

## 論文内容の要旨

論文題目 胎児肝臓におけるヘッジホッグシグナル  
の機能解析  
(Functional analysis of Hedgehog  
signaling in the fetal liver)

氏名 廣瀬 恵一

肝臓は生体における最大の臓器であり、代謝、血清タンパク産生、解毒作用、など様々な機能を有しており、生命の恒常性の維持に必須の臓器である。肝臓は、これら多彩な肝機能の中心である肝実質細胞と胆管上皮細胞、肝星細胞、類洞内皮細胞、肝中皮細胞などの非実質細胞から構成される。肝臓の上皮系細胞である肝細胞と胆管上皮細胞は、共通の前駆細胞である肝芽細胞より分化することが知られている。

ヘッジホッグは、キイロショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングにより同定された、発生段階における重要なモルフォゲンの一つであり、胎児の神経や四肢の発生などを含め、各種細胞の増殖・分化や組織の形態形成に関わっている。胎児におけるヘッジホッグシグナルの異常は、全前脳胞症、Gorlin 症候群、Pallister-Hall 症候群、VACTERL 症候群などの先天性異常に関与していることが報告されている。一方、成体におけるヘッジホッグシグナルの異常な活性化は、髄芽細胞腫、基底細胞腫、横紋筋肉腫など多くの腫瘍の発生及び増殖に関与していることが報告され、肝臓においても肝細胞癌、胆管癌、肝芽腫などの腫瘍形成に関与していることが報告されている。

成体肝臓では、病理学的な解析から様々な病的状態におけるヘッジホッグシグナルの関与が指摘されており、肝障害時における肝星細胞、胆管上皮細胞及び繊維芽細胞

の増殖や胆管上皮細胞のケモカイン産生に関与していることが示されている。マウスの胎児肝臓においては、肝憩室が形成される時期である胎齢 8.5 日の腹側前腸内胚葉にヘッジホッグリガンドの一つである Shh (Sonic Hedgehog) の広範囲な発現が確認されるが、胎齢 9.0-9.5 日の肝芽原基においてはその発現は消失している。肝臓の発生が異常になる遺伝子改変マウスである Hex ノックアウトマウスでは、肝芽において消失しているはずの Shh の異所的発現が見られることから、肝芽の出芽時期における Shh の発現消失の重要性が指摘されている。一方、ヘッジホッグシグナルのターゲット遺伝子である Ptc1 (Patched1) の発現が胎齢 11.5 日の肝臓において確認されており、この時期にヘッジホッグシグナルが活性化される可能性が示唆された。しかしながら、肝臓の発生分化におけるヘッジホッグシグナルの機能は不明であった。そこで本研究では、胎児肝臓の器官形成におけるヘッジホッグシグナルの機能解析を行った。

胎齢 11.5~生後 8 週齢の各発生段階のマウスより肝臓を摘出し、ヘッジホッグシグナルの活性化を、ターゲット遺伝子である Gli1 の発現を指標として解析したところ、胎齢 11.5 日の胎児肝臓において Gli1 の発現が確認されたが、その発現は発生が進行するにつれて減少した。また、Shh の発現も同様に胎齢 11.5 日の胎児肝臓においては確認されたが、発生の進行に伴い減少した。しかし、リガンドの一つである Ihh (Indian Hedgehog) の発現は、Gli1 及び Shh の発現とは逆に胎生後期に向けて上昇し、出生後は劇的に減少していた。Ihh は障害時の成体肝臓において胆管の周辺に発現が確認されていることから、胎児肝臓においても胆管形成に関与している可能性が考えられるが、肝臓全体では胆管上皮細胞の割合は低いために Gli1 の発現上昇は見られなかったものと考えられる。また、ヘッジホッグシグナルは胎児造血での役割も報告されているため、肝芽細胞及びその他の細胞群を MACS (magnetic cell sorter) により分取し解析したところ、各胎齢での Gli1 の発現は主に肝芽細胞で確認された。さらに詳細な解析を行うため、胎齢 11.5 日の胎児肝臓における各種細胞群を FACS (Fluorescence-activated cell sorter) により分取し Gli1 の発現を確認したところ、肝芽細胞、肝星細胞前駆細胞、肝中皮前駆細胞において Gli1 の発現が確認され、Shh の発現は肝芽細胞において確認された。また、胎齢 11.5 日の胎児肝臓を用いた免疫染色においても、肝芽細胞における Gli1 の発現が確認された。これらの結果から、胎齢 11.5 日の胎児肝臓ではオートクラインによる肝芽細胞でのヘッジホッグシグナルの活性化と、パラクラインによる肝星細胞前駆細胞、肝中皮前駆細胞での活性化が示唆された。

肝芽細胞および肝星細胞の増殖におけるヘッジホッグシグナルの役割を、胎齢 11.5 日の肝臓より肝芽細胞および肝星細胞を分取し、培養系により評価した。肝芽細胞及び肝星細胞前駆細胞は、ヘッジホッグシグナルの活性化により増殖が亢進した。また、ヘッジホッグシグナルの活性化によりカスパーゼ 3 及び 7 の活性も低下しておりアポトーシスの抑

制も示唆された。次に、肝芽細胞の増殖能をコロニー形成能により評価した結果、多数の細胞より構成される大きいコロニーの数及び総細胞数がヘッジホッグシグナルの活性化により有意に増加していた。そしてこれらの効果は、ヘッジホッグシグナルの阻害剤である Cyclopamine の添加により消失した。よって、ヘッジホッグシグナルはアポトーシスを抑制することで胎齢 11.5 日の肝芽細胞及び肝星細胞前駆細胞の増殖を促進することが示された。一方、胎齢 14.5 日の肝芽細胞はヘッジホッグによる細胞増殖促進効果が確認できなかったことから、胎児肝臓では各発生段階においてヘッジホッグシグナルに対する応答性が変化することが示唆された。

肝芽細胞は *in vitro* の培養系において肝実質細胞への分化誘導が可能であることから、ヘッジホッグシグナルによる肝実質細胞分化への影響も解析した。胎齢 11.5 日及び 14.5 日の肝臓より肝芽細胞を分取し培養したところ、両胎齢の肝芽細胞はヘッジホッグシグナルの活性化により肝実質細胞マーカー遺伝子の発現が有意に低下した。また、遺伝子発現だけではなく、肝実質細胞の重要な機能の一つであるアンモニア代謝能の発現もヘッジホッグシグナルの活性化により低下していた。そしてそれらの効果もまた Cyclopamine の添加により消失したことから、ヘッジホッグシグナルは肝芽細胞の肝実質細胞への分化を抑制していることが示唆された。

次に *in vitro* の結果を *in vivo* で確認するため、妊娠マウスにヘッジホッグシグナルの活性化薬剤である Purmorphamine を胎齢 11.5 日から 16.5 日にかけて連続投与し、胎齢 17.5 日の胎児肝臓においてその効果を解析した。Purmorphamine の投与により Gli1 の発現が上昇したことから、胎児肝臓におけるヘッジホッグシグナルの活性化が確認され、*in vitro* の結果と一致して、ヘッジホッグシグナルの活性化により肝実質細胞のマーカー遺伝子の発現が減少していることが確認された。

以上の結果より、ヘッジホッグシグナルは胎齢 11.5 日前後において一時的に活性化されて肝芽細胞や肝星細胞前駆細胞の増殖を促進するが、その後の発生段階においては減弱することにより肝実質細胞の分化を促す機構の存在が明らかになった。本研究はヘッジホッグシグナルの肝芽細胞および肝星細胞の増殖分化における作用を明らかにすることで肝臓の発生・分化機構の一端を明らかにした。