

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 輝彦

低分子量 GTP 結合タンパク質の ADP-ribosylation factor (ARF)ファミリーには 6 つのアイソフォーム (ARF1-6) が存在し、それらはアミノ酸配列の相同性からクラス I (ARF1-3)、II (ARF4、5)、III (ARF6) の 3 つに分類される。ARF6 はクラス III に分類される唯一のメンバーであることから、他のアイソフォームとは異なる特異的な生理機能を有すると考えられる。実際、クラス I、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するが、ARF6 はエンドサイトーシスやアクチン細胞骨格の再編成において極めて重要な役割を果たしていることが細胞レベルで明らかにされつつある。しかしながら、ARF6 が個体内での様々な生命現象にどのように関与するのかについては全く明らかにされていない。「肝細胞索形成・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」と題する本論文では、ARF6 ホモ欠損マウスを作出し、ARF6 が肝細胞索の形成を制御していることを示すと共に、肝臓の発生における ARF6 の重要性を明らかにしている。

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。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、胎生 13.5 日令 (E13.5) *ARF6*^{-/-}胎児の肝臓は *ARF6*^{+/+}または *ARF6*^{+/-}と比較して顕著に小さく、形態的にも異常であることを明らかにした。また *in situ* hybridization 法により個体における ARF6 の発現を解析し、ARF6 は肝臓において高い発現を示すことを見出した。*ARF6*^{-/-}胎児の肝臓では、組織がスポンジ様の構造を呈し、さらに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 の *ARF6*^{-/-}胎児で肝形成が異常となる原因として、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、という 3 つの可能性が考えられた。1)、2) については、諸種の解析から *ARF6*^{-/-}胎児肝臓において異常を認めなかったが、3) について TUNEL 染色した結果、*ARF6*^{-/-}胎児肝臓ではアポトーシスが亢進していることを見出した。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。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*^{-/-}胎児の肝臓は細胞種非特異的にアポトーシスが亢進していると考えられた。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、肝発生初期にあたる E10.0 の *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た。

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に、発生の各段階の *ARF6*^{-/-}胎児肝臓について解析を進め、*ARF6*^{-/-}胎児では肝細胞索の形成に異常があることを見出した。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の早い段階 (E10.0) でも観察された。しかしながら、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の分化が認められたことから、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、肝細胞索の形成異常にあると考えられた。

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

ARF6^{-/-}胎児マウスで見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構造異常や細胞の形態異常といった表現型とよく一致する。また、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するというこれまでの報告から、*ARF6*^{-/-}胎児の肝形成異常は、*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た。そこで、まず胎児肝細胞において HGF による *ARF6* の活性化について検討した結果、*ARF6* は胎児肝細胞においても HGF により活性化された。次に、コラーゲングル中で培養した胎児肝細胞の HGF による肝細胞索様構造形成能について解析を行った。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索様構造の形成能が低下していた。また、HGF 刺激によって伸長する肝細胞コロニーの割合も、*ARF6*^{-/-}胎児肝細胞では野生型胎児肝細胞に比べて有意に減少していた。さらに、*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た。

本研究は、*ARF6* が肝細胞索の形成制御を介して肝臓の発生に関与することを明らかにしている。*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 *ARF6*^{-/-}胎児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の亢進以前に肝細胞索の形成が不全となっており、また培養 *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と考えられる。これらの研究成果は個体における *ARF6* の機能を初めて明らかにしたものであり、*ARF6* が肝細胞索形成を制御するという知見は、ガンの浸潤や転移など細胞運動を伴う類似した現象への *ARF6* の関与を示唆し、今後の研究の進展にも有用な知見を提供している。以上を要するに、本論文は博士 (薬学) の学位として十分な価値があるものと認められる。