

論文の内容の要旨

論文題目 後腎間葉におけるコンディショナルノックアウトシステムの作成

指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程内科学専攻

名前 原田美貴

【背景】

ほ乳類の腎臓は、尿管芽とその周囲の間葉組織である後腎間葉との相互作用により、後腎間葉から、糸球体・近位尿細管・ヘンレのループ・遠位尿細管からなるネフロン的大部分が形成されることによって発生する。腎臓発生メカニズムについては研究がすすんでいるが、いまだ不明な点が多く残っている。また、腎臓は自然には再生しない臓器であり慢性的な障害の進行を止める治療法は未だ存在しない。腎臓発生や部分的な再生・組織修復のメカニズムを解明することにより、腎障害の治療法の開発が期待できると考えられる。

臓器発生や疾患における遺伝子機能の解明には、遺伝子操作マウスが大変有効な手段である。なかでも、コンディショナルノックアウトシステムは、Cre-loxP システムを利用し注目する組織で特異的に、対象とする遺伝子をノックアウトするという手法であるが、単純なノックアウトでは解明されえなかった遺伝子機能の解析にきわめて有効であり、さまざまな知見がこのシステムを活用することによって得られている。腎臓の発生や疾患に関わる主要な遺伝子は、単純にノックアウトすると胎性致死であるものが多い。このため、コンディショナルジーンターゲットシステムは、腎臓分野においても有効な手法であると考えられる。現在盛んに研究されているが、後腎間葉に特異的なシステムは未だ確立されていない。今回の研究では、後腎間葉特異的コンディショナルジーンターゲットシステムの確立を目指した。

【方法】

後腎間葉に比較的特異的に発現している Sall1 遺伝子を利用し、内因性の Sall1 の発現を再現する形で Cre 酵素が発現する 2 種類の Cre 発現遺伝子操作マウス (Sall1-Cre ノックインマウス) を作成し、その有用性を検討した。更に時間的・空間的特異性を高めることを目指し、tamoxifen 投与により Cre の発現を誘導する薬物誘導 Cre マウス (=Sall1-CreERT2 マウス) を作成した。これらのマウスを、実際の flox マウス

(indicator マウス、Sall1flox マウス、Stat3flox マウス) と交配し、その有効性を検討した。

【結果】

Sall1-CreVer マウスで Cre の十分な発現が認められた。更に、この系統では別に作成した Sall1flox マウスや Stat3flox マウスとの交配によりそれぞれのノックアウトマウスと同様の所見が認められ、実際に生体内での遺伝子欠損が導かれることが確認された。

しかしこのマウスでの Cre の発現は当初予想した以上に広範かつ強力であり、腎臓発生の時期よりも早期に Cre が作用してしまうことが判明した。時間的空間的特異性を高めることを目指した薬物誘導 Cre マウス (=Sall1-CreERT2 マウス) では、薬物誘導により、胎児期の後腎間葉に比較的特異的に Cre の発現を確認した。更に成体でも、弱いながら、Cre の発現が有意に認められた

【結論】

今回作成した Sll1-CreERT2 マウスは、後腎間葉に発現する遺伝子のコンディショナルノックアウトに有効であることが期待される。薬物の投与方法などに最適化が必要であり、現在更に解析を継続している。今後、腎臓の発生における胎性致死遺伝子の詳細な機能解析や、成体での意義を解析するのに、有用な手法となると期待できると考えている。