

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士過程 入学
氏名 松井 貴輝
指導教官 秋山 徹

論文題目 肝細胞の成熟にともなう細胞間接着の制御機構

序論

マウスの個体発生において、肝臓の原基は、胎生 8.5 日目(E8.5)頃、腸管の一部が隆起することによって形成される。この時、腸管上皮細胞が肝芽細胞に分化し、肝細胞に特異的な遺伝子である α -fetoprotein や albumin の発現を開始する。E10.5 を過ぎると、肝外から血液細胞が流入することによって、肝臓は造血器官としての役割を開始する。胎生中期頃、肝芽細胞は肝細胞と胆管上皮細胞に分化し、それぞれの細胞は増殖しながら段階的に成熟していく。出生後、肝の造血能は低下し、肝細胞は tyrosine amino transferase (TAT)や glucose-6-phosphatase (G6Pase)などの代謝酵素の発現を開始し、成体肝の主要な機能である代謝を行うようになる。その後肝細胞は、オルガネラや細胞間接着を発達させることによって、細胞の極性や細胞集団を形成し、肝小葉さらには肝組織を構築していく。このように肝細胞は、胎生中期から生後にかけて機能的に、形態的に成熟・分化しており、それらのプロセスには、サイトカインや接着因子などのさまざまな制御因子が関与していると考えられる。

E14.5 由来の肝細胞の初代培養系において、IL-6 ファミリーに属する oncostatin M (OSM)は、glucocorticoid (dexamethasone; Dex)存在下で、E14.5 では発現していない代謝酵素(TAT, G6Pase)の発現や肝機能の一つであるグリコーゲンの蓄積を

誘導し、さらに、成熟した肝細胞に類似した形態変化を促進することが報告された。また、OSMのシグナル受容体であるgp130のknockoutマウス(gp130 KOマウス)の肝臓(E18.5)で、TATの発現やグリコーゲンの蓄積が低下していることが見出された。これらの結果は、gp130を介したOSMのシグナルが、*in vitro*と*in vivo*の両方で、肝細胞の機能的・形態的な成熟のプロセスに関与していることを示唆している。しかしながら、OSMがどのような細胞内因子を介して、肝細胞の機能的な成熟を誘導しているのか、また、肝発生における形態形成が、OSMによってどのように調節されているのかは、まだ理解されていない。そこで本研究では、OSMによる肝細胞の成熟・分化の誘導系を利用して、肝細胞の機能的・形態的な成熟プロセスに関与している因子の同定を行い、肝発生の分子機構を解明することを試みた。

結果と考察

STAT3とRasシグナルによる肝細胞の機能的な成熟の制御

胎生肝細胞の初代培養系において、OSMの刺激によって活性化されるシグナル経路を明らかにするために、OSMによるシグナル伝達分子のリン酸化レベルを解析した。その結果OSMは、JAK1, STAT3, STAT5, SHP-2, MAPK, p70S6Kなどさまざまな因子のリン酸化を亢進することが明らかになった。次に、肝細胞の成熟に必須のシグナル経路を明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いてシグナル分子の変異体を肝細胞に導入し、その作用を検討した。dominant negative型のSTAT3 (Δ STAT3)は、OSMによって誘導される分化マーカーの発現やグリコーゲンの蓄積を顕著に抑制したが、 Δ STAT5はこれらに何の影響も与えなかった。他方、dominant negative型のRas (RasN17), SHP-2(C463A)は、その発現をむしろ増強する作用を示した。これに相関して、活性型Ras (RasV12)は、分化マーカーの発現を強く抑制することがわかった。以上の結果から、代謝酵素の発現などの機能的な成熟のプロセスには、STAT3のシグナルが必須であり、他方Rasの経路は、それを負に制御している可能性が考えられた。

肝細胞の形態的成熟におけるOSMの役割

OSMはDex存在下(Dex/OSM)で、細胞間の接着が強固になった形態的な変化を誘導する。このような形態的特徴は、Dex単独で処理した細胞では認められないことから、OSMが肝細胞の形態形成を促進している可能性が示唆された。

そこで OSM が、どのように肝細胞の形態を制御しているのかを明らかにするために、OSM の刺激前後で肝細胞の微細構造の解析を行った。Dex/OSM で処理した細胞では、細胞と細胞の接触部位に desmosome 様の構造やアクチンの組織化が認められ、発達した接着装置が形成されていることが明らかになった。他方、Dex 単独で処理した細胞では、OSM で刺激した時に観察される接着装置の形成はほとんど見られなかった。したがって、OSM の刺激は、接着装置の形成を促進し、肝細胞の形態形成を制御している可能性が示唆された。

