

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子変異マウス及びメダカを用いた肝発生の解析

氏名 渡辺 智美

【序】

肝臓は、恒常性の維持、食物・毒物の代謝能や肝切除後の再生能など多くの機能を有する器官である。肝発生は、前腸からの肝芽の出芽、増殖、分化、成熟といった段階によって構成されていると考えられている。これまで肝発生の研究はマウスやラットなどの個体あるいは初代培養細胞など解析が盛んであった。近年肝形成不全を有する遺伝子欠損マウスなどが多数作出されており、肝形成に関わる種々の分子の機能が逆遺伝学を用いて次第に明らかにされつつある (図1)。しかしながら、各々の段階を制御している因子やそこに存在する細胞など発生過程における肝臓の研究は、詳細な解析が進んでいないのが現状である。その理由として、肝臓を構成する細胞の長期培養や体内での状態を反映した細胞株の樹立が困難であること、肝臓に特異的なマーカーが限られていることなどが挙げられる。肝発生の研究をさらに発展させるためには、肝発生を評価するための新たなツールや生きたまま肝発生を解析できる実験系の開発が重要である。

メダカをはじめとする魚類は、脊椎動物でありながら遺伝学が容易であることに加え、卵発生で胚が透明であり、胚の外側から肝臓を容易に観察できるので、肝発生を経時的に解析できるなどの利点を有している (図2)。メダカは肝形成に必須の分子機構を明らかにする上で非常に有用な実験系となりうると考えられた。

本研究において、私は肝発生に必須のシグナル伝達系の解明及び肝発生を分子レベルで解析すること

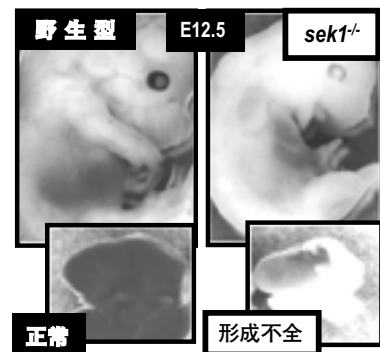


図1 肝形成不全を呈するストレス応答性キナーゼ SEK1 欠損マウス。

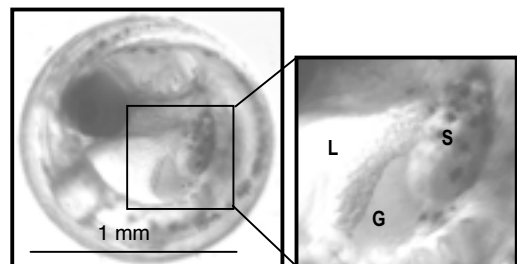


図2 メダカ胚の左側面および肝臓領域
メダカは卵生であるため顕微鏡下で発生を経時的に観察できる。L: 肝臓、S: 脾臓、G: 胆嚢。

を目的として、まずマウス胎児肝を認識するモノクローナル抗体を多数作製し、次にそれらを用いて増殖に導く新規のシグナル経路を見出した。また、ERATO 近藤誘導プロジェクトにおいてメダカを用いたゲノム規模の網羅的な変異体スクリーニングを行い、肝臓形成不全および肝機能不全となる変異体を単離することに成功した。

【方法と結果】

1. 肝芽細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた肝芽細胞増殖シグナルの解析

これまでに私は、マウスにおいて胎児肝を特異的に認識するモノクローナル抗体を多数作製してきた。そのうち抗 Liv2 抗体は、パラフィン切片上においても肝芽細胞を特異的に認識する有用なツールであり、初期胎児肝における肝芽細胞数の追跡が可能となった。この抗体を用いて、肝形成不全を呈するストレス応答性キナーゼ SEK1 欠損マウスにおける肝芽細胞数の減少を見出し、SEK1 を介するシグナル伝達系が肝芽細胞において増殖・生存シグナルとして必須の役割を果たしていることを新たに明らかにした (図3)。

この結果から、肝芽細胞における増殖シグナルのリガンドや受容体、下流の基質や転写因子などの新たな分子の存在が浮かび上がってきたため、遺伝学を用いることが可能であるメダカをツールとして肝発生に必須の遺伝子を網羅的に探索することにした。

