

論文内容の要旨

論文題目 **Identification and analysis of mesenchyme specific genes in mouse developing kidney**

〔胎生期マウス腎間葉系遺伝子の同定とその機能解析〕

氏名 高里 実

背景とストラテジー

胎生期腎臓において、間葉細胞は、将来腎臓の各組織へと分化する未分化な細胞集団として知られている。これは、間葉細胞で発現している遺伝子を解析すれば、腎発生の分子機構の解明に繋がることを意味する。また再生医療の観点から見ると、間葉細胞の分化制御が行えるようになれば、細胞療法によるネフロン再生に道がひらける。しかし、腎間葉系遺伝子発現プロファイリングはいまだ行われておらず、間葉細胞の分化の分子機構も殆ど明らかになっていない。私は、胎生期腎臓においてこの間葉系細胞に特異的に発現している遺伝子を探索・同定し、その機能を解明することを目的として、研究を行った。

第1章では、まず、腎間葉系遺伝子を同定するために、胎生期腎臓の間葉系細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。次に、その中から重要遺伝子を選ぶために、得られた腎間葉系遺伝子のスクリーニングを行った。第2章では、第1章でのスクリーニングによって選定された遺伝子、*TBR2*に関してノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。

研究成果

1. 腎間葉系遺伝子発現プロファイリングと重要遺伝子のスクリーニング

私は、マウスの腎臓発生に必須な遺伝子として知られている *Sall1* が胎生期腎臓において間葉系細胞に特異的に発現していることに注目し、*Sall1* をマーカーとして FACS により間葉系細胞のみを単離することにした。そのために、*Sall1* の遺伝子座に *GFP* をノックインした *Sall1-GFP* ノックインマウスを用いた。*Sall1-GFP* ノックインマウスの胎生 17.5 日目の胎児より得た腎臓を解離し、FACS により *GFP* 陽性細胞のみを単離した。この単離した細胞集団から RNA を抽出しマイクロアレイを行った結果、*GFP* 陰性細胞集団と比較して、*GFP* 陽性細胞集団で 3 倍以上強く発現している遺伝子が約 400 遺伝子検出された。その中には実際に、*Sall1* (14 倍), *GDNF* (39 倍), *Reelin* (14 倍), *Six-2* (9 倍), *Pax-8* (31 倍), *LRP-2* (7 倍), *PDGFC* (11 倍), *HeyL* (8 倍), *Cited-1* (8 倍), *Syndecan-4* (17 倍), *BMPR-1A* (8 倍), *WT-1* (7 倍), *FGF-10* (3 倍), *BMP-7* (3 倍) といった、既に間葉系遺伝子として知られている多くの遺伝子も含まれていた。実際に間葉系細胞に発現しているのかを確かめるために、得られた遺伝子リストの上位 50 について *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、84% に当たる、42 の遺伝子が実際に腎間葉系細胞特異的に発現していることを確認した。また、そのうち 22 の遺伝子は、今まで腎間葉系遺伝子として知られていない、新規の腎間葉系遺伝子であった。

腎発生研究では、分子機構を解明する手法として主にノックアウトマウスが用いられてきた。*in vivo* の腎発生を模倣する、遺伝子導入可能な *in vitro* のアッセイ系が確立されていないためである。そのため、次に私はノックアウトマウスを作成するにあたって、対象とする遺伝子を選定した。選定方法として 3 種類のスクリーニング法を行った。一つ目は、発生期腎臓における詳細な発現パターンを解析し、特異的な発現を持つ遺伝子を探索する方法。二つ目は、既知の重要遺伝子である *Sall1* の下流遺伝子を探索する方法。三つ目は、腎臓がんで発現している遺伝子と比較して、腎がんと腎間葉系細胞の両方で発現している遺伝子を探索する、という方法で行った。

一つ目のスクリーニング法では、発生期腎臓における、間葉系遺伝子の詳細な発現パターンを調べた。上で得られた間葉系遺伝子リストの上位の遺伝子の他、*GFP* 陽性集団での発現量が高い遺伝子、*GFP* 陽性と陰性との差が大きい遺伝子、について *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、凝集間葉特異的に発現する遺伝子 (*μ -crystallin*, *BC023483*)、C 字体・S 字体特異的に発現する遺伝子 (*Raldh2*, *1110038H03Rik*)、糸球体特異的に発現する遺伝子 (*TRB2*)、ストローマ領域に特異的に発現する遺伝子 (*Alcam*)、等を同定した。特に、糸球体上皮に発現する *TRB2* と凝集間葉に発現する *BC023483* の発

現パターンは高い特異性があり、興味深い発現パターンであった。

二つ目のスクリーニング法では、腎発生に必須な遺伝子である *Sall1* の下流遺伝子を探索した。それらの下流遺伝子は、*Sall1* と同じく、腎発生に重要な役割を持つ可能性が高い。そこで、*Sall1* ノックアウトマウスにおいて、上で得られた腎間葉系遺伝子リストの上位 50 にある遺伝子の発現に変化があるかどうかを *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた。その結果、*Sall1* ノックアウトマウスにおいて、*Integrin- α 8*、*Unc 4.1*、*Pax8*、*GDNF* 等、いくつかの腎間葉系遺伝子の発現が低下していることが分かった。これら 4 つの遺伝子にはノックアウトマウスが存在し、*Unc4.1* を除く 3 つの遺伝子のノックアウトマウスでは、腎発生に重篤な表現型があることが知られていた。

