

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松 井 貴 輝

肝細胞は胎生中期から生後にかけて機能的、形態的に成熟・分化するが、そ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。事実、E14.5由来肝細胞初代培養系を用いた実験結果から 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が示唆されている。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。本論文は、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ものである。

まず、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、レトロウイルスベクターを用いて dominant negative 型の STAT3 ( $\Delta$  STAT3) を発現したところ 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  $\Delta$  STAT5 はこれらに何の影響も与えなかった。一方、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。

次に、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 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。次に、AJ の構成因子である E-cadherin、 $\beta$ -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、肝小葉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  $\beta$ -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。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。

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、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 $\Delta$ 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。

以上、本論文はE14.5から出生前後までの肝発生のプロセスにOSMによって活性化される二つのシグナル分子STAT3およびRasが異なる役割を果たすことを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。