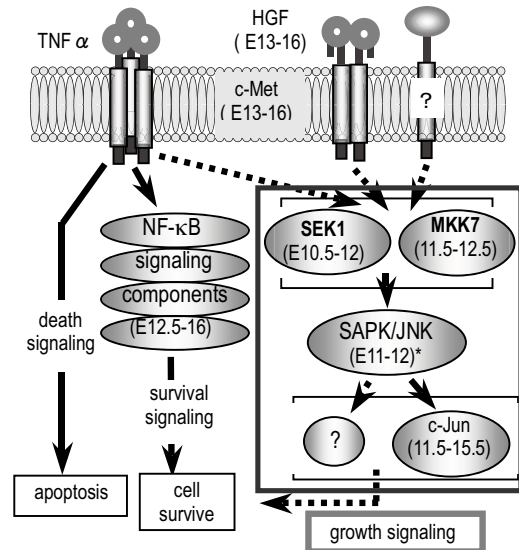


図3 肝芽細胞における生存シグナル
TNF 受容体の下流にはアポトーシス誘導シグナル、NF-κB を介する生存シグナル、SAPK/JNK 系が知られている (灰色の四角で囲った部分)。SAPK/JNK 系が増殖・生存に関与していることが示唆された (波線部)。括弧は各ノックアウトマウスの致死日。

2. 肝臓の形成に異常を伴う変異メダカのスクリーニング

変異原処理を施した雄と野生型の雌を掛け合わせた F3 において肝臓および内胚葉形成に異常のある劣性変異体を探索した (図4)。スクリーニング方法は、形態観察による肝臓の大きさ、形のスクリーニングと蛍光物質を用いた機能面からのスクリーニングの2つを用いた。現在までにメダカ全ゲノムの約 30% をカバーする領域をスクリーニングし、肝臓や胆嚢に異常のある変異体が多数得られた。

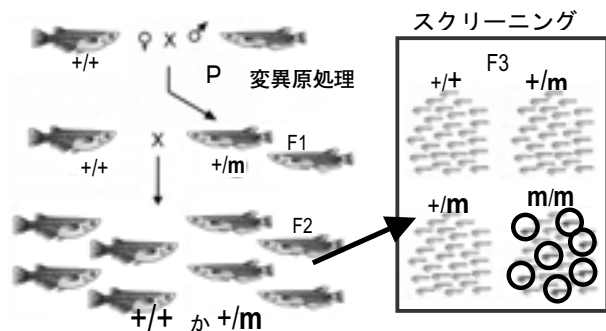


図4 メダカを用いたゲノムスクリーニングの流れ

またこれとは別に、初期発生異常の変異体の

スクリーニングから内胚葉形成に異常のある変異体を多数単離した。各変異体を、1) 肝臓の大きさや形態異常 (グループ1: 4種類)、2) 左右逆位 (グループ2: 3種類)、3) 胆嚢色異常 (グループ3: 3種類)、4) 脂質代謝異常 (グループ4: 3種類)、5) 肝形成の前段階となる内胚葉形成異常 (グループ5: 4種類) に分類した (表1)。

