

論文内容の要旨

肝細胞素形成・肝発生における低分子量 GTP 結合タンパク質 ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) の機能

鈴木 輝彦

低分子量 GTP 結合タンパク質(Small G タンパク質)スーパーファミリーに属するタンパク質はこれまでに 100 種以上発見されており、配列の相同性から Ras、Rho、Rab、Ran、ADP-ribosylation factor (ARF) の 5 つのファミリーに分類されている。ARF には 6 つのアイソフォーム (ARF1-6) が存在し、それらは配列の相同性からクラス I (ARF1-3)、クラス II (ARF4、5)、クラス III (ARF6) の 3 つのクラスに分類されている。ARF6 はクラス III に分類される唯一の ARF アイソフォームであることから、他の ARF アイソフォームとは異なる特異的な生理機能を有していると考えられている。実際、クラス I、クラス II に分類される ARF1-5 は主にゴルジ嚢間またはゴルジ体-小胞体間の小胞輸送に関与していることが報告されているのに対して、ARF6 は細胞膜における小胞輸送やアクチン細胞骨格の制御において極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、これまでに得られている知見は培養細胞などを用いた実験から得られたものであり、個体内で起きる様々な生命現象に ARF6 がどのように関与するのかについては全く明らかになっていない。そこで本研究では *ARF6* ホモ欠損マウスを作製し、個体における ARF6 の生理機能について解析を行った。

[結果と考察]

1. *ARF6*^{-/-} 胎児マウスでは肝形成異常が観察される

ARF6^{-/-} 胎児マウスは発生中期から出生前後でほとんどの個体が致死となることが分かった。そこで *ARF6* の欠損によって引き起こされる胎児期の異常について解析したところ、胎生 13.5 日令

(E13.5) $ARF6^{-/-}$ 胎児の肝臓は $ARF6^{+/+}$ または $ARF6^{+/-}$ 胎児の肝臓と比較して顕著に小さく、形態的にも異常であることが明らかとなった (図 1a-c)。また *In situ* hybridization 法により $ARF6$ の発現を確認したところ、 $ARF6$ は肝臓において高い発現を示すことが明らかとなった (図 1d)。さらに $ARF6^{-/-}$ 胎児の肝臓

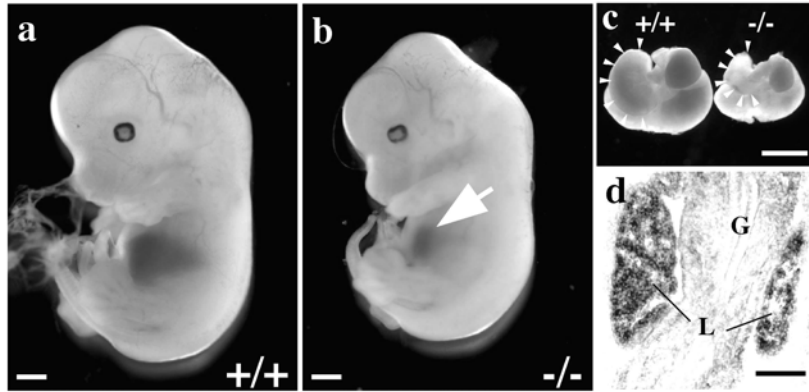


図1 a-c, $ARF6^{-/-}$ 胎児では野生型と比較して肝臓のサイズが小さく (b, 白矢印)、形態が異常になっていることが明らかとなった (c, 白矢頭)。Scale bars, 1 mm. d, *in situ* hybridizationにより $ARF6$ の発現を調べたところ、 $ARF6$ は肝臓において高い発現が認められた。L, liver; G, gut. Scale bars, 100 μ m.

をヘマトキシリン-エオシン染色したところ、 $ARF6^{-/-}$ 胎児の肝臓では組織がスポンジ様の構造を呈し細胞密度が減少しており、特に肝臓辺縁部でその傾向が顕著であった。これらの結果から $ARF6$ は肝臓の発生・形成に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

