

氏名	こ だま ゆう ぞう 児 玉 裕 三
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2817 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	The role of Notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts (肝内胆管の発生における Notch シグナルの機能解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 塩 田 浩 平 教 授 生 田 宏 一 教 授 中 畑 龍 俊

### 論 文 内 容 の 要 旨

Notch シグナルは細胞間の直接接触により細胞運命の決定を制御する進化上保存されたシグナル伝達機構である。ヒトにおいても様々な組織発生、器官形成において Notch シグナルが重要な役割を果たしており、その構成因子の遺伝子変異がいくつかの遺伝性疾患の原因となることが知られている。Notch シグナルのリガンドをコードする *Jagged1* の遺伝子変異は、肝内胆管形成不全を主徴とする常染色体優性遺伝の疾患、アラジール症候群をきたすことが報告されている。しかしながら、肝内胆管発生過程における Notch シグナルの役割についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、胆管上皮分化、および肝内胆管形成における Notch シグナルの機能を明らかにすること目的とした。

マウス肝内胆管は、肝細胞にも胆管上皮細胞にも分化し得る肝芽細胞から発生することが知られている。まず、門脈域の間葉系組織に接した肝芽細胞が胆管上皮細胞に分化し (commitment), ductal plate と呼ばれる門脈を取り囲んだ一層の細胞層を形成する (ductal plate formation)。次に ductal plate の一部が二層化し、さらには拡張して管腔構造が形成され、これと同時に ductal plate の他の部分は消失する (remodeling)。こうして形成された管腔構造が成熟し、肝内胆管が形成される (maturation)。我々は、まずこのようなマウス肝内胆管形成過程において、Notch リガンドの *Jagged1*、Notch レセプターの *Notch2*、および Notch シグナルの主要な下流分子である *Hes1* の発現パターンを、RT-PCR、western blotting、および免疫染色法により解析した。その結果、*Jagged1* は新生児期に発現が強く、その局在は門脈域の間葉系組織であった。また、*Notch2*、および *Hes1* も新生児期に強い発現がみられ、これらの局在はいずれも *Jagged1* を発現する間葉系組織に近接した胆管上皮であった。また、これらの *Notch2* と *Hes1* の発現は、remodeling 過程の胆管上皮の中で、管腔構造を形成する胆管上皮のみに認められ、他の部分にはみられなかった。これらの結果から、新生児期マウスの門脈域では、上皮-間葉相互作用の一つとして *Jagged1*-*Notch2* の相互作用が機能しており、これによって胆管上皮において *Hes1* が活性化されていることが示唆された。

次に、このような胆管上皮における *Hes1* 活性化の機能を明らかにするために、*Hes1* ノックアウトマウスの肝発生について解析を行った。*Hes1* ノックアウトマウスの肝細胞分化には異常を認めなかった。一方、肝内胆管形成の解析では、commitment, ductal plate formation には異常を認めなかったが、remodeling の過程における管腔形成が認められず、アラジール症候群と同様の肝内胆管形成不全をきたすことが分かった。これらの結果から、胆管上皮における *Hes1* の活性化は ductal plate からの管腔形成に必須と考えられた。

さらに、胆管上皮細胞分化における Notch シグナルの役割を in vitro において解析するために、正常ラット由来の肝前駆細胞様の培養細胞である WB-F344 細胞と *Jagged1* 発現繊維芽細胞の共培養の系を構築し解析を行った。その結果、*Jagged1* 発現繊維芽細胞は接触依存的に WB-F344 細胞の Notch シグナルを活性化し、肝細胞への分化を抑制、胆管上皮への分化を促進した。これらの結果から、in vitro においても胆管上皮細胞分化において Notch シグナルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の結果から、マウス肝臓の発生過程において、Notch シグナルは門脈域の上皮 - 間葉相互作用の一つとして胆管上皮の分化を制御しており、肝内胆管形成の remodeling の過程における管腔形成に必須であることが明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

Notch シグナルのリガンドをコードする *Jagged1* の遺伝子変異は、肝内胆管形成不全を主徴とする常染色体優性遺伝の疾患、アラジール症候群をきたすことが報告されている。しかしながら、肝内胆管発生における Notch シグナルの役割はほとんど明らかにされていない。そこで申請者はマウス肝内胆管発生過程における Notch シグナル構成因子の発現について解析した。その結果、新生児期の門脈域において、レセプターの Notch2、および下流分子の Hes1 は発生過程の胆管上皮に、またリガンドの Jagged1 は胆管周囲の間葉系組織に発現を認め、Jagged1-Notch2 の相互作用による胆管上皮での Hes1 の活性化が示唆された。また、*Hes1* ノックアウトマウスの解析の結果、アラジール症候群と同様の肝内胆管形成不全が認められ、Hes1 は肝内胆管形成に必須と考えられた。さらに、Jagged1 発現繊維芽細胞と正常ラット由来の肝前駆細胞様の培養細胞である WB-F344 細胞との共培養の系において、Jagged1 発現繊維芽細胞は接触依存的に WB-F344 細胞の Notch シグナルを活性化し、肝細胞分化を抑制、胆管上皮分化を促進した。以上の結果から、マウス肝臓の発生過程において、Notch シグナルは門脈域の上皮 - 間葉相互作用の一つとして胆管上皮の分化を制御しており、肝内胆管形成に必須であることが明らかとなった。

以上の研究は肝内胆管発生の分子メカニズムの解明に貢献し、アラジール症候群を含む様々な肝疾患の病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年1月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。