



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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 -
Author(s)	金澤, 智則
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第9951号
Issue Date	2011-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k9951
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/44980
Type	doctoral thesis
File Information	kanazawa_thesis.pdf



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-

北海道大学大学院獣医学研究科
比較形態機能学講座 解剖学教室

金澤 智則

目次

略語一覧	1
総諸	5
第一章 マウス成体および胎子における <i>Hnf4α</i> の分布と発現動態	8
I 緒論	9
II 材料と方法	10
1. 供試動物	
2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)	
3. ジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブの作成	
4. 組織学的解析	
a) 一般組織化学	
b) 免疫組織化学	
c) 蛍光抗体法	
d) <i>In situ</i> hybridization	
III 結果	14
1. 成熟マウス全身臓器における <i>Hnf4a</i> mRNA および蛋白質の局在	
2. 胎子腎臓における <i>Hnf4a</i> 遺伝子発現および蛋白質局在の動態	
IV 考察	17
V 小括	20
附図および表	21
第二章 マウス後腎間葉凝集体形成における <i>Hnf4α</i> の機能解析	30
I 緒論	31
II 材料と方法	33
1. 供試動物	
2. 器官培養	
3. 細胞とプラスミド	
4. Small interfering RNA (siRNA) transfection	
5. Laser micro dissection (LMD)	
6. RT-PCR および定量的 real-time PCR	
7. 組織学的解析	
a) 一般組織学的解析	
b) 免疫組織化学	
8. 抗体	
III 結果	38

1. 発生過程腎臓における <i>Hnf4α</i> 蛋白質の局在	
2. ネフロン形成過程における <i>Hnf4a</i> 遺伝子発現抑制の影響	
3. ネフロン形成過程における <i>Hnf4a</i> 遺伝子の局所的発現解析	
IV 考察	42
V 小括	45
附図および表	46
第三章 マウスネフロン形成における間葉-上皮転換の解析	55
I 緒論	56
II 材料と方法	58
1. 供試動物	
2. 細胞とプラスミド	
3. Laser micro dissection (LMD)	
4. RT-PCR および定量的 real-time PCR	
5. 組織学的解析	
a) 透過型電子顕微鏡観察	
b) 免疫組織化学	
c) 細胞組織化学	
6. 抗体	
III 結果	61
1. 後腎間葉凝集体における間葉 - 上皮転換の詳細	
2. 転写因子 <i>Hnf4α</i> と間葉-上皮転換の関連	
IV 考察	63
V 小括	66
附図および表	67
総括	75
謝辞	78
参考文献	79
英文抄録	90

略語一覽

ABC: avidin-biotin complex

Acta2: actin alpha 2, skeletal muscle

AF: activation factor domain

ALP: alkaline phosphatase

Aqp1: aquaporin1

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase/nitro-blue tetrazolium chloride

Cdh1: cadherin 1

cDNA: complementary DNA

CM: condensed mesenchyme

CSB: comma-shaped body

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

Dach: dachshund

DBD: DNA binding domain

DEPC: diethylpyrocarbonate

DIG: digoxigenin

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTP: deoxynucleotide tri-phosphate

dUTP: deoxyuridine tri-phosphate

E: embryonic day

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EMT: epithelial-mesenchymal transition

Eya: eyes absent

FAM: 3'-carboxyfluorescein

Fn: fibronectin

Gapdh: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gata6: gATA binding protein 6

Gdnf: glial cell derived neurotrophic factor

HE: hematoxyline-eosin

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Hnf4 α : hepatocyte (Hepatic) nuclear factor 4 alpha ^{*1}

Hnf1 α : HNF 1 homeobox A

Hnf1 β : HNF 1 homeobox B

Hnf6: hepatocyte nuclear factor 6 (one cut domain, family member 1) ^{*2}

IgG: immunogloblin G

Itg: integrin

KO: knock out

Krt8: keratin 8

LBD: ligand binding domain

Lim1: LIM homeobox protein 1

LMD: laser micro dissection

MET: mesenchymal-epithelial transition

MM: metanephric mesenchyme

Mllt4: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, *Drosophila*); translocated to, 4

MODY: mature onset diabetes of the young

mRNA: messenger RNA

NBT: nitro blue tetrazolium

Nec: nectin

NIDDM: non-insulin-dependent diabetes mellitus

NR2A1: nuclear receptor 2A1

Pax2: paired box 2

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PFA: para-formaldehyde

pH: potential Hydrogen

Pvr11-4: poliovirus receptor-related 1-4

R,®: registered trademark

Ret: ret proto-oncogene

RNA: ribo nucleic acid

RNAi: RNA interference

ROX: X-Rhodamine

RT: reverse transcriptase

s100: s100 calcium binding protein

siRNA: small interfering RNA

Six: sine oculis-related homeobox

SSB: S-shaped body

SSC: saline-sodium citrate

ssDNA: single-strand DNA

TEM: transmitted electron microscope

Tjp1,2: tight junction protein 1,2

TRITC: tetramethylrhodamine-5(and 6)-isothiocyanate

TRPC: transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1

TM: trademark

UB: ureteric bud

USA: United States of America

Vegf : vascular endothelial growth factor

Vim: vimetin

Wnt: wingless-related MMTV integration site

Wt1: wilms tumor 1

*¹ 本遺伝子名はヒトほか多くの動物種で hepatocyte nuclear factor 4 alpha と命名されているが、マウスでは hepatic nuclear factor 4 alpha と命名されている。本稿では、マウスを用いた研究ではあるが、種間での統一性を持たせるためマウスの遺伝子名であっても hepatocyte nuclear factor 4 alpha と表記した。

*² 本遺伝子の正式な遺伝子シンボルは *Onecut1* であるが、他の *Hnf* ファミリーと統一性を持たせるため、本稿では *Hnf6* をシンボルとして表記した。

総諸

マウス後腎の発生は胎齢 10.5 日 (E10.5) ごろ、LIM homeobox protein 1 (Lim1)、Paired box 2 (Pax2)、Wilms tumor 1 (Wt1) や Sine oculis-related homeobox/Eyes absent/Dachshund (Six/Eya/Dach)誘導性の Ret proto-oncogene/Glia cell derived neurotrophic factor (Ret/Gdnf)シグナルにより、ウォルフ管から伸びる尿管芽(ureteric bud, UB) が後腎間葉組織 (metanephric mesenchyme, MM) に侵入することから始まる (Sainio ら、1997 ; Tang ら、1998 ; Kobayashi ら、2005 ; Brodbeck と Englert、2004 ; Kreidberg ら、1993 ; Moore ら、1999 ; Li ら、2003 ; Davies ら、2004)。侵入した UB は分岐を繰り返し、樹枝状に広がっていく一方、その先端周囲に Wingless-related MMTV integration site 9b/4 (Wnt9b/Wnt4)が発現し、後腎間葉凝集体 (condensed mesenchyme, CM) を形成する (Stark ら、1994 ; Carroll ら、2005)。CM は後腎小胞、コンマ字体 (comma-shaped body, CSB)、S 字体 (S-shaped body, SSB) へと形を変える。SSB の一端は Vascular endothelial growth factor (Vegf)シグナルにより糸球体を形成する (Eremina ら、2003)。もう一端は UB と結合し、その後、ネフロンの伸長へと移行する (Kaufman、1992 ; Bard、2002 ; Davies と Fisher、2002 ; Dressler、2006)。ネフロン形成過程で後腎間葉細胞からネフロンへ、すなわち間葉細胞から上皮細胞へと形質転換がおこる。この過程は間葉・上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition; MET) と呼ばれ、体節形成や肝臓形成など、多くの器官形成で観察される (Chaffer ら、2007)。ネフロン形成、ならびに MET のメカニズムは徐々に解明されつつあるが、不明な点が数多く残されている。

Hepatocyte nuclear factor 4 α (Hnf4 α)蛋白質は Zinc フィンガー型核内転写因子 (NR2A1) の一つで、肝臓、消化管の内胚葉由来上皮や膵島 β 細胞のほか、腎臓においても近位尿細管を中心に、高レベルでの発現がみられる。Hnf4 α 蛋白質はマウスでは

第2染色体上に座位する *Hnf4a* 遺伝子によりコードされ、13 個のエクソンで構成されている (図 1A)。ヒト、ラット、ならびにマウスでは、*Hnf4a* 遺伝子の転写産物は、少なくとも 9 つのスプライシングバリエント、即ち、Hnf4 α 1~9 が存在する。この 9 つのスプライシングバリエントは、P1 プロモーターを利用する Hnf4 α P1 および P2 プロモーターを利用する Hnf4 α P2 に大別することができる。Hnf4 α P1 タイプは exon 1A を含む Hnf4 α 1~6 の 6 つのバリエント、Hnf4 α P2 タイプは exon 1D を含む Hnf4 α 7~9 の 3 つのバリエントにより構成される (図 1B)。P1 タイプおよび P2 タイプ転写産物は、それぞれ異なる機能や組織分布を示す (Nakhei ら、1998; Thomas ら、2001)。

Hnf4 α は肝臓および膵島 β 細胞で発現する遺伝子の約 40%のプロモーター領域に結合し、転写調節を行う結果、脂肪代謝、インスリン分泌などに大きく寄与する (Hayhurst ら、2001; Winter と Silverstain、2001; Watt ら、2003; Odom ら、2004; Olsen ら、2005)。Hnf4 α は若年性糖尿病原因因子 Mature onset diabetes of the young 1 (MODY1) としても知られており、ヒトにおいて本因子の変異は、インスリン非依存性糖尿病 (Non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) の発症を誘導する (Yamagata ら、1996a; Furuta ら、1997)。さらに、本遺伝子はカルシウムチャネル *TRPC1* とともに糖尿病性腎症の直接的原因遺伝子とされており、腎臓の恒常性維持に重要な役割をもつ (Niehof と Borlak、2008)。*Hnf4a* 遺伝子のノックアウト (KO) マウスは、卵黄嚢形成不全および初期消化管形成不全に陥り、腎臓形成以前に胎生致死に陥り、腎臓発生における役割は明らかにされていない (Chen ら、1994)。また、コンディショナル KO 技術により、肝臓、膵臓ならびに結腸を対象に、各臓器特異的 *Hnf4a* 遺伝子 KO マウスが作出されてきた。その表現型解析により、Hnf4 α が、肝臓において上皮化、膵臓においてインスリン分泌、結腸において陰窩形成および杯細胞分化に関与することが報告されてきた (Parviz ら、2003; Miura ら、2006; Garrison ら、2006)。しかし、腎臓特異的 *Hnf4a* 遺伝子 KO マウスは作製されておらず、Hnf4 α の腎臓発生における機能に関しては不明な点が多い。