2. $ARF6^{-/-}$ 胎児マウス肝臓ではアポトーシスが亢進している

E13.5 $ARF6^{-/-}$ 胎児でこのように肝臓が小さくなり細胞密度が低下する原因として以下の 3 つの可能性が考えられる。すなわち、(1) 増殖能力の低下、(2) 造血器官として機能する胎児期の肝臓への造血系細胞の定着異常、(3) アポトーシスの亢進である。解析の結果、(1)、(2) については $ARF6^{-/-}$ 胎児肝臓において異常が見られなかったが、TUNEL 染色によりアポトーシスの亢進について解析したところ、 $ARF6^{-/-}$ 胎児肝臓では TUNEL 陽性細胞が顕著に増加しており、アポトーシスが亢進していることが明らかとなった。そこで、肝臓を構成するどの細胞種が $ARF6^{-/-}$ 胎児の肝臓でアポトーシスを起こしているのかを解析したところ、アポトーシスは胎児肝細胞、赤芽球系細胞のいずれでも起きており、細胞種に特異性はないことが明らかとなった。これらの結果から $ARF6^{-/-}$ 胎児の肝臓が小さくなり細胞密度が減少したのは肝臓の細胞が細胞種非特異的にアポトーシスを起こしたためであると考えられる。しかしながら、このような *in vivo* の解析結果に反して、*in vitro* で培養した $ARF6^{-/-}$ 胎児肝細胞および造血系細胞ではアポトーシスの亢進は観察されなかった。また、肝発生初期の E10.0 $ARF6^{-/-}$ 胎児では *in vivo* においても肝臓でアポトーシスの亢進は見られなかった。これらの結果から、肝臓におけるアポトーシスの亢進は $ARF6$ の欠損による一次的な異常ではなく、アポトーシスに先行して $ARF6^{-/-}$ 胎児肝臓内の微小環境に異常が生じた結果、誘起された二次的な異常であると考えられる。

3. $ARF6^{-/-}$ 胎児マウスでは肝細胞索の形成異常が観察される

肝臓におけるアポトーシスに先行する一次的な異常を特定するため、私は発生の各段階の $ARF6^{-/-}$ 胎児肝臓について解析を行った。 $ARF6^{-/-}$ 胎児の肝臓を肝細胞マーカーであるアルブミンまたは早期胎児肝細胞マーカーである Liv2 に対する抗体で免疫組織染色したところ、興味深いことに $ARF6^{-/-}$ 胎児では肝細胞索の形成に異常がみられることが明らかとなった (図 2)。野生型胎児では肝細胞索が分岐・吻合しながら遠部までよく伸長していたのに対し、 $ARF6^{-/-}$ 胎児では肝細胞索の分岐・吻合や伸長が不全で、肝細胞が塊状に存在するものが多く観察された。このような肝細胞索の形態異常は肝臓に

おけるアポトーシスの亢進がまだ観察されない発生段階 (E10.0) でも観察された。しかし、E9.0 の *ARF6*^{-/-} 胎児では野生型胎児と同様に肝憩室において肝細胞が分化してきていたことから、肝細胞の分化は正常に起きていると考えられる。これらの結果から、*ARF6* の欠損によって引き起こされる最初の異常は肝細胞索形成の異常である可能性が考えられる。

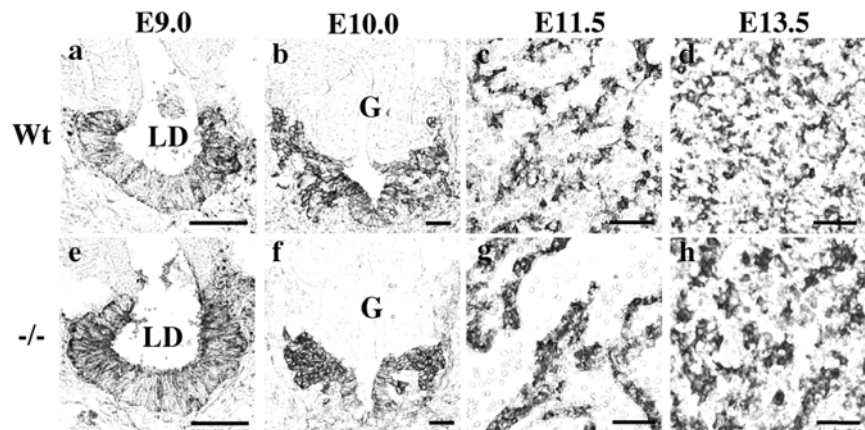


図2 各胎児期における肝領域を抗Liv2 (肝芽細胞マーカー) (a, b, e, f)、または抗albumin (肝細胞マーカー) (c, d, g, h)抗体で染色した。a, e, E9.0では野生型、*ARF6*^{-/-}胎児共に前腸腹壁において肝芽細胞への分化が起きていた。b-d, f-h, 発生が進むに従って野生型胎児では細かい網目状に肝細胞索が伸長するのに対して*ARF6*^{-/-}胎児では肝細胞索の伸長が減弱していた。LD, liver diverticulum; G, gut. Scale bars, 50 μm.

