

マウスネフロン形成過程における分子基盤の解明

— Hepatocyte nuclear factor 4 alpha はネフロン形成の中心的役割を担う —

学位論文内容の要旨

マウス後腎発生過程で、後腎間葉組織 (MM) は間葉-上皮転換 (MET) の結果、尿管芽 (UB) 先端周囲に後腎間葉凝集体 (CM) を形成し、コンマ字体 (CSB)、S 字体 (SSB) へと形を変え、ネフロン形成を行う。Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Hnf4a) 蛋白質は核内転写因子で、肝臓をはじめとして様々な臓器に発現し、多くの遺伝子の転写調節に関わっている。しかし、*Hnf4a*^{-/-}マウスは腎臓形成以前に胎生致死に陥り、腎臓発生における機能は未だ不明な点が多い。本研究では、*Hnf4a* の腎臓発生における動態ならびにその機能を解明することを目的とした。

第一章では、*Hnf4a* の成体および発生過程における発現動態を検索した。その結果、腎臓では *Hnf4a* バリエーションの 1 つである *P1* タイプのみの発現が検出された。また、*Hnf4a* 蛋白質の局在は CSB/SSB の一部で開始し、その後のネフロン形成過程を通じて検出され、最終的に近位尿細管に局限していた。さらに *Hnf4a* と *Hnf1a* の免疫組織化学的検索の結果、同一ネフロンにおいて *Hnf4a* は *Hnf1a* より早く発現が開始することが明らかとなり、*Hnf* ネットワークのなかでより根源的役割を持つことが示唆された。第二章では、器官培養後腎における遺伝子発現抑制により、*Hnf4a* 蛋白質の機能を解析するとともに、*Hnf* ファミリーの局所遺伝子発現を解析した。遺伝子発現抑制の結果、培養後腎で CM の細胞配列が乱れ、多数の細胞死が出現することを確認した。正常マウス後腎における局所遺伝子発現解析の結果、凝集前の MM では発現が認められず、CM においては *Hnf4a*^{P1}、*P2* 両タイプの発現が、CSB/SSB においては *P1* タイプのみの発現が認められた。さらに CM においては *Hnf4a* の上流因子である *Hnf1b* の遺伝子発現が認められ、CSB/SSB においては *Hnf1a* および *Hnf1b* の遺伝子発現が認められた。

第三章では、腎臓発生過程の MET を超微形態、免疫組織化学、分子生物学的に解析し、さらに、培養線維芽細胞に *Hnf4a* 遺伝子発現を導入した細胞モデルを作製し、*Hnf4a* 蛋白質の MET に与える影響を解析した。その結果、CM において細胞間接着が認め

られたが、基底膜は認められなかった。さらに、*Hnf4a* 遺伝子の発現が開始する CM において、凝集前と比較して上皮細胞マーカー遺伝子の発現が上昇し、間葉細胞マーカー遺伝子の発現が減少した。さらに、細胞モデルにおいて、*Hnf4a* が上皮マーカー遺伝子発現を上昇させ、間葉マーカー遺伝子発現は減少させることが明らかとなり *Hnf4a* が MET を誘導することが示唆された。また、細胞の apico-basal 極性の形成に関わる *Pvr11,-2* および *Mllt4* 遺伝子の発現上昇が認められた。

以上より、1)*Hnf4a* が成体の腎臓では P1 タイプが優位であり、その局在は近位尿細管に限局していること、2) 発生過程の腎臓において *Hnf4a* が CM の細胞の生存に関与していること、3) CM は MET の中間的段階であることが示唆され、MET の開始に *Hnf4a* が関連している可能性があることが示された。本稿の結論として、*Hnf4a* がネフロン形成の中心的役割を担っていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 昆 泰 寛

副 査 教 授 稲 葉 陸

副 査 教 授 橋 本 善 春

副 査 准教授 佐々木 宣 哉

学位論文題名

マウスネフロン形成過程における分子基盤の解明

– Hepatocyte nuclear factor 4 alpha はネフロン形成の中心的役割を担う –

マウス後腎発生過程で、後腎間葉組織 (MM) は尿管芽先端に後腎間葉凝集体 (CM) を形成し、コンマ字体 (CSB)、S 字体 (SSB) へと形を変えネフロンとなる。Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Hnf4a) は核内転写因子で、肝臓などで多くの遺伝子の転写調節に関わるが、腎臓発生における機能は未だ不明な点が多い。本研究では、腎臓発生における Hnf4a の動態と機能の解明を目的とした。

第一章では、成体および胎子における Hnf4a の発現動態を検索した。その結果、成体腎臓では P1 バリエントのみの発現が、胎子腎臓では P1 と P2 バリエントの発現が検出された。また、蛋白質発現は CSB/SSB の一部で開始し、最終的に近位尿細管に分布した。さらに、同一ネフロンにおいて Hnf4a は Hnf1a より早期に認められた。

第二章では、器官培養後腎の *Hnf4a* 遺伝子発現抑制を行い、その影響を解析した。その結果、培養後腎 CM の細胞配列が乱れ、多数の細胞死が出現した。さらに、胎子後腎切片を用いた局所遺伝子発現解析の結果、MM において *Hnf4a* 発現は検出されなかったが、CM に P1、P2 バリエントの発現が、CSB/SSB に P1 のみの発現が認められた。さらに CM では *Hnf4a* の上流因子である *Hnf1b* の発現がみられ、CSB/SSB では *Hnf1a* および *1b* の発現が認められた。

第三章では、後腎発生過程の間葉-上皮転換 (MET) を形態的に解析した。さらに *Hnf4a* 導入培養線維芽細胞を作製し、その影響を解析した。その結果、CM に細胞間接着複合体はあるが、基底膜は認められなかった。*Hnf4a* 発現が開始する CM において、上皮マーカー発現は上昇し、間葉マーカー発現は減少した。さらに遺伝子導入実験では、*Hnf4a* が上皮マーカー発現を誘導し間葉マーカー発現を抑制した。同時に、細胞の

apico-basal 極性形成に関わる *Pvrl1*, *Pvrl2* および *Mllt4* の発現上昇が認められた。

以上より、1)成体腎臓の Hnf4aは P1 タイプが優位で近位尿細管に分布すること、2) 発生中の後腎において Hnf4aが CM 細胞の生存を制御すること、3) MET の開始に Hnf4aが深く関与していることが示された。これらは、Hnf4aがネフロン形成の中心的役割を担っていることを示すもので、獣医学の発展に有用な知見を提供する。

よって、審査員一同は、上記博士論文提出者 金澤 智則氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。