OSM による細胞間接着因子の動態の制御

成熟した肝細胞は、junctional complex (JC) と呼ばれる接着装置によって細胞同士が相互作用することが知られている。JC は、tight junction (TJ), adherens junction (AJ), desmosome (Des) で構成されており、細胞の極性や細胞集団の形成に重要な役割を果たしている。そこで、OSM の刺激によって形成される接着装置を同定するために、OSM 刺激前後での各接着装置の形成を解析した。まず TJ の形成を調べるために、その構成因子である ZO-1 の細胞内局在性を調べたところ、ZO-1 は Dex 単独で処理した細胞ですでに接着部位に局在化し、OSM を添加してもその局在は変化しなかった。よって、TJ の形成は Dex の刺激に依存しており、OSM による形態変化とは関連しないことがわかった。次に、AJ の構成因子である E-cadherin, β -catenin の細胞内分布を解析したところ、Dex 単独で処理した細胞では、それらが細胞内に分散して存在しているのに対して、Dex/OSM で処理した細胞では、細胞間接着部位に強く濃縮することを見出した。また、E-cadherin などの AJ の構成因子の蛋白質量は OSM の刺激で変化せず、発現量はむしろ Dex によって調節されていることが明らかになった。さらに、*in vivo* の肝発生過程での AJ の形成を解析したところ、肝小様が形成されていない E14.5 や新生児期(neonatal)の肝臓では、E-cadherin や β -catenin の接着部位への濃縮はあまり認められなかったが、成熟が完了した adult の肝臓では、完全に細胞間の接着部位に局在化し、肝細胞の集団が形成されていた。この結果は、胎生中期から生後にかけての肝臓で、E-cadherin などの構成因子は発現しているにもかかわらず、明確な AJ の構造が形成されていないことを示している。したがって、肝発生における AJ の形成は、接着因子の発現、およびその局在レベルによって規定されており、この両者は異なるメカニズムによって制御されていることが示唆された。以上の結果から、glucocorticoid と OSM のシグナルは、

それぞれ接着因子の発現, 局在を調節している可能性が考えられた.

Ras 経路に依存した E-cadherin の接着部位への局在化

gp130 KO マウスは、肝小葉構造が構築される前に死亡するため、E-cadherin の局在に関与するかどうかは明らかになっていなかった。そこで、OSM-gp130 シグナルが AJ の形成に関与するかを解析するために、E14.5 の gp130 KO マウスの肝臓を摘出し、single embryo culture を行った。その *in vitro* 培養で、E-cadherin の局在を解析したところ、gp130 KO マウス由来の肝細胞では、OSM の刺激に依存した E-cadherin の接着部位への濃縮はまったく認められなかった。そこで次に、gp130 の下流で機能するシグナルを明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いて dominant negative 型の STAT3, Ras を肝細胞に導入し、OSM による E-cadherin の局在化に対する影響を検討した。その結果、分化マーカーの発現を阻害する作用を示す Δ STAT3 を発現した細胞では、発現していない細胞と同様に OSM による E-cadherin の接着部位への濃縮が認められた。ところが、分化マーカーの発現を増強する作用を持つ RasN17 を発現させると、その接着部位への濃縮は顕著に抑制されることが明らかになった。したがって、肝発生過程で起こる E-cadherin の接着部位への局在化は、gp130 を介して活性化された Ras シグナルが重要であることが示唆された。

肝発生の分子メカニズム

E14.5 から出生前後までの肝発生のプロセスには、OSM によって活性化される二つのシグナル分子が異なるな役割を果たすことが明らかになった。すなわち、STAT3 は肝分化マーカーの発現やグリコーゲンの蓄積を誘導し、Ras は E-cadherin などの接着因子の細胞内局在を制御することが明らかになった。以上の結果から、個々の細胞が機能的に成熟していくプロセスに関しては、STAT3 のシグナルが必須であり、他方、細胞同士が相互作用し、細胞社会を形成していく過程には、Ras を介したシグナル経路が関与していることが考えられた。したがって、肝発生のプロセスには、STAT3 と Ras の異なるシグナル経路がバランスよく活性化される必要があることが示唆された。