4. *ARF6* は HGF 依存的肝細胞索様構造の形成に重要な役割を果たしている

上述のような *ARF6*^{-/-} 胎児マウスでみられる肝形成異常は、*HGF* ノックアウトマウスで認められる肝臓の矮小化、構造異常、胎児肝細胞の形態異常といった表現型とよく一致する。またこれまでの報告から MDCK 細胞において *ARF6* は HGF 刺激により活性化され、HGF 刺激依存的な細胞分散を制御していることが知られていることから、*ARF6*^{-/-} 胎児でみられる肝臓形成異常は *ARF6* が欠損することで HGF シグナル伝達に破綻をきたしたことに起因する可能性が考えられる。そこでまず胎児肝細胞における HGF 依存的な *ARF6* の活性化について検討したところ、*ARF6* は胎児肝細胞においても HGF 依存的に活性化されることがわかった。次に、コラーゲンゲル中で培養した胎児肝細胞の HGF 依存的な肝細胞索様構造形成能について解析を行った (図 3a)。これまでに報告されているように、野生型胎児肝細胞のコロニーは HGF 依存的に伸長した形態を呈し、肝細胞索様構造を形成したが、*ARF6*^{-/-} 胎児肝細胞のコロニーでは HGF 依存的な肝細胞索様構造の形成能が低下していた。胎児肝細胞による HGF 依存的な

肝細胞索様構造の形成には、HGF 依存的なコロニー形態の伸長が寄与していると考えられる。そこで私は HGF 刺激によって伸長した形態を示した肝細胞コロニーの割合について解析した (図 3b)。その結果、

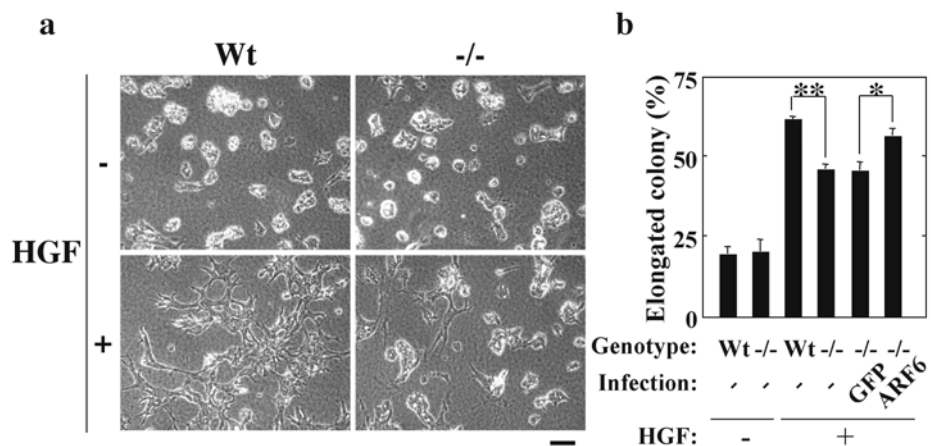


図3 a, 図10と同様の方法で野生型および*ARF6*^{-/-}胎児から調製した肝細胞をHGF存在下、非存在下で培養した。野生型と比較して*ARF6*^{-/-}肝細胞は索様構造の形成が減弱していた。Scale bar, 100 μm. b, *ARF6*^{-/-}肝細胞に*ARF6*を強制発現するとHGF依存的な肝細胞索様構造形成が回復した。***P*<0.005, **P*<0.05.

HGF 存在下で伸長した形態を示すコロニーの割合は野生型胎児肝細胞に対して、*ARF6*^{-/-}胎児肝細胞では有意に減少していた。また、*ARF6*^{-/-}胎児肝細胞に ARF6 を強制発現させると、HGF 存在下で伸長した形態を示すコロニーの割合が回復した。これらの結果から、ARF6 は HGF シグナルの下流因子として肝細胞索様構造の形成を制御していると考えられる。

【まとめ】

ARF6^{-/-}胎児では肝発生の異常が観察され、肝臓が矮小化し細胞密度が低下していた。*ARF6*^{-/-}胎児の肝臓ではアポトーシスが亢進していたことから、これが肝臓の矮小化や細胞密度の低下を惹起したと考えられるが、*in vitro* 培養実験の結果などからアポトーシスの亢進は *ARF6* の欠損による一次的な異常ではないと考えられる。*ARF6*^{-/-}胎児肝臓ではアポトーシスが亢進するよりも早期から肝細胞索の形成が不全となっており、またコラーゲンゲル内培養した *ARF6*^{-/-}胎児肝細胞では HGF 依存的な肝細胞索様構造の形成能が低下していたことから、*ARF6*^{-/-}胎児の肝発生異常は肝細胞索の形成異常に起因すると考えられる。*ARF6*^{-/-}胎児肝臓で観察されたアポトーシスの亢進は、肝細胞索の形成異常により肝臓内に適切な微小環境が形成されないために誘起された二次的な異常である可能性が考えられる。