

## 論文の内容の要旨

論文題目 胆管形成における Grainyhead family 転写因子

Grhl2 の機能解析

(Functional analysis of a Grainyhead family  
transcription factor, Grhl2, in the bile duct formation)

氏名 千賀 一徳

肝臓は生体内における最大の臓器であり、代謝、解毒作用、消化吸収促進、糖の貯蓄等、様々な機能を有しており、生命の恒常性の維持に必須な臓器である。肝発生において、肝重量の殆どを占め、肝臓の主要な働きをする肝細胞は肝芽細胞から分化し、同じく肝芽細胞より胆管上皮細胞が分化する。この胆管上皮細胞によって形成される胆管は管状構造で、肝細胞から排出された胆汁を十二指腸へと運ぶことにより、肝機能を維持する生理的に重要な組織構造である。

マウス発生において、胎生後期に肝芽細胞より分化した胆管上皮細胞は門脈を囲むように層状に位置し、ductal plate と呼ばれる細胞層を形成する。やがて出生前後に ductal plate がリモデリングを起こし、管腔を伴った胆管を形成する。この胆管の形成過程と分化成熟過程を制御する分子機構はまだ十分に明らかにはなっていない。胆管形成に関与するいくつかのシグナルや遺伝子が報告されている。そのなかの一つである Noct 1 シグナルでは、シグナル伝達分子に変異がある場合、アラジール症候群を引き起こす。また胆管形成に関わる Pkhd 遺伝子の変異によって、多嚢包性肝疾患が起こることがわかっている。このように胆管形成に関わる分子機構の解明は疾患の原因究明に必要である。

先行研究で、胆管形成時期において胆管上皮細胞に特異的に発現する遺伝子を同定すべく、胎児肝臓から肝芽細胞を、胆管形成期である新生児肝臓から胆管上皮細胞をそれぞれ分離し、microarray によって網羅的な遺伝子発現解析を行った。胆管形成が行われる新生児期に胆管で発現上昇する遺伝子群には、胆管の形態形成や機能獲得に関与するものが存在すると考え、複数の候補遺伝子を選択した。その中でも本研究では転写因子に注目し、Sry-box 9(Sox9), POU domain class 2 associating factor 1(Pou2af1), Grainyhead like 2(Grhl2)の解析を行なった。

同定した3遺伝子を定量PCR法によって、肝芽細胞と各発生段階の胆管上皮細胞における発現解析を行い、3遺伝子とも胆管発生時期の胆管上皮細胞で発現上昇が認められた。さらに免疫組織化学染色を用いて肝発生での発現を解析したところ、Pou2af1は胆管上皮細胞だけではなく、肝細胞にも発現していることがわかった。また、Sox9は胆管形成期以前からの胆管上皮細胞でも発現が観察された。Grhl2は胆管形成期以降の胆管上皮細胞にて発現が認められ、胆管形成において機能していることが期待された。

遺伝子の詳細な機能解析を行うために、本研究では胆管形成のモデルとして、肝前駆細胞株(HPPL)の3次元培養系を用いた。この培養ではHPPLは胆管上皮細胞として分化する他、細胞極性や分泌機能を獲得し、管腔を持ったシストを形成する。ここでは肝細胞にも発現が見られたPou2af1を解析対象から除外し、Sox9とGrhl2のcDNAのみをレトロウイルスベクターによってHPPLに導入し、3次元培養を行った。その結果、Sox9の導入ではほとんど変化は見られなかったが、Grhl2の導入によってシストの管腔拡大が観察された。また、成体マウスの肝臓から単離した胆管上皮細胞を3次元培養した場合にも、HPPLが形成するものに比べて大きな管腔を持ったシストを形成することから、Grhl2を導入することで、より分化成熟した胆管上皮細胞の形質がHPPLに獲得されたものと考えられる。

Grhl2が属するGrh familyは、上皮や上皮細胞の分化促進能を、種間を越えて持っているため、上皮の分化に伴い変化する上皮バリア機能に着目した。HPPLの単層培養において、デキストランの透過性によってバリア機能を評価し、Grhl2を導入することでデキストランの透過性が減少したので、Grhl2はバリア機能を亢進する機能があることが示唆された。バリア機能は密着結合に依存し、その主要な構成分子であるClaudin familyのうち、胆管上皮細胞で発現するものの発現を解析した。結果、Grhl2を導入することでClaudin3とClaudin4の発現上昇が、mRNAとタンパク質レベルでそれぞれrealtime PCRとウェスタンブロットングによって認められた。両遺伝子をレトロウイルスベクターによってHPPLに強制発現させて、3次元培養を行ったところ、Claudin4では大きな変化は認められなかったが、Claudin3では管腔の拡大が観察された。また、上皮バリア機能を評価したところ、ここでもClaudin-4の過剰発現では有意な差異は認められなかったが、Claudin3によって

有意に透過性が減少していることがわかった。これらのことから Grh12 は Claudin4 と Claudin-3 の発現制御を介して上皮バリア機能を亢進し、HPPL の上皮成熟を促していることが示唆された。また、一方、Claudin3 と Claudin4 を共発現させても、Grh12 導入時の管腔の大きさには及ばず、他の標的遺伝子が Grh12 の機能に必要なと考えた。

Grh12 の標的遺伝子の同定するために、HPPL の 3 次元培養にて Grh12 を導入することで発現上昇する遺伝子と、新生児期の胆管上皮細胞で発現上昇してくる遺伝子をマイクロアレイ解析によって抽出した。さらに *In silico* で Grh12 のコンセンサス配列に基づいた網羅的プロモーター解析を組み合わせ、その中から上皮の形成や分化に関わる因子に絞って解析を進めた。その結果、低分子量 Small GTP 結合タンパク質、Rab25 遺伝子を同定した。Rab25 遺伝子を HPPL にレトロウィルスを用いて導入し、3 次元培養を行ったところ、Grh12 と同様にシストの管腔拡大を引き起こすことがわかった。またそこで、Claudin-4 のタンパク発現量が上昇していることがウェスタンブロットティング法によってわかった。さらに、HPPL の単層培養において Rab25 を導入することで Dextran の透過性が減少し、バリア機能を制御することが示唆された。Rab25 が Grh12 の機能に必要なのかを検証するために、Rab25 の GTPase 活性部位に変異を入れた Rab25 ドミナントネガティブ変異体 (Rab25DN) の発現ベクターを作製した。Grh12 を強制発現させた HPPL に Rab25DN をレトロウィルスベクターを用いて安定的に発現させて、三次元培養を行ったところ、Grh12 によって誘導されるシストの管腔拡大は有意に抑制された。これらの結果より、Rab25 は Grh12 のシストの管腔拡大に必須で、Grh12 の機能の一部を担っていることが示唆された。

以上の結果より、胆管形成において Grh12 は、Claudin-3 と Claudin-4、Rab25 の発現制御を介し、バリア機能を亢進することによって胆管上皮細胞の分化成熟を促進することが示唆された。この働きは、胆管の形成だけではなく、細胞傷害性の胆汁を漏洩すること無く運搬する管状組織の機能を形成し、肝臓の機能恒常性に重要であると考えられる。