本研究では、腎臓において *Hnf4α* が高レベルに発現していること、*Hnf4α* が多数の遺伝子発現を担う転写因子であること、KO マウスの作製が難しく、腎臓における機能に関する研究が進んでいないことから、腎臓における *Hnf4α* の動態ならびにその役割を解明することを目的とした。第一章では、*Hnf4α* 蛋白質の全身的な分布を明らかにするとともに、腎臓における分布ならびにその発生過程における発現動態を検索した。第二章では、発生中の後腎器官培養系において RNA 干渉法による遺伝子発現抑制を行い、*Hnf4α* 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。第三章では、腎臓発生過程における MET に着目し、超微形態学的、免疫組織化学的および分子生物学的に解析した。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、*Hnf4α* 蛋白質の MET に与える影響を解析した。

第一章

マウス成体および胎子における Hnf4 α の分布と発現動態

I 諸論

Hnf4 α 蛋白質は Zinc フィンガー型の核内転写因子 (NR2A1) の一つで、肝臓および消化管の内胚葉由来上皮のほか、腎臓や膵島 β 細胞に分布する蛋白質である。Hnf4 α は、肝臓と膵島では、発現する遺伝子の約 40%のプロモーター領域に結合し、幅広い種類の遺伝子の発現調節を担う (Odom ら、2004)。Hnf4 α は肝細胞の分化や膵島の発生、ならびに、結腸の胚細胞の分化・成熟に関与しており (Parviz ら、2003 ; Miura ら、2006 ; Garrison ら、2006)、本因子を発現する組織で、その発生に関わっている。

Hnf4 α 転写産物には 9 つのスプライスバリエント(Hnf4 α 1~9)が存在し、利用するプロモーターの種類により、P1 タイプ(Hnf4 α 1~6)および P2 タイプ(Hnf4 α 7~9)に分類される。Hnf4 α P1 および P2 はそれぞれ異なる機能や組織局在を示すことが報告されている(Nakhei ら、1998 ; Thomas ら、2001)。

また、Hnf4 α 蛋白質は *Hnf1a* の、Hnf1 α 蛋白質は *Hnf4a* の各プロモーター領域に結合し、それぞれ転写活性を高めるポジティブフィードバックの関係にある。一方、Hnf1 α 蛋白質は Hnf4 α 蛋白質と結合することにより、*Hnf1a* 遺伝子の転写を抑制するネガティブフィードバックを構成しており、両者の間に複雑なネットワークが構成されている (Hatzis と Talianidis、2001)。

マウスでは、腎臓の発生は、胎齢 (E) 10.5 頃に開始し、尿管芽の伸長・分岐に伴い、尿管芽先端周囲に凝集する CM から CSB、SSB を経てネフロンが形成される。Hnf4 α は成体の腎臓に高レベルに発現しているにもかかわらず、発生過程における動態や機能は不明である。そこで Hnf4 α は、発現する様々な組織で、その発生に関わることから、腎臓でも同様に、発生に関わっているのではないかと予測した。

本章では、全身臓器における Hnf4 α P1 および P2 の分布を明らかにするとともに、腎臓における分布ならびにその発生過程における発現動態を明らかにすることを目的

とした。

II 材料と方法

1. 供試動物

本研究には、SPF 動物施設で飼育された、C57BL/6 (Japan SLC, Hamamatsu, Japan)を使用した。雌雄マウスを一晩、同じケージで飼育し、交配を行った。翌朝、膣栓の確認できたマウスを妊娠マウスとして隔離して飼育を行った。胎子の胎齢は、交配開始 6 時間後を E0 とした。妊娠マウスは頸椎脱臼により安楽死を行い、子宮内より E11.5 から E17.5 の胎子を採取し、組織学的解析および RNA 抽出に供した。成熟マウスの一部は、組織学的解析に供する材料採取のため、ペントバルビタール麻酔下 (0.1 mg/g・体重) において、胸腔を開き、左心室よりカテーテルを挿入し 4% リン酸緩衝パラフォルムアルデヒド (PFA) により灌流固定を行った。

すべての動物実験は「北海道大学における動物実験に関する指針」に基づいて行われた。

2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

総 RNA 抽出は TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) のプロトコルに従って行った。すなわち、採取した材料 50~100 mg を TRIzol[®] Reagent 1.0 ml 中で破碎し、クロロホルム 0.2 ml を加え、4℃、12,000 rpm で 15 分間、遠心分離を行い、RNA を含む水相を回収した。これに等量のイソプロパノールを加え、4℃、12,000 rpm、10 分間遠心した。上澄み液除去後、沈渣に 70% アルコール 1.0 ml を加え、4℃、7,500 rpm、5 分間遠心し、総 RNA を得た。精製した総 RNA は風乾後、Tris/EDTA 溶液 (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0) に溶解した。さらに、混入したゲノム DNA を除去するため、総 RNA 10 mg に対し、Deoxyribonuclease 1 unit (Nippon Gene, Chiyoda, Tokyo) を添加し、37℃で 15 分間インキュベートを行った。

総 RNA 2.4 μ g を 70°C で 10 分間インキュベートした後、反応液 20 μ l (2.4 μ g 総 RNA、5.0 μ M oligo dT、1.0 mM dNTP、RTase (TOYOBO, Osaka, Japan)) を調製し、逆転写反応 (30°C 10 分、42°C 1 時間、95°C 5 分) を行い、cDNA を合成した。

遺伝子発現解析として Ex Taq polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan) による PCR を行った。PCR 反応液は一反応 (20 μ l) あたり、1.0 μ g cDNA、10 $\times$ Ex Taq buffer 2.0 μ l、2.5 mM dNTP 1.6 μ l、20 pmol forward/reverse primer、Ex Taq 0.2 μ l の組成で調製した。PCR プロトコルは初期熱変性として 95°C で 5 分間処理を行った後、熱変性を 95°C で 40 秒、アニーリングを 62°C で 30 秒、伸長反応を 72°C で 30 秒の 3 ステップ PCR を 40 サイクル行った後、さらに伸長 4 分で行った。使用したプライマーを表 1 に示す。得られた PCR 産物はエチジウムブロマイド添加 1.0% アガロースゲルにて電気泳動を行った後、紫外線照射下で撮影し、ゲル解析ソフト KODAK 1D (KODAK, Tokyo, Japan) により画像の取り込みを行った。

3. ジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プローブの作成

Hnf4 α 遺伝子の PCR 産物を pGEM-T (Easy) ベクター (Promega, Madison, USA) に挿入し、E. coli DH5 α コンピテントセルによりサブクローニングを行った。正方向に挿入されたコロニーを選抜し、プラスミドを抽出・精製した後、DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) により DIG 標識 RNA プローブを作製した。すなわち、鋳型 cDNA 1.0 μ g に対し、40 unit T7/SP6 RNA ポリメラーゼおよび 10 nmol DIG 標識 dUTP 含 dNTP mixture を混和し、37°C 2 時間で DIG 標識 RNA プローブを *in vitro* 転写合成した。

4. 組織学的解析

a) 一般組織学的解析

採材した組織を 4% リン酸緩衝 PFA で固定し、常法に従いパラフィン包埋を行った。

通常の組織観察は脱パラフィン後、常法に従いヘマトキシリン・エオシン染色（HE 染色）を施し、光学顕微鏡下で観察を行った。

b) 免疫組織化学

4 μ m 厚パラフィン切片を脱パラフィン後、2×SSC（0.3 M NaCl、0.03 M クエン酸 Na）中に入れ 105℃、20 分間オートクレーブによる抗原性賦活化処理を施した。その後、0.5% H_2O_2 加メタノール中に一時間浸透し、内因ペルオキシダーゼ活性の除去処理を行った。

10% ウサギ血清を用いて、非特異的反応のブロッキングを行った後、一次抗体反応としてヤギ抗マウス HNF4 α ポリクローナル抗体を含む溶液（1:600; sc6556, Santa Cruz, Santa Cruz, USA）中で 4℃ 一晩反応を行った。その後、二次抗体反応としてビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体溶液（1:100 ; Millipore, Billerica, USA）に、VECTASTAIN Elite ABC kit standard (Vector Laboratories, Burlingame, USA) にそれぞれ一時間ずつ反応させ、過酸化水素加 3,3'-ジアミノベンジン（DAB）を用いて発色した。その後、常法に従いアルコール脱水、キシレン透徹の後、非水溶性封入剤により封入を行った。

c) 蛍光抗体法 (Immunofluorescence)

抗原性賦活化処理、ブロッキング反応、一次抗体反応は上記 b) 免疫組織化学と同様に行った。二次抗体反応として 200 倍希釈した TRITC 標識ウサギ抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen) に暗室で一時間反応させた。その後、PBS で三回、純水で一回洗浄した後、水溶性封入剤により封入をおこなった。

d) *In situ* hybridization

4 μ m 厚パラフィン切片を脱パラフィン後、10 mg/ml のプロテイナーゼ K で室温 1

時間、浸透処理をおこなった。10% 中性緩衝ホルマリン(pH 7.2)で反応を停止させた後、ジエチルピロカーボネート処理水 (DEPC 水) で洗浄を行った。85℃で 10 分間加熱処理したハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド、10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1×Denhardt's 液、10%デキストラン硫酸、600 mM NaCl、0.25 % SDS、1.0 mM EDTA) で 63℃2 時間のプレハイブリダイゼーションをおこなった。次いで 1.0 µg/ml DIG 標識プローブ加ハイブリダイゼーションバッファーで 63℃一晩静置した。反応後、4×SSC、2×SSC、1×SSC で順次洗浄し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 DIG 抗体によるシグナル検出を行った。すなわち、1% Blocking reagent (Roche Diagnosis) で室温 1 時間、ALP 標識抗 DIG 抗体 (1:2,000 ; Roche Diagnosis) で室温 2 時間、抗原抗体反応させた後、BCIP/NBT 溶液 (Roche Diagnosis) で反応を検出した。各操作の間に PBS 洗浄を三回ずつ行った。

Ⅲ 結果

1. 成熟マウス全身臓器における *Hnf4a* mRNA および蛋白質の局在

成熟マウスの全身臓器において、*Hnf4aP1* または *P2* 遺伝子産物のどちらが発現しているか明らかにするため、*P1* 遺伝子産物の特異的配列である exon1A または、*P2* 遺伝子産物の特異的配列である exon1D に対し、RT-PCR を行うことにより検索した。その結果、*Hnf4aP1* は肝臓、腎臓、小腸、大腸、副腎、卵巣および胸腺で発現が認められるのに対し、*Hnf4aP2* は肝臓、胃、小腸、大腸、膵臓、卵巣、胸腺、脾臓およびリンパ節で発現が認められた。肝臓、小腸、大腸では、両遺伝子の発現が認められるのに対し、腎臓および副腎では *Hnf4aP1* のみ、胃や膵臓では *Hnf4aP2* の発現のみが認められた (図 2A)。

