

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	藤田 春美
論文題目	Claudin-4ノックアウトマウスにおけるT細胞分化と水腎症発症に関する検討		
(論文内容の要旨)			
タイトジャンクション(TJ)は上皮・内皮シートに特徴的にみられる細胞間接着構造であり、イオン・小分子の透過性制御(バリア機能)や細胞極性の維持(フェンス機能)に重要とされている。膜蛋白質Claudin(Cld)ファミリーは、その構造と機能を担う主要な構成分子として知られている。これまでに申請者らは、胸腺組織を形成する胸腺上皮細胞と、胸腺内で分化途中の未熟T細胞が、いずれもTJを構成しないにもかかわらずCld4を発現することを見出し、T細胞抗原受容体からのシグナルを増強する役割を持つ可能性があることを報告した。本研究では、申請者は<i>Cldn4</i>ノックアウト(<i>Cldn4</i>^{-/-})マウスを作製し、<i>in vivo</i>におけるCld4の生理的役割について検討を行った。<i>Cldn4</i>^{-/-}マウスは正常に出生・発育し、少なくともC57BL/6バックグラウンドにおいては胸腺内T細胞分化に異常は認められなかった。しかしながら、上述の研究過程において、加齢<i>Cldn4</i>^{-/-}マウスで死亡率が上昇することと、それに先立って腎臓に尿のうっ滞と腫脹が認められること、すなわち水腎症が発症することを見出した。Cld4は泌尿器系においては腎尿細管の一部と、尿の通り道である腎盂・尿管・膀胱を構築する尿路上皮で高発現しているが、いずれの組織もTJの形成に異常は認められなかった。尿検査で腎機能を検討したところ、Cl⁻やCa²⁺の尿中排泄率の上昇と尿量増加傾向が認められ、腎尿細管におけるイオン再吸収や尿の濃縮調節にCld4が関与する可能性が示唆された。しかしこれらの変化は軽微であり、マウスを脱水状態で飼育すると尿濃縮は正常に行われたことから、腎機能の異常は顕著ではなく、水腎症の原因は尿路にあると考えられた。尿路上皮においては、ビオチントレーサーによる透過性解析では異常が認められず、小分子に対するバリア機能はほぼ正常であると考えられた。一方、造影剤を用いた尿路のX線造影解析により、水腎発症前の個体において腎臓から膀胱への造影剤の排出遅延、すなわち上部尿路における通過障害が確認された。これらの個体においては、尿管・腎盂における尿路上皮の過形成や肥厚が散発的に認められるとともに、<i>in vivo</i>でBrdU取り込みの増加も認められたことから、尿路上皮細胞の増殖亢進が示唆された。以上より、<i>Cldn4</i>^{-/-}マウスにおける水腎症の発症は、尿路上皮の過形成による尿の通過障害が原因であることが示された。尿路上皮は、尿中の有害物や浸透圧変化などのストレスから体内環境と上皮自身を保護するために極めて低い透過性を持つ。この特性は、上皮細胞間のTJや、強固な低透過性の細胞膜、表面を覆う粘液層などにより多面的に維持されると考えられるが、細胞間隙の透過性を規定するTJの生理的意義においては不明な点が多かった。本研究により、TJ構成蛋白が尿路上皮の恒常性維持において重要な役割を担う可能性がはじめて<i>in vivo</i>で示された。			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、胸腺や腎尿路系上皮細胞に発現される上皮タイトジャンクション(TJ)構成分子であるクローディン4(Cld4)の生理的機能を明らかにする目的で、*Cldn4*遺伝子破壊(*Cldn4*^{-/-})マウスを作製し、詳細な形質解析を行った。

Cldn4^{-/-}マウスは正常に出生・発育し、胸腺内T細胞分化に明らかな異常は認められなかった。しかし、*Cldn4*^{-/-}マウスでは加齢に伴い進行性水腎症を発症し、これにより死亡率が上昇することが明らかになった。Cld4は腎尿細管の一部と腎盂・尿管・膀胱を含む尿路上皮に発現されるが、いずれの組織でもTJの形成自体に異常は認められなかった。これは*Cldn4*^{-/-}マウスのネフロンでは新たにCld3がTJ形成維持に関与しているためであることが示され、これは特定のCldの欠質により代償性に他のタイプのCldがTJ形成に関与するという初めての観察である。尿・血液検査では、Cl⁻やCa²⁺の尿中排泄率の上昇と尿量増加傾向が認められ、Cld4が腎尿細管におけるこれらのイオンおよび水の再吸収に関与する可能性が示唆されたが、これらの変化は軽微であり脱水に伴う尿濃縮機能も正常であることから、尿崩症による腎性水腎症の可能性は低いと考えられた。他方尿路上皮においても、ビオチントレーサーによる透過性解析で異常が認められず低分子に対するバリア機能は正常であると考えられたが、経静脈腎盂造影解析により造影剤の腎盂以降の排出遅延が認められ、上部尿路系狭窄閉塞の存在が強く示唆された。組織学的解析から尿管・腎盂において尿路上皮の散発的過形成や肥厚が認められ、さらに*in vivo*で尿路上皮細胞へのBrdU摂取の増加が認められたことから、尿路上皮細胞増殖亢進に起因することが示唆された。

以上の所見から、*Cldn4*^{-/-}マウスにおける水腎症発症の主要因は、尿路上皮の過形成による尿の通過障害にあると考えられた。尿路上皮は、尿中の多様な老廃物や代謝産物に恒常的に暴露されることにより強い物理的・化学的ストレスを受けている。本研究は、TJ構成蛋白が尿路上皮の恒常性維持において重要な役割を担うことを始めて明らかにしたものであり、化学物質による職業性尿路系ガン発生機構の解明などに向けて重要な手がかりを与えるものと考えられる。

以上の研究は細胞生物学の基礎研究の進展に資するところが大きく、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成25年1月22日論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日