

学 位 論 文 題 名

Molecular pathobiology for renal tubular dysplasia in Japanese black cattle due to claudin-16 deficiency

（黒毛和種牛腎尿細管形成不全症（クローディン-16欠損症）の分子病態）

学位論文内容の要旨

クローディンは、上皮細胞のタイトジャンクション(TJ)を構成する主要な膜内在性蛋白質である。現在 20 種を超えるクローディンサブタイプが知られ、これらが組織特異的に分布し、TJ における細胞間隙の選択的な物質透過性と細胞間接着を担っている。クローディン-16 は、ヒト家族性低マグネシウム血症高カルシウム尿症(FHHNC)の原因遺伝子産物として同定され、腎尿細管における二価陽イオンの傍細胞輸送に関与すると推定されている。一方、クローディン-16 遺伝子(*CLDN16*)の完全欠損による黒毛和種牛の腎尿細管形成不全症の主徴は尿細管の異形成による腎機能低下であり二価陽イオンの代謝異常は顕著ではない。本研究では、牛クローディン-16 欠損症発症の分子基盤の解明を目的とし、牛クローディン-16 の腎尿細管における局在、ならびに尿細管形成における機能の解析をおこなった。

クローディン-16 はヒトおよびマウスの腎尿細管において、ヘンレの太い上行脚部(TAL)に特異的に発現することが明らかとなっているが、牛腎尿細管分節におけるクローディン-16 ならびに他のクローディンサブタイプの局在は明らかでない。そこで、まず、蛍光抗体法を用い牛腎尿細管におけるクローディン-16 の分布、ならびにそれと共在するクローディン分子種の同定を行った。その結果、牛クローディン-16 は、Tamm-Horsfall 糖蛋白質(THP)陽性の尿細管、即ち、TAL の TJ 領域に限定して存在することが明らかになった。また、他のクローディン分子群は、従来知られるマウス腎とは若干異なる分節特異的な分布を示し、特に牛腎尿細管においてクローディン-4 が TAL および遠位尿細管に発現することが明らかとなった。これらのことより、牛腎尿細管においてクローディン-16 は TAL に特異的に発現し、同分節でクローディン-3、-4、ならびに-10 と共在し TJ を形成することが判明した。

牛クローディン-16 欠損症の病態から、クローディン-16 が尿細管形成過程において重要な機能を有し、その欠損が胎生期の尿細管形成を障害することが推定される。そこで、クローディン-16 欠損症牛の胎生期における腎尿細管形成過程を解析する目的で、北海道立畜産試験場との共同研究で、*CLDN16*^{-/-}胚の受精卵移植によりクローディン-16 を欠損した胎子を作出し、その胎生期における腎尿細管の組織構築を *CLDN16*^{+/+}個体における腎と比較した。*CLDN16*^{+/+}では胎生 100 日齢で特定の尿細管上皮の管腔側にクローディン-16、

3, 4, ならびに 10 の分布が認められた。*CLDN16*^{-/-}胎子もクローディン-16 の欠損以外は全く同様の組織構造がみられ、100 日齢、あるいは出生直前の 270 日齢の腎でも THP 陽性でクローディン-3, 4, 10 が共在する明瞭な尿細管構造が認められた。この時期の *CLDN16*^{-/-}腎では尿細管構造の乱れはみとめられず、他の主要クローディン分子群の RNA、ならびに蛋白質の発現量も正常胎子との相違はみられなかった。これらのことから、クローディン-16 欠損は尿細管組織構築自体には何ら影響しないことが明らかとなった。これらの結果から、クローディン-16 の欠損は TAL を構成する上皮細胞間の TJ の選択的な物質透過性の異常をきたし、出生後の尿細管構築崩壊に関与することが推定された。

この仮説を実証するモデルのひとつとして、マウス胎子後腎の器官培養系が有用と考えられた。そこで、妊娠 12 日目のマウス胎子から得た後腎を器官培養して、クローディン分子群(クローディン 1-4, 8, 10, 11, 16)、ならびに同じく TJ タンパク質であるオクルーディンと ZO-1 の発現動態を RT-PCR 法と蛍光抗体法で解析し、胎子腎の発達過程と比較・検討した。8 日間の培養期間中、後腎におけるクローディン-16 をはじめとするクローディン分子群の mRNA 発現量は、胎子腎の発達過程にみられるのと同様の、個々の分子に特徴的な変動を示した。また、蛍光抗体法での観察では、各クローディン分子が特定の尿細管の上皮細胞管腔側にオクルーディン、ZO-1 と局在をともにすること、即ち TJ 領域に分布することが示された。これらの結果より、マウス後腎の器官培養が、胎子腎の発達にともなったクローディン分子群の発現動態を再現できる有用なモデルであることが示唆された。