全身臓器の *Hnf4a* 蛋白質の局在を検索した結果、肝細胞、腎臓尿細管上皮細胞、小腸上皮細胞の核に強い陽性反応が認められ、固有胃腺上皮細胞に弱い陽性反応が認められた。肝臓においては肝小葉内すべての肝細胞に均一に陽性反応が認められたが、小葉間胆管上皮細胞では陰性であった。小腸では絨毛部より陰窩部の上皮で強い陽性反応が認められた。膵臓においては腺房、膵島いずれにおいても陽性反応は認められなかった (図 2B)。

腎臓において、蛋白質の分布を詳細に調べた結果、近位尿細管上皮細胞に強い陽性反応が認められ、糸球体および薄壁尿細管では反応は認められなかった (図 3A,B)。糸球体から近位尿細管の移行部では、近位尿細管の糸球体結合部とボウマン嚢壁細胞でも蛋白質の分布が認められた (図 3A)。さらに、mRNA の分布を調べた結果、蛋白質の分布と同様に、近位尿細管上皮細胞に強い陽性反応が認められたが、糸球体から近位尿細管の移行部では、近位尿細管の糸球体結合部およびボウマン嚢壁細胞に mRNA の分布は認められなかった (図 3C)。一方、近位尿細管から薄壁尿細管の移行部では、蛋白質、

mRNA とともに、近位尿細管で陽性、薄壁尿細管で陰性であり、明確な境界が存在していた (図 3B, D)。

2. 胎子の腎臓における *Hnf4a* 遺伝子発現および蛋白質局在の動態

胃、膵臓、腎臓、小腸の形成・発達過程での各タイプの *Hnf4a* 遺伝子発現の動態を検索するため、E15.0、E17.0、生後 0 日、4 日、7 日、10 日、15 日の各臓器の mRNA 発現を検索した。その結果、成体で P2 タイプが優勢であった胃および膵臓 (図 2) では、E15.0 から生後 15 日まで、すべてのステージにおいて P2 タイプ優勢であったが、E15.0 から生後 4 日にかけて P1 タイプが検出され、その後の過程で消失した。一方、成体で P1 タイプ優勢であった腎臓 (図 2) では、E15.0 から生後 15 日まで、すべてのステージにおいて P1 タイプが優位であったが、E15.0 から生後 0 日にかけて P2 タイプが検出され、その後の過程で消失した (図 4)。

E17.5 胎子の全身臓器で Hnf4 α 蛋白質の分布を調べるため、免疫組織化学を行った。成熟個体同様、肝細胞および腸管上皮細胞に強い陽性反応が認められ (図 5A,D)、胃の尾側すなわち腺部の上皮細胞に弱い陽性反応が認められた (図 5C)。膵臓は成熟個体では免疫組織化学において陽性反応は認められなかったが、E17.5 胎子においては腺房上皮細胞に弱い陽性反応が認められた (図 5E)。後腎においてはネフロン前駆体により構成される中間層にところどころ弱い陽性反応が見られ、その内層の成熟ネフロンに強い陽性反応が認められた (図 5F)。中腎においては中腎細管の上皮細胞に陽性反応が認められたが、中腎細管を分岐する中腎管および中腎傍管に陽性反応は認められなかった (図 5G)。

E17.5 後腎において Hnf4 α 蛋白質の分布を、ネフロン形成過程を追って観察すると、UB、CM および後腎小胞には認められず (図 6A)、CSB の一部 (図 6B)、SSB の一部 (図 6C,D) に局在していた。

さらに、ネフロン形成過程における Hnf4 α 蛋白質と Hnf1 α 蛋白質の分布を明らかにす

るために、E16.0 胎子の連続切片において免疫組織化学を行った。その結果、同一の尿管管またはその前駆体において、Hnf4 α 蛋白質が豊富に分布するのに対し（図 7A）、Hnf1 α 蛋白質は分布しない、あるいは、少量の分布が認められた（図 7B）。すなわち、Hnf4 α 蛋白質はネフロン形成過程で、Hnf1 α 蛋白質より早いタイミングで発現を開始する可能性が示唆された。

IV 考察

Hnf4 α 蛋白質は最初、肝臓特異的転写因子として同定された (Sladek ら、1990)。しかしその後の研究で、腎臓、腸管、胃および膵臓などの肝臓以外の臓器にも存在することが明らかとなった (Taraviras ら、1994)。本研究で行った *Hnf4aP1* および *P2* 遺伝子の RT-PCR による発現解析では、内胚葉由来臓器および腎臓に強い発現が認められただけでなく、卵巣およびリンパ組織にも弱い発現が認められ、Hnf4 α 蛋白質が全身的に広く分布していた。

本研究において、腎臓での Hnf4 α 蛋白質の分布が、近位尿細管に局限し、他のセグメントには分布しないことが認められた。腎臓の近位尿細管上皮細胞および、Hnf4 α 蛋白質の分布する肝細胞、小腸、大腸の上皮細胞に共通する特徴として、微絨毛が発達することがあげられる。マウス胎子腫瘍細胞 F9 を用いた研究では、Hnf4 α 蛋白質が微絨毛形成に関わっていることが示されており (Chiba ら、2006)、腎臓近位尿細管およびこれらの組織で、Hnf4 α が微絨毛形成の役割を担っていることが示唆される。Hnf4 α は肝臓および膵臓において、多数の遺伝子の発現調節を行っており、その中にはグルコース、脂肪酸、アミノ酸、アンモニア、コレステロール、ステロイドや薬剤の代謝に関わる酵素をはじめ、シグナル伝達に関わるリガンド、受容体、転写因子やトランスポーター蛋白質をコードする遺伝子が含まれている (Hayhurst ら、2001 ; Tirona ら、2003 ; Duncan ら、1994)。このことから、腎臓近位尿細管における Hnf4 α の役割は微絨毛形成だけでなく、他の役割を担うことが示唆される。腎臓における免疫組織化学と *in situ* hybridization の結果、糸球体から近位尿細管の移行部で蛋白質の分布を認める一方、mRNA の分布は認められなかった。すなわち、糸球体から近位尿細管の移行部では Hnf4 α が必要とされていない可能性が示唆される。この領域がネフロン全体の中でどのような機能を持つ領域であるのか、またそこで Hnf4 α がどのような動態を示し、どのような

役割を果たすか、さらに吟味する必要があると考えられる。

胎子の腎臓において **Hnf4 α** 蛋白質を免疫組織化学により検索したところ、ネフロン形成過程でコンマ字体・S 字体の一部で検出された。集合管と接合する遠位末端および糸球体へと分化する近位末端には反応は認められず、中間部の領域に陽性反応を認めた。**Hnf4 α** は成体の腎臓において近位尿細管に限局することを併せ考えると、CSB、SSB で陽性反応の認められた部位は将来近位尿細管になる部位であることが示唆され、ネフロン形成過程において、**Hnf4 α** が近位尿細管上皮細胞としての性格決定に関与している可能性が考察された。

また、本研究で **Hnf4 α** 蛋白質陽性の CSB/SSB および未熟な尿細管において、**Hnf1 α** 蛋白質の発現が認められなかったか、または弱い発現が認められた。*Hnf4a* 遺伝子は **Hnf1 α** 蛋白質により発現調節され、*Hnf1a* 遺伝子も **Hnf4 α** 蛋白質により転写調節を受けている。また肝臓細胞腫やヒト腎細胞腫由来の培養細胞を用いた実験で、分化した細胞にのみ **Hnf1 α** が発現し、未分化あるいは脱分化細胞には発現が認められていない (Ninomiya ら、1996 ; Sel ら、1996)。すなわち、同一ネフロンの発生過程において **Hnf4 α** が **Hnf1 α** に先だって発現しており、同じ分子ネットワークにおいて、より根源的な役割を持つことが考察される。

マウスでは E10 頃から、後腎形成に先だって中腎が形成される。E11.5 から E12.5 ごろに中腎細管が形成され、中腎管に結合し非開放性の尿を排泄腔に運ぶ。その後、後腎が形成され、中腎に替わって機能するため、中腎は退縮し消失する (Kaufman、1992)。一方、魚類や両生類では後腎は形成されず、中腎が終末腎として成体になっても機能し続ける。本研究において、マウス胎子の中腎管では **Hnf4 α** が分布しないのに対し、中腎管から分岐する中腎細管に **Hnf4 α** の分布が認められた。アフリカツメガエルを用いた研究において、**Hnf4 α** の上流遺伝子である **Hnf1 β** 遺伝子の発現を抑制すると中腎細管の形成不全が認められることが報告されていること (Dudiziak ら、2008) から、哺乳類においても同様に中腎管の形成に **Hnf** ファミリーが関与している可能性が示唆され

る。

本章の結論として、Hnf4 α は腎臓において近位尿細管に局限して発現し、近位尿細管の微絨毛形成に関連している可能性が考察された。また、腎臓発生期において Hnf4 α は CSB/SSB のステージから局在を認め、Hnf1 α より上流で後のネフロン形成過程に何らかの影響を与えていることが示唆された。さらに、中腎においても Hnf4 α が機能し、中腎細管の形態形成を司っている可能性が示唆された。

V 小括

Hnf4 α は核内ホルモンレセプターに属する転写因子の一つで、一般に肝細胞をはじめとする内胚葉由来上皮細胞に発現が認められる。本因子はマウスにおいて、P1 プロモーターとその前方に位置する P2 プロモーターの二者択一的な選択により、少なくとも 9 つのスプライスバリエントを有する。本章では成熟個体と胎子の全身臓器、特に後腎発生に着目し、RT-PCR 法により P1 プロモーター由来 mRNA (*Hnf4aP1*)および P2 プロモーター由来 mRNA (*Hnf4aP2*)の検出を行うとともに、免疫組織化学法により蛋白質の局在を明らかにした。成熟個体の全身臓器における RT-PCR の結果、肝臓、小腸、大腸では両タイプが、胃、膵臓では *Hnf4aP2* のみが発現するのに対し、腎臓では *Hnf4aP1* のみの遺伝子発現が検出された。免疫組織化学法の結果、近位尿細管上皮細胞の核に蛋白質の局在が認められ、ほかのセグメントには局在は認められなかった。発生後腎においては、**Hnf4 α** 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限局していた。興味深いことに、胎子期の胃、膵臓および腎臓には両タイプの遺伝子発現が検出された。さらに **Hnf4 α** と **Hnf1 α** の免疫組織化学的検索の結果、同一ネフロンにおいて **Hnf4 α** 蛋白質は **Hnf1 α** 蛋白質より早く発現を開始することが明らかとなり、**Hnf** ネットワークの中でより根源的役割を持つことが示唆された。

