

論文審査の結果の要旨

氏名 廣瀬 恵一

本論文は6つの章からなる。第一章での序論に続き、第二章では材料と方法、第三章から第五章までは研究結果が、第六章では結論が記述されている。

ヘッジホッグシグナルは胎児における四肢や神経などの器官形成に重要なシグナル経路であり、シグナル系の異常は胎生致死を含む様々な器官形成不全を引き起こすことが知られている。マウスにおける肝臓の発生は、胎齢8日前後に前腸内胚葉より肝臓の細胞が分化することで開始され、その時期の前腸内胚葉においてはヘッジホッグシグナルのリガンドである **Sonic Hedgehog (Shh)** が発現していることが報告されている。また、分化後の肝芽においてはその発現が消失するが、胎齢11.5日前後の胎児肝臓においてはノックインマウスの解析によりヘッジホッグシグナルの活性化が示唆されている。しかしながら、その後の発生段階における解析はいまだ報告がなされていない。そこで、第三章では11.5日以降のヘッジホッグシグナルの活性化及びその機能についての解析を行った。各発生段階の胎児肝臓における遺伝子発現を解析した結果、胎齢11.5日前後ではヘッジホッグシグナルの活性化が確認されたが、発生が進むにつれて活性化が減少していくことが確認された。また、ヘッジホッグシグナルの活性化は、肝星細胞前駆細胞、肝中皮前駆細胞および肝臓における胎児組織幹細胞である肝芽細胞において確認され、**Shh** の発現は肝芽細胞で確認された。そして、免疫染色によって、ヘッジホッグシグナルの細胞増殖への関与も示唆された。

第四章では、肝芽細胞におけるヘッジホッグシグナルの機能解析について述べている。最初に、第三章で示唆されたヘッジホッグシグナルと細胞増殖との関連について解析し、肝芽細胞の培養系においてヘッジホッグシグナルを活性化させることにより、肝芽細胞の細胞増殖が亢進されることを明らかにした。また、ヘッジホッグシグナルの活性化によりカスパーゼ活性が阻害されたことから、アポトーシスの抑制により細胞増殖の促進を行っていることが考えられた。さらに、コロニー形成能の解析により、多数の細胞よりなるコロニーの出現頻度がヘッジホッグシグナルの活性化により増加したことから、肝芽細胞の未分化性の維持に関与している可能性も示唆された。肝芽細胞は、培養系において成体肝臓の主要

な代謝能を担っている肝実質細胞へと分化できるため、次にヘッジホッグシグナルの肝実質細胞分化への影響を解析した。その結果、ヘッジホッグシグナルの活性化により、肝実質細胞の分化マーカー遺伝子の発現及びアンモニア代謝能の獲得が阻害されており、肝実質細胞への分化が抑制されていることが明らかになった。培養系において得られた肝実質細胞への分化抑制効果を *in vivo* で解析するため、妊娠マウスの母体にヘッジホッグシグナルの活性化薬剤を投与し、胎児肝臓におけるヘッジホッグシグナルの活性化を試みた。胎齢 17.5 日に胎児を摘出し、胎児肝臓を解析したところ、薬剤投与によるヘッジホッグシグナルの活性化が確認されると共に、肝実質細胞の分化マーカー遺伝子の発現抑制が確認された。これらのことからヘッジホッグシグナルは胎児肝臓において、細胞増殖を亢進すると共に、肝実質細胞への分化を抑制しているものと考えられた。

第五章では、肝星細胞前駆細胞におけるヘッジホッグシグナルの機能解析について述べている。肝星細胞は肝臓において、脂肪の蓄積などを行うと共に、障害時には活性化して各種のシグナル分子や細胞外基質を産生する細胞であり、肝線維化の中心的な細胞である。肝星細胞前駆細胞の培養系において、ヘッジホッグシグナルを活性化させると、肝芽細胞と同様に細胞増殖が亢進し、カスパーゼ活性の抑制が観察された。また、肝星細胞の分化マーカー遺伝子の発現に変化は無かったが、活性化マーカー遺伝子の発現はヘッジホッグシグナルの阻害剤により抑制されたことから、ヘッジホッグシグナルは肝星細胞前駆細胞の活性化の制御も行いうることが示唆された。これらの結果により、胎児肝臓においてヘッジホッグシグナルは、胎齢 11.5 日前後において肝芽細胞及び肝星細胞前駆細胞の細胞増殖を亢進させるために一時的に活性化するが、その後の正常な肝臓の分化成熟のために活性化の減少が起こっているという生体内での機構の存在が明らかになった。ヘッジホッグシグナルも胎児肝臓の形態形成を担っているシグナル系の一員であることが示され、肝発生の機構の一端が解明されたという意味において本研究は非常に意義深いものである。

なお、本論文は伊藤暢及び宮島篤との共同研究であるが、申請者が主体となって実験及び考察を行ったものであり、申請者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。