

論文審査の結果の要旨

氏名 千賀 一徳

本論文は5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、第三章は研究結果が、第四章では考察、第五章では結論が記述されている。

肝臓において肝細胞から排出された胆汁は胆管を通り、十二指腸へと排出される。胆汁は強い界面活性作用を有し、細胞傷害性作用も持つので、胆管からの胆汁の流出による肝障害を防止するために、胆管を構成する胆管上皮細胞間には強いシーリング機構がある。この胆管形成の分子機構は未だ十分に解明されていない。そこで、申請者の所属研究室の先行研究により同定されていた胆管に発現する転写因子 Sox9 及び Grh12 の胆管形成における機能解析を行った。まず、肝発生過程での発現様式を解析し、Sox9 は胆管上皮細胞への分化初期段階から、Grh12 は胆管形成期以降で発現することを明らかにした。これらの遺伝子の機能を解析するために、申請者の所属研究室において確立された肝前駆細胞株 HPPL をマトリゲルを含む培地中で3次元培養を行なう胆管分化培養系を用いた。この培養系では、HPPL は胆管上皮細胞として分化し、細胞極性を有する細胞層の中に管腔を伴ったシストを形成し、胆管組織の一部を再構築する。また、HPPL にはレトロウィルスベクターを用いた遺伝子操作が可能であるので、申請者はこの培養系を用いて胆管形成過程における遺伝子の機能解析を行った。HPPL に Sox9 を強制発現してもシストの形態に大きな変化はなかったが、Grh12 の強制発現ではシストの管腔が著しく拡大した。生体から分離した胆管上皮細胞を3次元培養によりシストを形成させた場合も、コントロールの HPPL に比べて、大きな管腔を形成することから、Grh12 を発現することで HPPL の胆管上皮細胞としての分化成熟が促進されたことが示唆された。また、上皮の分化成熟に伴って変化するバリア機能を評価したところ、Grh12 の強制発現により HPPL のバリア機能が強化されることが示唆された。そこで、申請者は管腔拡大の要因としてバリア機能に着目した。バリア機能はタイトジャンクション(TJ)に依存し、その主たる構成分子 Claudin(Cldn)ファミリーの発現変化を解析すると、HPPL では Grh12 の発現により3次元培養で Cldn3 と Cldn4 の発現が上昇していた。興味深いことに、Cldn3 を強制発現するとシストの管腔拡大が誘導されたが、Cldn4 では観察されなかった。これと連動して、Cldn3 は強制発現により TJ への局在が観察されたが、Cldn4 の単独発現では、TJ への局在が観察されなかった。また、Cldn3 と Cldn4 を共発現させても Grh12 の発現による管腔の大きさには及ばないことから、他の Grh12 標的遺伝子が管腔拡大に関与していることが示唆された。そこで申請者は、マイクロアレイ解析と網

羅的なプロモーター解析を用いた Grh12 の標的遺伝子探索を行い、small G タンパク質である Rab25 を同定した。Rab25 を HPPL に過剰発現させると、Grh12 と同様にバリア機能を促進し、管腔拡大を引き起こすとともに、Cldn4 のタンパク質レベルでの発現上昇と TJ への局在を促進させた。以上の結果より、胆管形成時に Grh12 は Cldn3 と Cldn4、Rab25 を介してバリア機能を制御し、胆管上皮細胞の分化成熟を促進することが示された。この一連の研究によって、胆管形成に必要な細胞間のシーリング形成機構の一端が解明され、Rab25 による Cldn の新たな細胞内局在機構の存在が示唆された。このように本研究は、管腔形成という臓器形成における基本的な機構の理解を深め、器官形成の分子細胞生物学の発展に貢献するものである。

なお、本論文は谷水直樹、三高俊広、Keith E. Mostov、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なったものであり、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。