附図および表

表1 プライマーリスト1

Symbol	Official gene name	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size	AT*
<i>Hnf4aP1</i>	Hepatic nuclear factor, 4 alpha	<u>NM 008261.2</u>	GGGAGAATGCGACTCTCTAA	GTTGGCAATCTTCTTTGCCC	554 bp	62°C
<i>Hnf4aP2</i>	Hepatic nuclear factor, 4 alpha	<u>AF 015275</u>	CTTGGTCATGGTCAGTGTGA	GTTGGCAATCTTCTTTGCCC	490 bp	65°C
<i>Actb</i>	Actin, beta	<u>NM 007393</u>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	164 bp	60°C

* Annealing temperature

図1

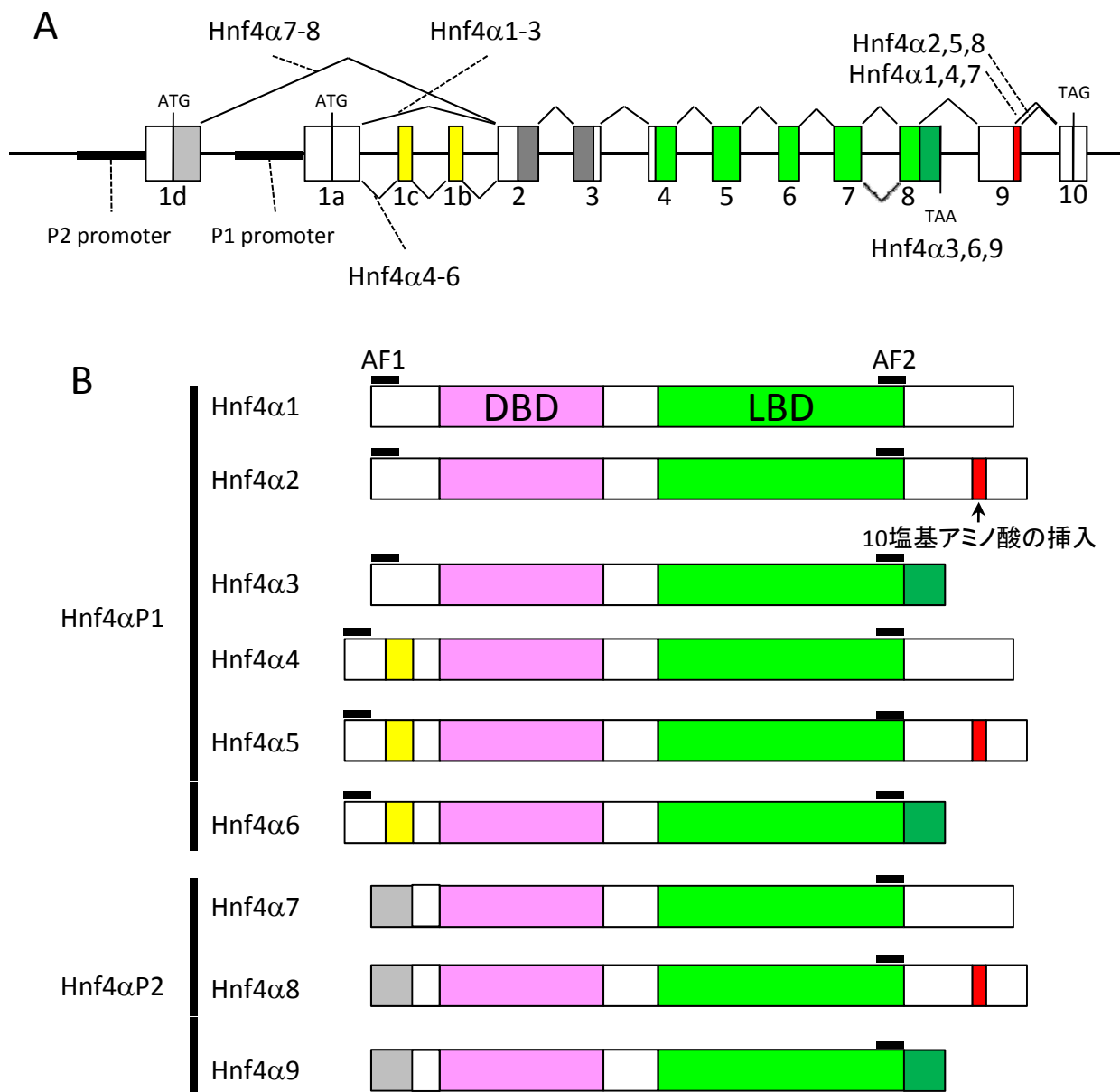


図1 *Hnf4a*スプライシングバリエーションの模式図

A: *Hnf4a*遺伝子の模式図。P1およびP2プロモーター結合領域を太線で、13個のエクソンをボックスで示す。

B: *Hnf4α*スプライシングバリエーションの模式図。

各エクソンをつなぐ折れ線はスプライシングの起こる箇所を示している。選択的スプライシングの結果、Hnf4α1～3（エクソン1A-2）、Hnf4α4～6（エクソン1A-1C-1B-2）、Hnf4α7～9（エクソン1D-2）が合成される。Hnf4α1～6はプロモーターP1を、Hnf4α7～9はプロモーターP2を利用することから、それぞれHnf4αP1、Hnf4αP2に大別される。Hnf4α2、5、8は10塩基アミノ酸の挿入がエクソン9の3'末端に存在する。Hnf4α3、6、9はエクソン8-9間にストップコドンが生じる（**A**, **B**）。

DBD（DNA結合ドメイン）は二つのZincフィンガー構造を持つ。LBD（リガンド結合ドメイン）には転写因子コファクターが結合可能な領域が数多く存在する。AF1（転写活性ドメイン1）はHnf4αP1のN末端に存在するドメインであるが、Hnf4αP2はAF1の存在を欠いている。AF2（転写活性ドメイン2）はHnf4αP1、P2ともにLBDのC末端側に存在する。

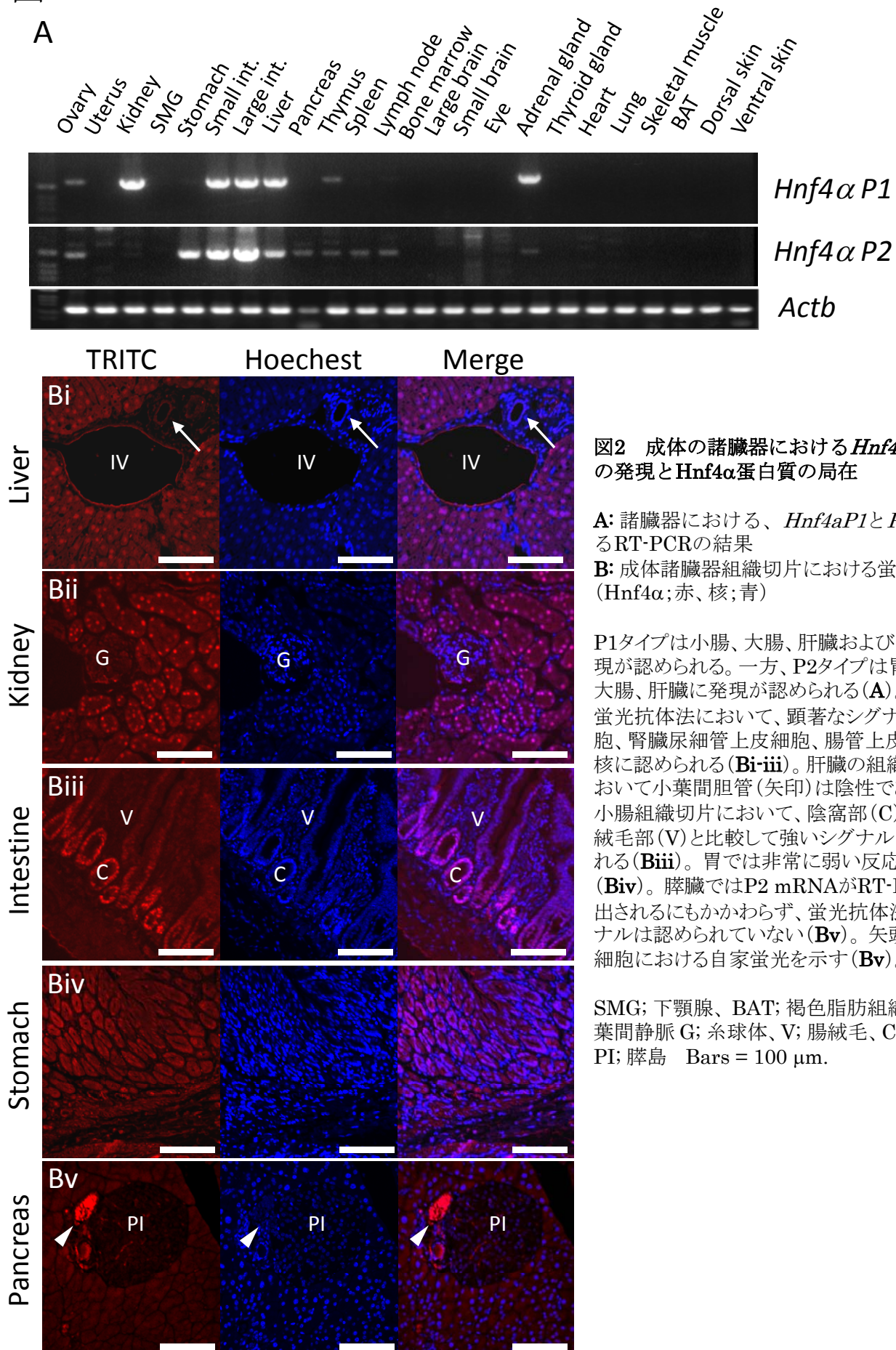


図2 成体の諸臓器における *Hnf4α* 遺伝子の発現と *Hnf4α* 蛋白質の局在

A: 諸臓器における、*Hnf4αP1*と*P2*に対するRT-PCRの結果

B: 成体諸臓器組織切片における蛍光抗体法 (*Hnf4α*; 赤、核; 青)

P1タイプは小腸、大腸、肝臓および腎臓に発現が認められる。一方、P2タイプは胃、小腸、大腸、肝臓に発現が認められる(**A**)。蛍光抗体法において、顕著なシグナルが肝細胞、腎臓尿細管上皮細胞、腸管上皮細胞の核に認められる(**Bi-iii**)。肝臓の組織切片において小葉間胆管(矢印)は陰性である(**Bi**)。小腸組織切片において、陰窩部(C)において絨毛部(V)と比較して強いシグナルが認められる(**Biii**)。胃では非常に弱い反応性を示す(**Biv**)。膵臓ではP2 mRNAがRT-PCRで検出されるにもかかわらず、蛍光抗体法でシグナルは認められていない(**Bv**)。矢頭は血液細胞における自家蛍光を示す(**Bv**)。

SMG; 下顎腺、BAT; 褐色脂肪組織、IV; 小葉間静脈 G; 糸球体、V; 腸絨毛、C; 腸陰窩、PI; 膵島 Bars = 100 μ m.

