

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 智美

肝臓は、恒常性の維持、食物・毒物の代謝や肝切除後の再生など、多くの機能を有する器官である。肝発生の研究は、哺乳動物の個体あるいは初代培養細胞などを用いた解析が盛んであり、肝形成不全を有する遺伝子欠損マウスなどから、肝形成に関わる種々の分子の機能が次第に明らかにされつつある。しかしながら、肝臓を構成する細胞の長期培養や細胞株の樹立が困難であること、また肝臓に特異的なマーカーが限られていることなどから、発生過程における肝臓の研究は未解明な部分が多く、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望まれている。「遺伝子変異マウス及びメダカを用いた肝発生機構の解析」と題した本論文では、まずマウス胎児肝を認識する新規のモノクローナル抗体を多数作製し、それらを用いて増殖に導く新たなシグナル経路を見出している。また、脊椎動物でありながら遺伝学や発生学の適用が容易であるメダカを用いて、肝臓形成不全および肝機能不全となる多種の変異体を単離することに成功している。

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

本論文では、先ず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新規に多数作製している。中でも抗 Liv2 と命名された抗体は、パラフィン切片上において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を初めて可能にした。この抗体を用いて、肝形成が不全となるストレス応答性キナーゼ SEK1 欠損マウスには肝芽細胞数が減少することを見出し、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すことを新たに明らかにした。さらに、SEK1 を介するシグナル伝達系の上流に位置すると考えられる TNF 受容体 1 と SEK1 の両遺伝子欠損マウスを解析し、肝芽細胞において SEK1 を介するシグナル伝達系が細胞の生死に関わる TNF 受容体 1 下流の NF- κ B 系とは独立に機能し、細胞増殖に必須の役割を果たす可能性を見出している。また、以上の結果と遺伝子欠損マウスを用いたこれまでの知見に基づいて、肝芽細胞の増殖シグナルに関連する新たな分子の存在を提唱している。

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

次に、変異原を処理したメダカを用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。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、また初期発生異常を指標に内胚葉形成に異常のある変異体が多数単離された。各変異体は、肝臓の減少や腸管の形態異常などを含む形態異常群（グループ 1：4 種類）、肝臓の位置異常を含む左右逆位群（グループ 2：3 種類）、胆嚢色異常群（グループ 3：3 種類）、脂質代謝異常群（グループ 4：3 種類）、及び肝形成の前段階となる内胚葉形成異常群（グループ 5：6 種類）に分類された。各変異体の表現型をさらに解析した結果、まずグループ 1 の *kakurembo* においては、肝臓の増殖が低下している可能性を見出し、グループ 2 の左右逆位変異体群からは、肝臓の左右決定が体全体の左右軸に加えて独自に行われる可能性を見出した。またグループ 3 の胆嚢色異常変異体では、ヘモグロビン染色の結果から、そ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。グループ 4 はホスホリパーゼ A2 により切断されて胆嚢に蓄積する蛍光色素を用いた機能的解析から、形態形成は正常であるにもかかわらず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。グループ 5 の内胚葉形成に異常のある変異体 6 種類に対しては、初期内胚葉マーカーを指標に解析を進め、内胚葉形成から異常が認められるものと肝芽形成以降に異常があるものを含むことが見出された。

以上を要するに、本論文ではマウス胎児肝を特異的に認識する新規モノクローナル抗体を多数作製し、その中でも肝芽細胞に特異的な抗 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ている。さらに、メダカを用いたゲノム規模のスクリーニングを進め、肝臓の形態形成変異体や代謝異常変異体を多数単離している。肝発生の過程は脊椎動物全般に共通していると考えられるが、単離されたメダカの変異体は、肝発生の様々な段階に異常をもつものを含んでおり、肝発生を初期の出芽段階から幅広い機能的な側面まで解析することを可能としている。これらの研究成果は、今後の肝発生の分子機構を解明する上で重要な手がかりを与えており、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと判断される。