグナル因子が、胆嚢・胆嚢管にかけて SOX17+胆管前駆細胞で強く発現し、その受容体遺伝子は、胆嚢周囲の間質領域に発現していることが判明した。*Sox17*<sup>+/+</sup>とこれらのシグナル因子の欠損マウスとの交配実験により、このシグナル低下が *Sox17*<sup>+/+</sup>の胆嚢原基の低形成に関与し、胆道閉鎖を重篤化することを見出し、先天性胆道閉鎖症の病態に深く関与することが示唆された。

## 5. 今後の計画

1) *Sox17*の上流・下流因子の機能解析とし

て、器官培養下での候補シグナル因子を染み込ませたビーズによる添加実験により、SOX17+胆管前駆細胞の動態解析を行う。

2) *Shiva* 系統、*Alb-cre, Pdx1-cre* と *Sox17*<sup>flox/+</sup>、*Sox17*<sup>flox/flox</sup> の二重変異体での胆嚢での表現型解析を行う。

3) *Sox17*+胆管前駆細胞において、その相補的な多分化能を検討するため、様々な生後 2 1 日(P21)の TRECK マウス(宿主)に SOX17 +胆管細胞を移植し、その動態を検討する。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1) 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.** in press.

2) 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(6): H1-9.

3) Rommelaere 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(8):e104925.

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\*. (2013) *Sox17* haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. **Development** 140(3):639-648.

5) 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(3):400-405.

6) 金井克晃：ヤンソン賞(東京大学優駿会)「*SRY, SOX(SRY* 型 HMG box)遺伝子と細胞運命決定」(東京大学 中島董一郎記念ホール) 11月23日, 2013.

ホームページ等

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