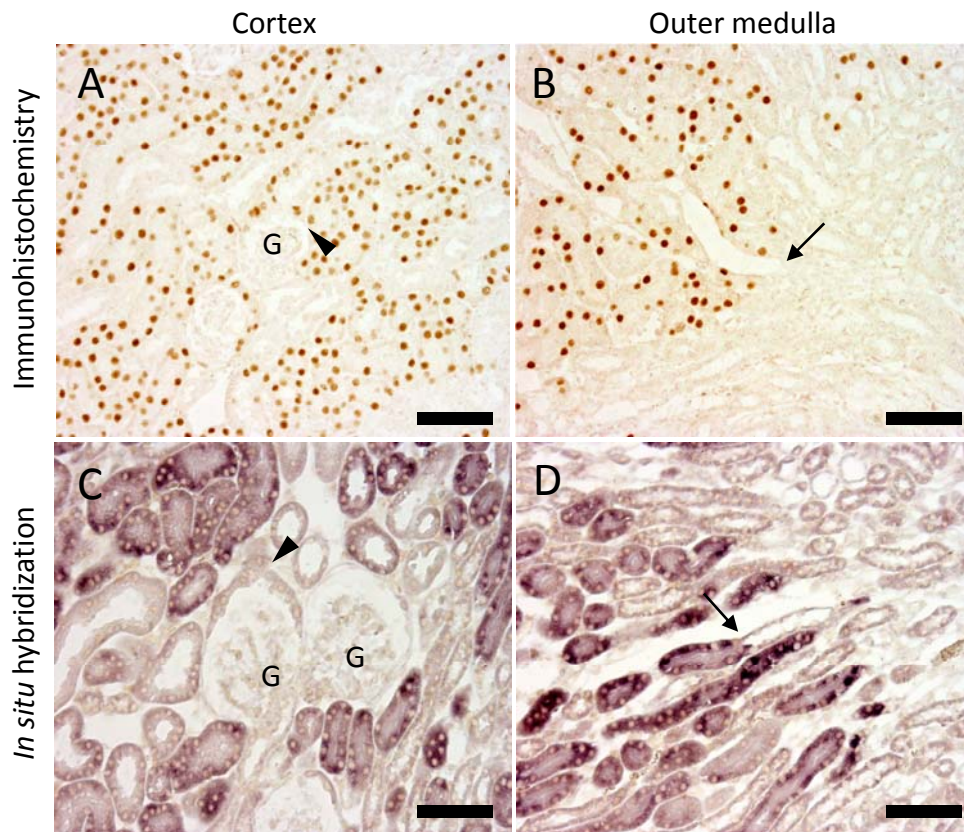


図3 成体マウス腎臓におけるHnf4 α 蛋白質とmRNAの局在

AおよびB: Hnf4 α 蛋白質に対する免疫組織化学法

CおよびD: *Hnf4a* mRNAに対する*in situ* hybridization法

免疫組織化学法の結果、腎臓皮質において、近位尿細管上皮細胞の核に陽性反応が認められる。一方、糸球体（G）では認められない。近位尿細管の糸球体接合部（矢頭）では陽性反応が認められる（A）。腎臓髄質において、近位尿細管で陽性反応が認められる一方、薄壁尿細管移行部（矢印）を境に、薄壁尿細管で陽性反応は認められない（B）。

in situ hybridization法の結果、腎臓皮質において、近位尿細管に陽性反応が認められる。一方、糸球体および近位尿細管糸球体接合部（矢頭）では陽性反応は認められない（C）。腎臓髄質において、近位尿細管で陽性反応が認められる一方、薄壁尿細管移行部（矢印）を境に、薄壁尿細管で陽性反応は認められない（D）。 Bars = 100 μ m

図4

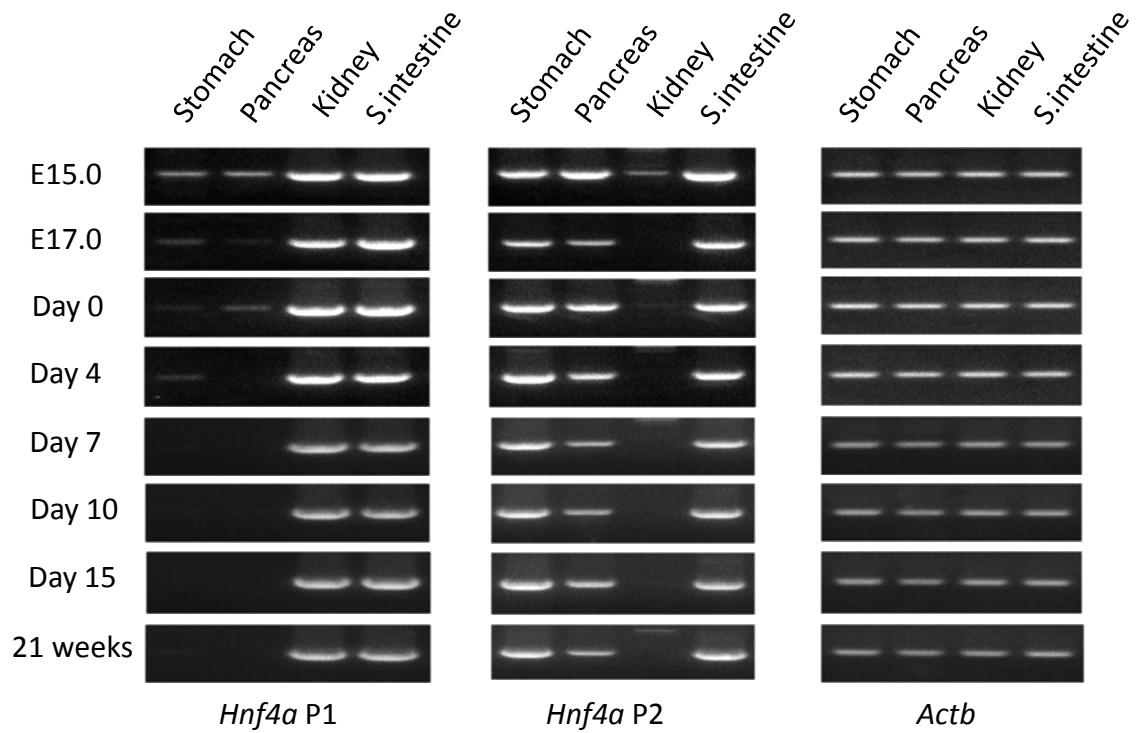


図4 器官形成時における *Hnf4a*P1/P2遺伝子の発現動態

発生過程の胃、膵臓、腎臓および小腸における *Hnf4a*P1およびP2に対するRT-PCR

胃および膵臓ではすべての発育ステージにおいてP2タイプが優位であるが、胎子期においてのみP1タイプの出現が認められる。同様に腎臓においてはすべてのステージでP1タイプが優位であるが、胎子期のみP2タイプの出現が認められる。