表1 スクリーニングにより得られた肝形成不全変異体一覧

Gene	Alleles	Viability	Phenotypes	Other phenotype
Group1: Mutations affecting morphogenesis of the liver				
<i>kakurembo (kak)</i>	<i>140-3B</i>	Lethal	Liver reduced and ectopic	Ectopic gall bladder, undulated gut
<i>hiohgi (hio)</i>	<i>102-5B</i>	Viable	Liver reduced	Fin missing
<i>origami (ora)</i>	<i>137-1A</i>	Viable	Liver malformed	Undulated gut
<i>kamifusen (kam)</i>	<i>124-4A</i>	Lethal	Liver malformed	Blood stuck near the liver, not well resolved
Group2: Mutations affecting laterality of the liver				
<i>kendama (ken)</i>	<i>103-11C</i>	Viable	Liver and gallbladder inverted	Only liver turns to center, spleen missing
<i>hanetsuki (han)</i>	<i>68-7A</i>	Viable	Liver and gallbladder inverted	Heart is also randomized
<i>dendendaiko (den)</i>	<i>73-11A</i>	Viable	Liver and gallbladder inverted	Inverted
Group3: Mutations affecting bile color				
<i>akane (aka)</i>	<i>140-8A</i>	Lethal	Deep red gallbladder	No colored red blood cells
<i>suou (suo)</i>	<i>98-5A</i>	Viable	Light red gallbladder	Blood cells are weakly red
<i>ominaeshi (omi)</i>	<i>24-13E</i>	Lethal	White gallbladder	No colored red blood cells
Group4: Mutations affecting lipid metabolism				
<i>ukon (uko)</i>	<i>152-8A</i>	Viable	PED6 not metabolized	After hatched, edemetic
<i>aonibi (aon)</i>	<i>60-3B</i>	Lethal	PED6 not metabolized	Telencepharon reduced Degeneration, circulation affect
<i>uguisucha (ugu)</i>	<i>153-9A</i>	Lethal	PED6 not metabolized	Retarded
Group5: Mutations affecting endoderm formation				
<i>akatsuki (aku)</i>	<i>22-15A</i>	Lethal	Missing foxA3 expression	Similar to zebrafish oep mutation
<i>akebono (ake)</i>	<i>54-7A</i>	Lethal	Missing foxA3 expression	Similar to zebrafish oep mutation
<i>mochizuki (moc)</i>	<i>96-11B</i>	Lethal	Missing foxA3 expression	Similar to zebrafish oep mutation
<i>sakura (sak)</i>	<i>r10-4A</i>	Lethal	Hepatic bud missing	Heart and eyes are reduced
<i>hirame (hir)</i>	<i>54-20C</i>	Lethal	Endoderm convergence affect	Flat embryo
<i>fukuwarai (fku)</i>	<i>8-33A</i>	Lethal	Hepatic bud missing	Cell alignment affected

2-1. 肝臓の大きさに異常のある変異体 *kakurembo (kak)*

グループ1には、肝臓の減少や腸管の形態異常などの変異体が含まれる。中でも *kak* は野生型に比較して肝臓が著しく減少し、胆嚢の位置が前側に移動していた (図5)。さらに、肝芽の出現時期において初期肝マーカーである *gata6* をプローブとした wholemount *in situ* hybridization を試みた結果、野生型と同様に肝芽が認められたことから、*kak* 遺伝子は肝芽の出現ではなくその後の肝臓の増殖に関与することが示唆された。

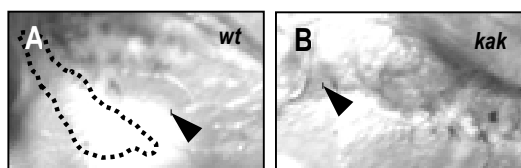


図5 肝臓形態異常変異体 *kakurembo*
kak 変異体において、肝臓の減少と胆嚢の位置異常が認められた。A: 野生型、B: *kak* 変異体。矢頭は胆嚢、波線部は肝臓の輪郭。

2-2. 肝臓が左右逆位の変異体 *kendama (ken)*

メダカにおいて肝臓は胚の左側に位置し、左右非対称の臓器である。左右逆位変異体 *kendama (ken)* において心臓が正常位であるにもかかわらず、肝臓のみが真ん中に位置するものが得られた。残りの2つの変異体において心臓と肝臓は同時に逆位になっており、これら変異体から肝臓の左右決定は体全体の左右軸に加えて肝臓独自に行われる可能性が考えられた。

2-3. 胆嚢色異常の変異体

メダカの胆嚢は、発生後期になると胆汁色素の蓄積から淡緑色を呈する。胆嚢色異常変異体の *suou (suo)* は胆嚢が橙色に呈色していた。*akane (aka)* は胆嚢が赤に呈色し、*ominaeshi (omi)* は無色であるが、そのことに加え野生型において赤く観察される血球が透明であった。各変異体をヘモグロビン染色した結果、*aka, omi* では血球および胆嚢においてヘモグロビン陰性であったが、*suou* は染色パターンが野生型に比較して弱いものの陽性であった。肝臓においてヘモグロビンや胆汁の前駆体が合成されているという知見もあり、これらの結果から、胆嚢色の異常は血球の蓄積ではなく、胆汁形成の異常である可能性が示唆された。