以上のように、本研究からクローディン-16 が牛腎尿細管 TAL に特異的に発現すること、その欠損は胎生期の尿細管組織構築形成自体には影響を及ぼさないことが明らかになった。この結果は、黒毛和種牛におけるクローディン-16 欠損による腎尿細管形成不全症の発症が出生後の尿細管上皮細胞の崩壊によることを明らかに示すとともに、それがクローディン-16 の欠損による TAL 領域尿細管における管腔側—基底側内イオン分布のバランスの異常に起因する可能性を示唆するものである。さらに本研究は、その実証に、マウス後腎の器官培養系が有用となる可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 助 教 授 石 川 透

学 位 論 文 題 名

Molecular pathobiology for renal tubular dysplasia in Japanese black cattle due to claudin-16 deficiency

(黒毛和種牛腎尿細管形成不全症 (クロードイン-16欠損症) の分子病態)

クロードインは、上皮細胞のタイトジャンクション(TJ)を構成する主要な膜内在性蛋白質であり、20種を超えるサブタイプが組織特異的に分布して TJ における細胞間隙の選択的な物質透過性と細胞間接着を担っている。黒毛和種牛の腎尿細管形成不全症は、尿細管異形成と間質性腎炎による腎機能低下を主徴とする遺伝性疾患であり、クロードイン-16 遺伝子(*CLDN16*)の完全欠損に起因することが知られるが、発症機序は不明である。本研究では、牛クロードイン-16 欠損症発症の分子基盤の解明を目的に、健常個体、クロードイン-16 欠損個体由来牛腎とマウス後腎器官培養系の組織学的解析を行った。

牛クロードイン-16 欠損症発症個体の腎では広範な領域に尿細管の異形成がみられるが、牛腎の尿細管分節におけるクロードイン-16 の分布や異形成との関連は不明である。そこで、まず第1章では、クロードイン-16、ならびにマウス腎での存在が明らかにされているクロードイン-1~4、-10、および-11について、牛腎尿細管における分布を蛍光抗体法により解析した。その結果、牛クロードイン-16 は、Tamm-Horsfall 糖蛋白質(THP)陽性の尿細管、即ち、ヘンレループの太い上行脚(TAL)の TJ に限局して存在すること、また同領域の TJ には、クロードイン-3、-4、ならびに-10 が共在することを明らかにした。

一方、従来の牛クロードイン-16 欠損症個体の病理学的解析から、クロードイン-16 は尿細管の組織形成に必須で、その欠損が尿細管の形成不全を生じることが示唆されるが、胎子期から新生子期における組織病態は未解明で詳細は不明である。そこで、第2章では *CLDN16*^{-/-}胚の受精卵移植によりクロードイン-16 を欠損した胎子を作成し、その胎生期における腎尿細管の組織構築を *CLDN16*^{+/+}個体における腎と比較した。その結果、100 日、180 日、270 日、いずれの胎齢においても、*CLDN16*^{-/-}胎子の腎に THP 陽性でクロードイン 3, 4, 10 が共在する明瞭な尿細管構造が認められ、TAL 領域が正常に形成されることが明らかにされた。また、ネフロン組織構造にも異常はみられず、主要クロードイン分子群の RNA と蛋白質の発現量も *CLDN16*^{-/-}胎子と相違がないことを明らかにした。これらの結果は、クロードイン-16 の欠損が胎子期における尿細管組織構築自体には何ら影響しないこと、したがって、尿細管異形成は出生後の尿細管組織の崩壊に起因することを明確に示すものである。胎子期における正常な組織構築と出生後の組織崩壊は、クロードイン-16 欠損に基づく TAL 領域上皮細胞間 TJ における選択的な物質透過性の異常が本疾患発症の原因となることを示唆するものである。

第3章では、この仮説を実証するモデルとして、マウス胎子後腎器官培養系の有用性を検討した。妊娠12日目のマウス胎子から得た後腎を培養し、クロードイン分子群(クロードイン 1-4, 8, 10, 11, 16)、ならびに同じく TJ タンパク質であるオクローディンと ZO-1 の発現動態を RT-PCR 法と蛍光抗体法で解析し、胎子腎の発達過程と比較・検討した。8 日間の培養期間中、後腎におけるクロードイン-16 をはじめ

とするクローディン分子群の mRNA 発現量は、胎子腎の発達過程にみられるのと同様の、個々の分子に特徴的な変動を示した。また、蛍光抗体法での観察では、各クローディン分子が特定の尿細管の上皮細胞管腔側にオクルーディン、ZO-1 と局在をともにすること、即ち TJ 領域に分布することが示された。これらの結果より、マウス後腎の器官培養が、クローディン分子群の発現動態や機能を再現できる有用なモデルであることが示された。

本研究は、黒毛和種牛の *CLDN16* 欠損による腎尿細管形成不全症が出生後の尿細管構築の崩壊によって生じることを解明し、さらに発症機構解明への基盤となる知見を提供するものであり、多様な TJ 蛋白質の異常に基づく疾患の分子機構解明に大きく貢献するものである。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者大田寛の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科博士論文審査等に合格と認めた。