図5

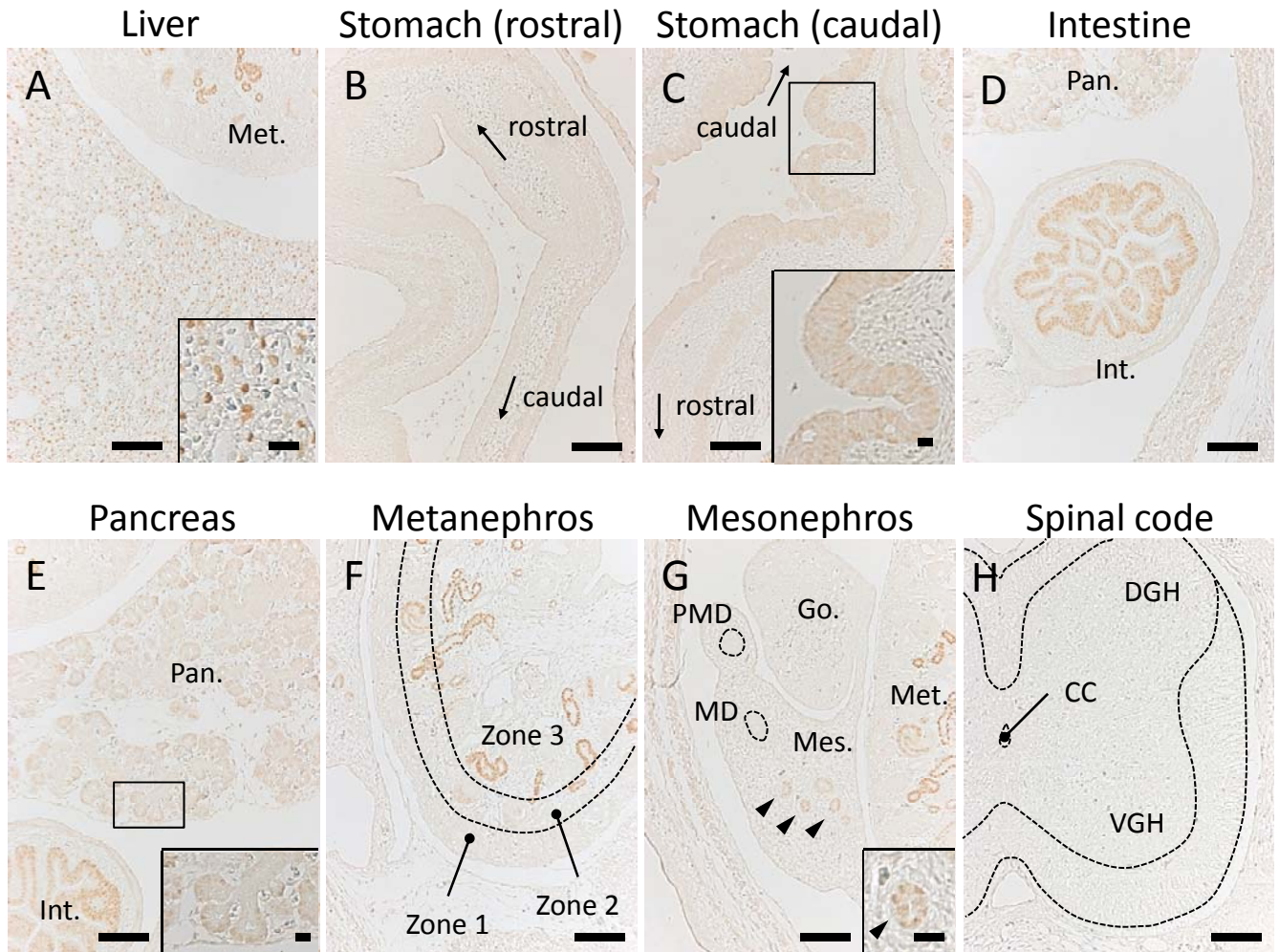


図5 発生中の諸器官におけるHnf4α蛋白質の局在

A-H: E15.5におけるHnf4α蛋白質に対する免疫組織化学法

肝臓において中程度の陽性反応が肝細胞の核に認められる (A)。パネルA中の挿入図は肝細胞の拡大像を示す。胃において噴側部は陰性であるのに対し、尾側部では弱い陽性反応が認められる (B,C)。パネルC中の挿入図は尾側部の胃上皮を示す。腸管 (Int.) において上皮細胞に強い陽性反応が認められる (D)。膵臓 (Pan.) において弱い陽性反応が腺房に認められるが、導管には認められない (E)。パネルE中の挿入図は腺房の拡大像を示す。後腎において、Zone 1 (最外層で尿管芽および後腎間葉凝集体で構成される) で反応は認められなかった。Zone 2 (中間層で後腎小胞、コマ字体、S字体などネフロン前駆構造体を含む) で弱い反応が認められる。また、Zone 3 (最内層、髄質) では尿管細管上皮に強い陽性反応が認められる (F)。中腎において、中程度の陽性反応が中腎細管上皮 (矢頭) に認められるが、性腺 (Go.)、中腎管 (MD) および中腎傍管 (PMD) に反応は認められない (G)。パネルG中の挿入図は中腎細管の拡大像を示す。陰性対照として脊髄を染色した結果、非特異的反応は認められない (H)。Met.; 後腎、CC; 中心管、DGH; 背側灰白角、VGH; 腹側灰白角 Bars = 100 μm (挿入図; Bars = 20 μm)

図6

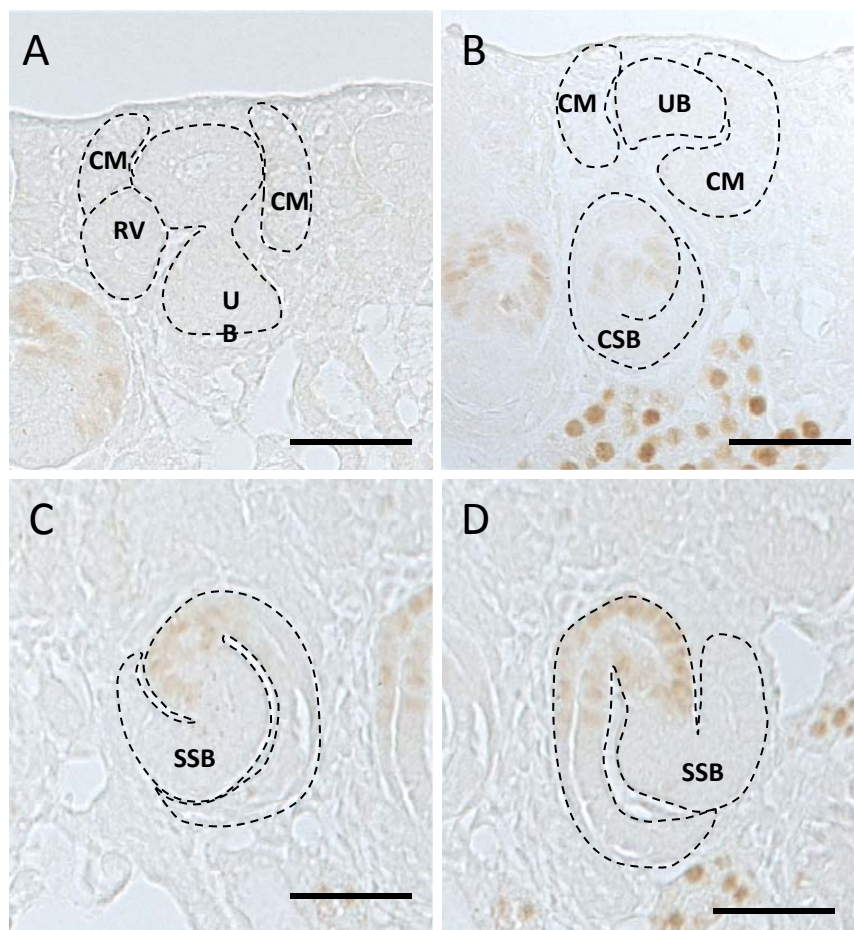


図6 ネフロン形成時におけるHnf4 α 蛋白質の局在

A-D: E17.5後腎におけるHnf4 α 蛋白質に対する免疫組織化学法

尿管芽 (UB)、後腎間葉凝集体 (CM) および後腎小胞 (RV) は陰性である (A)。弱から中程度の陽性反応がコンマ字体 (CSB) およびS字体 (SSB) に認められる (B-D)。

Bars = 50 μ m

図7

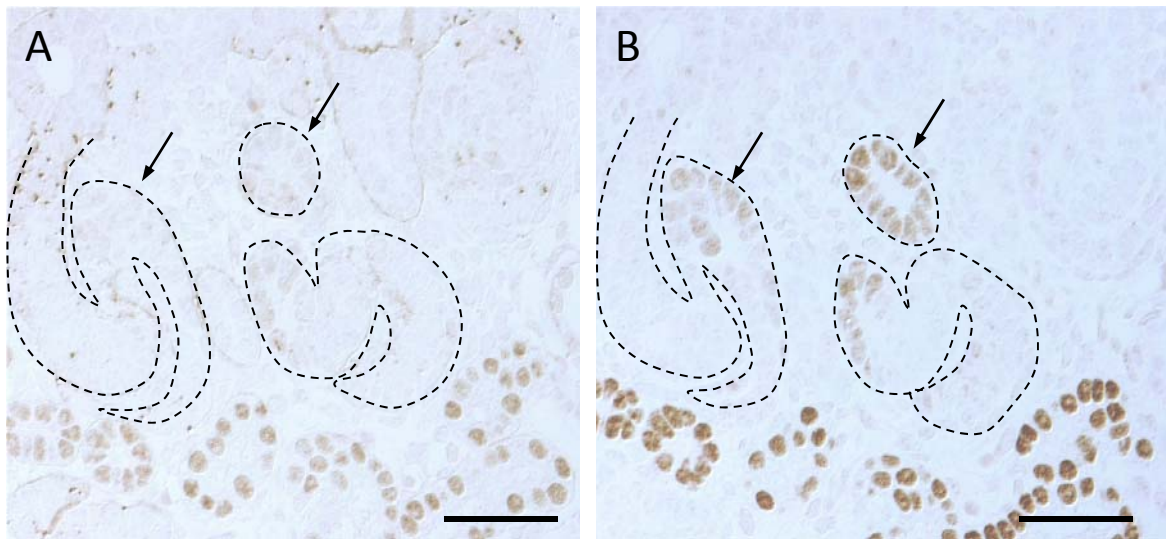


図7 発生中のネフロンにおいて**Hnf4α**蛋白質は**Hnf1α**蛋白質より早く出現する

A-D: E16.0後腎における**Hnf1α**蛋白質 (**A**) または**Hnf4α**蛋白質 (**B**) に対する免疫組織化学法

Hnf1α蛋白質は発生過程の尿細管 (矢印) において、陰性または弱い陽性反応が認められる (**A**)。一方、**Hnf4α**蛋白質は同尿細管において強い陽性反応が認められる (**B**)。

Bars = 50 μm

第二章

マウス後腎間葉凝集体形成における Hnf4 α の機能解析

I 諸論

Hnf4 α 蛋白質は核内転写因子 (NR2A1) の一つで、肝臓および消化管の内胚葉由来上皮のほか腎臓や膵島 β 細胞に局在する蛋白質であるが、その機能に関して様々な報告がある。Hnf4 α は MODY1 としても知られており、本遺伝子の変異は NIDDM の発症を誘導する (Yamagata ら、1996a ; Furuta ら、1997)。さらに肝細胞の分化や脂肪代謝に関連していること (Jung ら、1999 ; Li ら、2000 ; Hayhurst ら、2001)、消化管において intestinal alkaline phosphatase (ALPI) の発現調節に関わっていること (Olsen ら、2005)、培養細胞を用いた実験により、刷子縁形成に関わっていること (Chiba ら、2006) が報告されている。

また、これまでノックアウト (KO) マウスを用いた機能解析も行われており、*Hnf4a* 遺伝子欠損マウスが作出され、卵黄嚢形成不全および初期消化管形成不全に陥ることが明らかにされた (Chen ら、1994)。しかし、*Hnf4a* 遺伝子欠損マウスは腎臓形成以前に胎生致死に陥るため、腎臓発生における機能は調査されていない。その後、肝臓におけるコンディショナル KO マウスである *Hnf4a*^{loxP/loxP} *Alfp*. Cre マウスが作出され、肝臓の上皮化不全がおこることが明らかにされた (Parviz ら、2003)。さらに、膵島 β 細胞におけるコンディショナル KO マウス *Hnf4a*^{flox/flox} *Rip* Cre マウスが、結腸におけるコンディショナル KO マウス *Hnf4a*^{loxP/loxP} *Foxa3* Cre マウスがそれぞれ作出され、前者はインスリン分泌不全、後者は結腸陰窩形成不全、ならびに杯細胞分化不全の形質が明らかとされた (Miura ら、2006 ; Garrison ら、2006)。しかし、腎臓における *Hnf4a* 遺伝子コンディショナル KO マウスは作出されておらず、Hnf4 α の腎臓発生における機能に関しては不明な点が多い。

Hnf4a 遺伝子発現は主に Hnf1 α と Hnf1 β により調節されている。Hnf1 α および Hnf1 β

は Hnf4 α と同様に、NIDDM の発症に関連する MODY3、5 として知られている (Yamagata ら、1996b; Horikawa ら、1997)。Hnf1 α は Hnf6 と、Hnf1 β は GATA binding protein 6 (Gata6)とそれぞれ複合体を形成し、競合的に *Hnf4a* のプロモーター領域に結合する。Hnf4 α は *Hnf1a* および *Hnf1b* のプロモーター領域に結合し遺伝子発現を促進させポジティブフィードバックを形成する。一方、Hnf1 α は Hnf4 α と結合することにより自身の遺伝子発現を抑制するネガティブフィードバックを形成している (Hatzis と Talianidis、2001)。