2-4. 脂質代謝異常の変異体

ホスホリパーゼ A2 により切断されて胆嚢に蓄積する蛍光色素、PED6 をメダカ胚の飼育溶液に加えて暗所にて飼育した結果、形態形成は正常であるにもかかわらず胆嚢の蛍光が認められな

い *uguisucha* (*ugu*) など3種類の変異体を得られた。これらの変異体は、脂質代謝経路あるいは胆汁輸送に異常があると考えられた。

2-5. 内胚葉形成異常の変異体

初期発生異常の変異体の中から内胚葉形成に異常のある変異体に対し、*foxA3* をプローブとした *in situ* hybridization を用いて検討した結果、*foxA3* 発現に異常の認められた変異体を6種類単離した。これら変異体のうち、*akatsuki* (*aku*)などは内胚葉形成から、*sakura* (*sak*)や *hirame* (*hir*)、*fukuwarai* (*fku*) は肝芽形成に異常を来していると考えられた。

【まとめ】

本研究において、マウス胎児肝特異的なモノクローナル抗体を多数作製し、その中でも肝芽細胞特異的な抗 *Liv2* 抗体を用いて肝芽細胞の増殖シグナルの一端を明らかにした。さらに、メダカを用いたゲノム規模のスクリーニングから肝臓の形態形成変異体や代謝異常変異体を単離した (図6)。これら変異体は、肝発生の様々な段階に異常を来していることから、この変異体を解析することにより、肝発生をその出芽から機能まで広く解明することが可能となると考えられる。今回得られた変異体の中には、貧血や黄疸のような人の疾患と類似の表現型を示すものもあり、モデル生物としての利用が期待される。肝臓の発生過程は脊椎動物全般に共通していると考えられ、ノックアウトマウスを用いた個々の現象の解明に加えて、メダカを用いて新たに網羅的な解析をすることで、最終的に肝発生という組織構築の現象を概念的にまたより詳細に解明することが可能となるという点において、本研究は非常に意義があると考えられる。

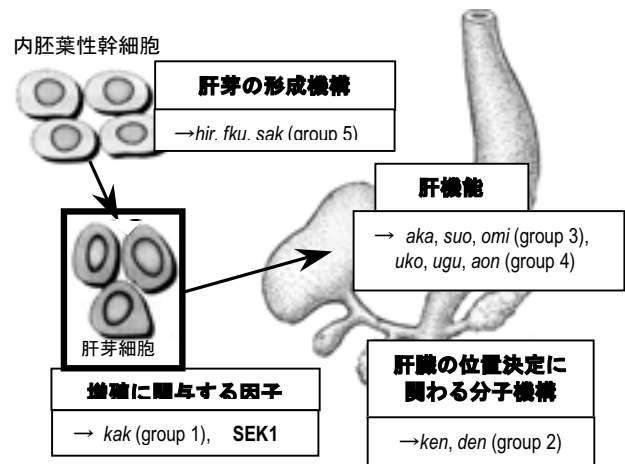


図6 変異体から明らかにされうる肝発生の機構

今回のメダカを用いたスクリーニングにより、ノックアウトマウスにより明らかになった分子機構に加えて肝発生に関わる様々な機構を明らかにする可能性のある変異体が多数得られた。

【謝辞】メダカのスクリーニングに際し、ERATO 近藤誘導分化プロジェクトの古谷—清木誠博士、近藤寿人大阪大学教授に感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Watanabe, T., et al. *Dev. Biol.*, **250**, 332-347 (2002)
- 2) Nishina, H., Watanabe, T., et al. *Stem Cell and Liver Regeneration*, pp. 1-14, Springer-Verlag Tokyo, Inc., Tokyo (2004)
- 3) Watanabe, T., et al. *Mech. Dev.* Medaka issue. (2004)