三つ目のスクリーニング法では、がんと発生で共通した分子機構が働いていることに着目し、間葉系遺伝子のうち、腎がんでも発現している遺伝子を探索した。パブリックデータベースを用いて、上で得られた遺伝子リストの上位 250 遺伝子について調べたところ、14 の遺伝子 (*Reelin*、*Six2*、*Dkk1*、*Claudin12*、*Runx2*、*Cspg2*、*Glcc1*、*Fibrillin2*、*Elov6*、*Ak5*、*Enabled*、*Gucy1b3*、*Ahi1*、*Frizzled7*) が、腎間葉系細胞で陽性、かつ成体腎で陰性、かつ腎がん細胞で陽性、であることがわかった。これら 14 の遺伝子が、実際に成体腎で発現が低下しているかを RT-PCR によって確認した結果、3 遺伝子 (*Six2*、*Dkk1*、*Fibrillin2*) のみが、胎生期腎と比較して、成体腎で発現が低下していた。さらに、この 3 遺伝子が実際に腎がん細胞で発現していることを、3 種類の腎がん細胞株における免疫抗体染色で確かめた。この 3 遺伝子にはそれぞれノックアウトマウスが存在しており、*Six2* と *Dkk1* のノックアウトマウスは腎臓の発生に異常があった。この結果は、腎がんと比較するという手法の妥当性を示唆するものである。

2. *TRB2* ノックアウトマウスの作製と解析

腎臓において、糸球体上皮細胞 (podocyte) 特異的に発現している遺伝子 *TRB2* に特に注目した。*Notch* 遺伝子は糸球体発生に必須な遺伝子であるが、*in vitro* の実験によって、その下流遺伝子として *TRB2* が報告されている。そこで、*TRB2* のノックアウトマウスを作製することにした。*TRB2* のノックアウトは、*TRB2* の遺伝子座に *LacZ* 遺伝子をノックインする方法で行った。*TRB2* のマウス全身での発現パターンを解析するために、作製した *TRB2-LacZ* ヘテロマウス (wt/lacZ) の胎児を *LacZ* 染色したところ、*TRB2* は腎糸球体の他、中腎、精巣、血管内皮、心筋、骨細胞、網膜細胞、後根神経節、に発現していること

がわかった。この発現パターンは *Notch* 遺伝子の発現パターンと非常に重なっており、*Nocth* 遺伝子の下流であることが *in vivo* でも示唆された。

次に、両親がヘテロの場合のノックアウト (-/-) の子供の割合 (生存率) を調べた。その結果、57 匹中 16 匹 (約 28%) がノックアウトマウスであることを確認した。これはメンデルの法則に従っており、胎生致死の表現型がないことを意味する。次に、ノックアウトマウスの発生期の腎臓を組織切片により観察したところ、糸球体の存在を確認した。また、生後 4 週齢のノックアウトマウスの尿を検査したが、野生型と比較して差は見られなかったことから、腎臓機能に顕著な差は無いことが分かった。次に、*TRB2* の発現している中腎、精巣、血管内皮、心筋、骨細胞、網膜細胞、後根神経節に関して、ノックアウトマウスでその形成に異常があるかを観察したところ、形成に関しては明らかな異常は観察されなかった。以上より、*TRB2* はマウス腎臓において糸球体の上皮細胞に特異的に発現しているものの、糸球体の形成やその機能に必須ではないことが示唆された。*TRB2* は *Notch* 遺伝子の下流遺伝子の可能性があるが、糸球体形成時に働く *Notch* シグナルにおいて、*TRB2* は重要な役割を持っていないことが示唆された。*TRB* 遺伝子のファミリーは *TRB2* の他に *TRB1* と 3 が存在するが、*TRB1* は腎臓に弱く発現していることが分かった。*TRB2* のノックアウトマウスにおいて、*TRB1* が糸球体の形成にリダンダントに機能している可能性もある。

まとめ

本研究は、腎臓発生において重要な役割を持つ、胎生期腎臓の間葉細胞に注目し、そこに特異的に発現している遺伝子を特定し、腎臓発生の分子機構を解明することを目的に行われた。第 1 章では、間葉細胞に特異的に発現する間葉系遺伝子をプロファイリングし、そのリストにある遺伝子が間葉細胞に発現していることを *in situ* ハイブリダイゼーションによって確認した。次に、ノックアウトマウスを作製する遺伝子を選定するため、3 種類のスクリーニングを行った。実際に、スクリーニングによって同定された遺伝子の中にはノックアウトマウスで腎臓発生に異常のある遺伝子が高確率に含まれており、このプロファイルが腎臓発生学における有用なツールとして使えることを示した。第 2 章では *TRB2* のノックアウトマウスを作製し、その全身における発現パターンを明らかにした。その結果、*TRB2* が *Notch* 遺伝子の下流遺伝子である可能性を *in vivo* で示した。*TRB2* ノックアウトマウスでは腎臓発生・糸球体形成の異常は認められなかったが、これは *TRB2* が糸球体形成に影響を与えない、純粋なマーカー遺伝子として使える可能性を示唆する。