本章では後腎器官培養系において RNA 干渉法による遺伝子発現抑制を行う実験系を確立し、腎臓発生過程における Hnf4 α 蛋白質の機能を解析するとともに、*Hnf4a* 遺伝子の発現調節ネットワークを明確にするため、Hnf ファミリーの局所遺伝子発現動態を解析した。

II 材料と方法

1. 供試動物

第一章に準ずる。

1. 器官培養

E11.5 および E12.5 の胎子腎臓を実体顕微鏡下で摘出し、Millicell culture plate inserts (Millipore, Billerica, USA)上で培養液表面に保持して行った。培養液は 9.8 mg/ml RITC80-7 を 0.01 M HEPES (pH 7.2)中に溶解したものを濾過滅菌し、1 mg/ml transferrin (Roche, Mannheim, Germany), 4 μ l/ml insulin (Novo Nordisk, Tokyo, Japan), 100 units/ml penicillin(Invitrogen, Carlsbad, USA), 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA)および5% fetal bovine serumを添加したものを使用した。器官培養は 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂、湿潤な環境で行われた。E12.5 の胎子腎臓を X 日間培養した培養後腎を“E12.5 + X”と記述する。

2. 細胞とプラスミド

NIH3T3 細胞（マウス線維芽細胞由来, EC93061524, Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan)は 10% calf serum 添加 Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養を行った。哺乳類動物細胞に *Hnf4 α* 遺伝子を発現させるため、pCI-m*Hnf4 α* プラスミドを作製した。pCI-m*Hnf4 α* プラスミドは、TA cloning pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA)によりクローニングされたマウス *Hnf4 α* 遺伝子の蛋白質翻訳領域全長 EcoRI 断片を、pCI-neo vector (Promega)に挿入することにより作製された。マウス *Hnf4 α* 遺伝子の蛋白翻訳領域全長 cDNA はマウス肝臓 cDNA を鋳型にした PCR 反応

(forward primer, 5'-CTTGGTCATGGTCAGTGTGA-3'; reverse primer, 5'-AGCTTGCTAGATGGCTTCTTG-3', GeneBank accession number NM008261)を用いた PCR で得た。pCI-mHnf4 α プラスミドの細胞への導入は Fugene 6 (Roche)により行った。すなわち、NIH3T3 細胞は 6 穴プレートで 2.0ml の培養液中で培養し、細胞密度が約 70%になるように準備した。1.0 μ g プラスミドと 3.0 μ l Fugene 6 試薬を 97 μ l Opti-MEM 培養液(Invitrogen)に添加し、15 分間静置した後、細胞培養上清中に加えた。その後、1.0 mg/ml geneticin G418 (Invitrogen)添加培地中で培養し、プラスミドの導入されていない細胞を除去し、NIH3T3^{Hnf4 α +} 細胞株を作製した。RT-PCR により NIH3T3^{Hnf4 α +} 細胞株が Hnf4 α 遺伝子の発現を有していることを確認した。

3. Small interfering RNA (siRNA) transfection

siRNA は、*Silencer*^R pre-designed siRNAs (AM16704; Applied Biosystem, Foster City, USA) Hnf4 α の異なる配列をターゲットにした三種類の siRNA#1, #2, #3 を使用した。siRNA#1 の認識する配列は exon 2 に、siRNA#2 および#3 の認識する配列は exon 10 に存在する。siRNA#1, #2, #3 は Applied Biosystem 社の siRNA データベースに、それぞれ ID 番号 62230, 158083, 62318 として登録されている。陰性対照として、どの遺伝子も認識しない、*Silencer*^R negative control siRNA (AM4611; Applied Biosystem, Foster City, USA)を使用した。培養細胞への siRNA トランスフェクションは siPORTTM Neo FXTM (Applied Biosystem, Foster City, USA)のプロトコルに従って行われた。細胞は 6 穴プレートの培養液 2.5 ml 中に培養し、細胞密度が 70%程度のものを実験に使用した。25 pmol siRNA と 5.0 μ l Neo FX 試薬を 200 μ l Opti-MEM 培養液(Invitrogen)に添加し、10 分間静置した後、細胞培養上清中に加えた。24 時間後、上清を除き mRNA を抽出し解析に供した。

培養後腎への siRNA トランスフェクションは siPORTTM siRNA Electroporation

Buffer (Applied Biosystem)のプロトコルに従って行われた。すなわち、200 pmol siRNA を 75 μ l の electroporation バッファー に添加し、培養後腎を浸漬した後、ECMR[®] 830 (BTX, San Diego, USA)により 150 V、100 μ s の電気パルスで単回刺激を行った。刺激後、反応液中に 37 °C 10 分間静置した後、通常の培養液に移し替え、培養 24 時間後、あるいは 48 時間後に解析を行った。培養後腎への siRNA 導入効率を確認するため、*Silencer[®]* FAM[™] labeled negative control siRNA (AM4620; Applied Biosystem) により視覚化した。

4. Laser micro dissection (LMD)

E13.5-E15.5 胎子を OCT compound (Sakura Finetec, Torrance, USA)中に浸漬し、液体窒素で冷却した-160 °Cイソペンタン中で凍結し、試料を作製した。5 μ m 厚凍結切片を LMD film (Meiwafosis, Osaka, Japan)でコートしたスライドグラスに貼り付け、風乾した後、氷冷メタノールで 3 分間固定した。1%トルイジンブルー染色液で 10 秒間染色した後、レーザーマイクロダイセクション顕微鏡 Ls-Pro300 (Meiwafosis)により、光学顕微鏡下で観察しながら、目的の領域を切り取り、1.5 ml エッペンチューブに回収した。回収した試料は RNAqueous kit (Applied Biosystem)を用いて RNA 抽出を行った。すべての操作は RNA 分解酵素非存在下で行われた。

5. RT-PCR および定量的 real-time PCR

組織および細胞からの総 RNA 抽出は第一章と同様に行った。LMD サンプルからの抽出は RNAqueous kit (Applied Biosystem)により行った。10 μ g 総 RNA に 2 unit の Turbo DNase (Applied Biosystem) を加え、37°C 30 分インキュベートすることにより、混入ゲノム DNA を除去した。逆転写反応および PCR は第一章と同様に行った。

使用したプライマーは表 2 に示す。

定量的 real-time PCR は Brilliant II SYBR[®] Green QPCR master mix (Stratagene, La Jolla, USA)を使用したサイバーグリーン法により行った。反応液は一回反応 (20 μ l) あたり、1.0 mg cDNA、10 pmol forward / reverse primers、10 μ l master mix の組成に調製した。反応液容量補正として ROX 色素 (master mix 中に一定量含まれる) を、総鋳型 cDNA 量補正としてハウスキーピング遺伝子 *Actb* 発現量により補正を行った。反応および検出は Mx 3000P (Stratagene)により行い、解析ソフトウェア Mx PRO (Stratagene)により遺伝子発現量を算出した。

6. 組織学的解析

a) 一般組織学的解析

第一章と同様に行った。

b) 免疫組織化学

第一章と同様に行った。使用した抗体は項目 8 を記す。

8. 抗体

一次抗体として 600 倍希釈した goat polyclonal anti-Hnf4 α (sc-6556, Santa Cruz Co. Ltd, Santa Cruz, USA)、200 倍希釈した rabbit polyclonal anti-Hnf4 α (#3113, Cell Signaling, Danvers, USA)、200 倍希釈した rabbit polyclonal anti-Aqp1 (AB3065, Millipore)、100 倍希釈した rabbit polyclonal anti-Pax2 (71-6000, Invitrogen)、600 倍希釈した rabbit polyclonal anti-Wt1 (CA1026, EMD, Darmstadt, Germany)、および 300 倍希釈した rabbit polyclonal anti-ssDNA (A4506, DAKO)を使用した。二次抗体として 100 倍希釈した biotinized rabbit polyclonal anti-goat IgG (Millipore)、あ

るいは biotinated goat polyclonal anti-rabbit IgG (Funakoshi, Tokyo, Japan)を使用した。

Ⅲ結果

1. 発生過程の腎臓における Hnf4 α 蛋白質の局在

まず、Hnf4 α 蛋白質の局在について成体マウスと胎子マウスの腎臓（後腎）で免疫組織化学により検索した。成体の腎臓では aquaporin 1（Aqp1）陽性の近位尿細管上皮細胞の核、および糸球体のボウマン嚢壁細胞の核に分布がみられた（図 8A～D）。E12.5 の後腎は、尿管芽（UB）と後腎間葉凝集体（CM）で構成されるが、UB および CM を構成する細胞の核に陽性反応は認められなかった（図 8E, F）。しかし一部の CM に含まれる細胞の細胞質に陽性反応が検出された（図 8F 挿入図）。E15.5 の後腎では、UB、CM に加え、コンマ字体（CSB）、S 字体（SSB）および未成熟なネフロンにより構成されているが、Hnf4 α 蛋白質の分布は未成熟ネフロンの核および CSB、SSB を構成する一部の細胞に認められた（図 8I, J）。しかし、青い点線で囲まれる CM の領域に陽性反応は認められなかった（図 8I, J）。E12.5 の CM にみられた反応（図 8F）は、E15.5 の CM では認められなかった（図 8I, J）こと、また本来発現する核内に分布せず、細胞質に分布していた（図 8F 挿入図）ことから非特異的反応と判断した。Hnf4 α 蛋白質に対する免疫組織化学法は異なる 2 種類の抗ヒト Hnf4 α 蛋白質抗体により実験を行ったが、いずれも同様の結果が得られた。以上の結果は第一章の結果と一致した。

2. *Hnf4a* 遺伝子抑制により CM 領域にアポトーシスが誘導される

腎臓の発生期間中の Hnf4 α 蛋白質の機能を明らかにするため、器官培養と siRNA 法を組み合わせた遺伝子抑制系を確立した。まず、器官培養中に分離した後腎が正常に発育していることを確認するため、培養後腎を実体顕微鏡による観察ならびに、組織学的解析をおこない、RT-PCR により *Hnf4a* 遺伝子の発現動態を検索した（図 9）。培養後

腎のサイズおよび尿管芽の分枝数は、日を追うごとに増加していた（図 9C～F）。E13 + 3 および E13 + 5 の培養後腎で、さまざまなステージのネフロン形成が観察され、細胞死に陥ったネフロンの組織像は認められなかった（図 9G～I）。E13 + 3 および E13 + 5 の培養後腎で、生体内と同様に、CSB、SSB を構成する細胞の一部および未熟な尿細管の上皮細胞の核に Hnf4 α 蛋白質が分布していた（図 9G～I）。さらに、E12.5 + 3 の培養後腎が E15.5 と同レベルの Hnf4 α 遺伝子発現量を示していた（図 9J）。これらの結果から、培養後腎が適切に発育していると判断した。

