

## 論文審査の結果の要旨

氏名 小島 伸彦

本論文は5章からなり、第1章は序論、第2章は方法、第3章はオンコスタチンM(OSM)と高細胞密度培養による胎生肝細胞の多機能的な分化誘導、第4章は OSM と高細胞密度培養による肝細胞分化誘導における転写因子 C/EBP $\alpha$ の役割、そして第5章では総合討論が述べられている。

まず始め(第3章)に、*in vitro*の胎生肝細胞培養系にて未熟な肝細胞が成熟肝臓でみられる機能を発現するかどうか検討した。未熟な胎生肝細胞が IL-6 ファミリーのサイトカインの一つである OSM によって、新生仔肝臓で発現するいくつかの酵素の発現が誘導される *in vitro* の分化系が確立されていたが、この系で、さらに成熟した肝細胞に見られる多機能を発揮するかどうかについて検討を行った。その結果、*in vitro* で分化させた肝細胞はアンモニアの分解、アルブミンの分泌、脂質合成を行うことが分かり、この実験系は多機能を誘導しうる系であることを確認した。また、興味深いことに、サイトカインとそのレセプターによって引き起こされる肝分化が、高い密度で細胞を播種する、高細胞密度培養によっても誘導できるということを発見している。さらには、高細胞密度培養による分化誘導では IL-6 ファミリーのサイトカインが共通に必要なレセプター構成分子の一つである gp130 を必要としないことを、gp130 欠損マウスを用いて証明した。したがって、高細胞密度培養による分化誘導は OSM-gp130 によるシグナル伝達とは全く異なる様式でありながら、分化の到達点は類似していることから、高細胞密度培養により誘導されるシグナル伝達系に興味をもたれる。

3章で OSM と高細胞密度培養によるシグナル伝達系は独立したものであることを示したが、第4章では、これらのシグナル伝達経

路の下流部分においては、いずれも転写因子 C/EBP $\alpha$ を介して遺伝子発現を誘導することを示している。C/EBP $\alpha$ 欠損マウスや、遺伝子の強制発現系を用いた実験では C/EBP $\alpha$ が存在しないときには、両分化誘導シグナルによる肝成熟が抑制され、過剰量の C/EBP $\alpha$ タンパク質が細胞内に存在するときには、OSM や高細胞密度による分化誘導シグナル非依存的に肝分化マーカーの発現が見られた。*in vivo* においても発生の過程で C/EBP $\alpha$ のタンパク質量が増加していくことから、OSM や高細胞密度培養による肝細胞の分化誘導は、C/EBP $\alpha$ のタンパク質量を調節していると予想されたが、ウェスタンブロット法を用いた検討では、C/EBP $\alpha$ のタンパク質量の大きな変化は観察されなかった。しかしながら、C/EBP $\alpha$ が認識するターゲット配列をレポーター遺伝子の上流につないだレポーター遺伝子アッセイを行い、C/EBP $\alpha$ の転写活性の変化を測定したところ、OSM 存在下や高細胞密度培養条件下という、肝分化が誘導される条件において転写活性が上昇することが証明された。したがって、OSM や高細胞密度培養によるシグナルは、タンパク質量を変化させるのではなく、その活性を変化させることで肝分化を誘導している可能性が示唆された。OSM による分化誘導では gp130 の下流に存在する STAT3 の重要性が知られているが、C/EBP $\alpha$ の転写活性上昇にも STAT3 が重要な役割を果たしているというデータも示しており、これまでの報告とも整合性のある内容となっている。このようなサイトカインや高細胞密度培養によって C/EBP $\alpha$ の転写活性が調節されるという事実は、これまでに報告が無く、肝発生の研究分野において重要な報告である。

なお本論文第3章は、木下大成、紙谷聡英、中村康司、中島欽一、田賀哲也、宮島篤との共同研究、第4章は、木下大成、塩尻信義、宮島篤との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。