次に、siRNA（#1, #2, #3）の遺伝子発現抑制効果を、NIH3T3^{Hnf4 α +} 培養細胞を用いて解析した。もっとも強い抑制効果は siRNA #3 で認められ、陰性対照 siRNA 導入群と比較して、約 70%、mRNA 発現が減少していた（図 10I）。さらに、siRNA を培養後腎に導入する際の組織への浸透効率を確認するため、FAM 標識 negative control siRNA を導入し、24 時間後に蛍光顕微鏡下で観察した結果、後腎全体に siRNA が浸透している様子が観察された（図 10K）。これらの結果から、以下の培養後腎における Hnf4 α 遺伝子抑制実験には、もっとも抑制効果の強い siRNA#3 を用いた。E12.5 + 1 の培養後腎に CSB、SSB の形成が認められた（結果には示していない）ことから、siRNA 導入のタイミングを E12.5 とし、24 時間後（図 10A～F）あるいは 48 時間後（図 10G, H）に実体顕微鏡下で観察を行った。Hnf4 α siRNA 導入 E12.5 後腎は、negative control siRNA 導入後腎と比較して、約 30% の遺伝子抑制効果が認められた（ $P < 0.05$ ）（図 10J）。実体顕微鏡下で培養後腎全体の面積を比較した結果、siRNA 導入群で約 8% の減少が認められたが、小葉の数（尿管芽分枝に後腎間葉組織の凝集したものを一葉とした）に差は認められなかった（図 10L, M）。より早いタイミングで遺伝子抑制を行うため、E11.5 後腎から培養を行い、最初のコンマ字体の形成が認められた培養三日目に siRNA を導入し、導入 24 時間後、および 48 時間後に実体顕微鏡下で観察を行った。Hnf4 α siRNA 導入 E11.5 + 3 培養後腎は 24 時間、48 時間後にサイズの減少が認められた（図 11）。

siRNA 導入 E12.5 後腎の組織標本を作成し HE 染色を行った結果、陰性対照の CM では、規則正しく三層から五層に細胞が整列している様子が認められた (図 12A, C)。一方、*Hnf4a* siRNA 導入後腎の CM では、細胞の配列の乱れ、および核の縮小と濃縮が認められた (図 12B, D)。HE 染色観察で認められた核の縮小と濃縮を呈した細胞 (図 12B, D) が、アポトーシス細胞であることを証明するため、免疫組織化学法により、アポトーシス細胞マーカーである ss-DNA の検出を行った。陰性対照後腎では、被膜下にわずかな ss-DNA 陽性細胞が出現するのみであることに對し、*Hnf4a* siRNA 導入後腎では、CM に多数の ss-DNA 陽性細胞が現れている像が観察された (図 12E, F)。これらの結果から、*Hnf4a* は CM の分化に必要不可欠であり、その発現減少により CM に細胞死が誘導されていることが示唆された。一方、陰性対照後腎および *Hnf4a* siRNA 導入後腎の両者で、正常な CSB および SSB が認められた (図 12C, D)。さらに両後腎の CSB・SSB に ss-DNA 陽性反応は認められず (図 12E, F)、CSB および SSB を含む髄質には *Hnf4a* 遺伝子発現抑制の影響は認められなかった。

3. *Hnf4a* は CM において発現を開始する

発生過程の腎臓の遺伝子発現抑制の結果、*Hnf4a* が CM の分化にかかわっている可能性が示されたが、*Hnf4a* 蛋白質は CM には検出されなかった。この矛盾を解決するため、*Hnf4a* の CM における遺伝子発現を LMD-RT-PCR により解析した。図 13A および 13B のように、MM、CM、ならびに CSB/SSB を LMD 顕微鏡下で切り取り、LMD 試料とした。LMD 試料を用いて Pax2 および Wt1 遺伝子発現量を調べたところ、いずれも MM で mRNA 発現が検出されず、CM および CSB/SSB で mRNA 発現が検出された (図 13E)。この結果は、それぞれの蛋白質の分布 (図 13C, D) と一致した。すなわち、LMD が適切に行われ、目的の領域を回収できたことを示している。

この LMD 試料を使用して、MM、CM および CSB/SSB において、*Hnf4a* 遺伝子発

現を調べるため、*Hnf4a*1~9 に共通する配列上に作成したプライマーを使用した RT-PCR を行なった。*Hnf4a* mRNA は CM および CSB/SSB に検出され、MM には検出されなかった (図 13F)。*Hnf4a* mRNA 発現レベルは CM で CSB/SSB よりも低い値であった (図 13G)。

ここでネフロン形成過程における、*Hnf4a* の発現動態をまとめると、MM において mRNA、蛋白質ともに検出されず、CM において、mRNA 発現は検出されるが、蛋白質の分布は検出されなかった。このことは、CM に *Hnf4a* mRNA が存在することから、免疫組織化学法では検出できない程度の、微量な *Hnf4a* 蛋白質が分布していると解釈した。さらに、CSB/SSB においては mRNA の発現が検出され、蛋白質の分布も構成する細胞の一部に認められた。

ネフロン形成過程で発現する *Hnf4a* 遺伝子の転写産物が P1、P2 どちらのタイプであるか調べるため、P1、P2 それぞれ異なる配列上に作成したプライマーを使用した nested PCR 法を行った (図 14A, B)。P1 タイプは、一回目の PCR で CSB にのみ検出されるのに対し、二回目の PCR では CM および CSB に検出された。一方 P2 タイプは、一回目の PCR では発現が認められないのに対し、二回目の PCR では CM にのみ発現が認められた。この結果から、P1 タイプは CM で発現を開始し、CSB、SSB ではより強く発現するのに対し、P2 タイプは CM で一過性に発現し、CSB、SSB では消失することが示唆された。

Hnf4a 遺伝子発現がどのように調節されているか明らかにするため、*Hnf4a* 遺伝子上流因子である *Hnf1a*、*Hnf1b*、*Hnf6*、および *Gata6* 遺伝子の発現を調べた。その結果、*Hnf1a* は CSB/SSB で検出されたのに対し、*Hnf1b* は CM および CSB/SSB に発現が認められた (図 14C)。

IV 考察

本章では後腎の初期発生過程において siRNA を使用した *Hnf4a* 遺伝子発現抑制モデルの解析、および LMD-RT-PCR を使用した *Hnf* ファミリーの局所遺伝子発現解析を行った。本研究の結果から以下の 2 つの仮説を提唱する。

- 1) *Hnf4a* 遺伝子の発現はネフロン形成過程において CM ステージから開始され、CM を構成する細胞の生存に関わっている。
- 2) CM ステージにおいて *Hnf1b* 遺伝子発現に伴い *Hnf4aP1* および *P2* 遺伝子発現が誘導され、CSB/SSB ステージにおいて *Hnf1a* 遺伝子発現に伴い *Hnf4aP1* 遺伝子のみの発現が誘導される。

本研究では、*Hnf4a*-siRNA で処置した後腎において CM の細胞の配列が乱れ、多数のアポトーシス細胞が観察された。この結果から *Hnf4a* 遺伝子が CM に存在する前尿細管構造体に分化する細胞のアポトーシスを抑制していることが考察された(Herzlinger ら、1992 ; Sariola ら、2002 ; Nishinakamura と Osafune、2006 ; Boyle ら、2008 ; Couillard と Trudel、2008)。CM において免疫組織化学法で蛋白質が検出されなかったのに対し(図 8)、LMD-RT-PCR で mRNA の発現が検出されたことから(図 13, 14)、CM の細胞は免疫組織化学法では検出できない程度の *Hnf4α* 蛋白質発現を維持しつつ、CM の細胞生存に機能していると考えられた。また、*Hnf4α* 蛋白質発現 HEK293 細胞のマイクロアレイ解析において、*Hnf4α* がいくつかのアポトーシス・細胞増殖関連因子の発現を調節していることも、この考えを支持する (Lucas ら、2005)。

この *Hnf4a* 遺伝子抑制モデルは、*Hnf4α* が CM における細胞生存に関わっているという新たな可能性を明らかにした。しかし、*Hnf4a*-siRNA 処置後腎においても正常な

CSB/SSB 形成が見られ、CSB/SSB における機能を明らかにするには至らなかった。

Hnf4 α 蛋白質は CSB/SSB において細胞間接着や微絨毛の形成および恒常性維持、すなわち、近位尿細管上皮細胞としての性格決定に関連していることが推測される (Chiba ら、2006; Olsen ら、2005; Grewal ら、2005; Hayhurst ら、2001)。その証明には、機能解析系を詳細に調査する必要がある。

ネフロン形成過程腎臓の各エリアでの *Hnf4a* 遺伝子発現を LMD-RT-PCR により検索した結果、CM では *Hnf4a* mRNA の P1 および P2 タイプが、CSB/SSB においては P1 タイプが発現することが明らかになった。この結果は、前章で得られた、成体の腎臓では P1 タイプのみが発現し、胎子期においてのみ P2 タイプが発現するという結果と合致する。基本的に Hnf4 α 蛋白質は 2 つの転写活性ドメイン (activation factor domain; AF1 および AF2 ドメイン) および 1 つの転写抑制ドメインを含有しているが (Hadzopoulou-Cladaras ら、1997)、Hnf4 α P2 蛋白質は AF1 ドメインを持たず、その転写活性は Hnf4 α P1 より弱いと考えられてきた (Torres-Padilla ら、2002 ; Eeckhoutte ら、2003 ; Ihara ら、2005)。一方、DNA 結合ドメイン、ならびにリガンド結合ドメインのアミノ酸配列は両者同じである。さらに、Hnf4 α 蛋白質は自身の遺伝子プロモーター領域に結合することが報告されている (Bailly ら、2001)。これらのことを併せ考えると、Hnf4 α P2 蛋白質はネフロン形成初期段階において、強力な転写活性を持つ Hnf4 α P1 蛋白質を発現させるため、P1 タイプの転写を活性化させる、いわばアクセレーターとして機能していることが推測される。

さらに、*Hnf4a* の上流因子の発現を LMD-RT-PCR により検索した結果、*Hnf1b* 遺伝子の発現が CM で、*Hnf1a* および *Hnf1b* 遺伝子の発現が CSB/SSB で検出された。この結果は、過去に報告された *in situ* hybridization で検出した *Hnf1a*、*Hnf1b* の分布と一致していた (Lazzaro ら、1992)。成体の腎臓では *Hnf1b* 遺伝子はすべての尿細管セグメントで見られるのに対し、*Hnf1a* 遺伝子は *Hnf4a* 遺伝子発現と一致して近位

尿細管においてのみ発現する (Coffinier ら、1999a ; Jiang ら、2003)。さらに、*Hnf1a*^{-/-} マウスは肝臓において正常レベルの *Hnf4a* 遺伝子発現と *Hnf1b* 遺伝子発現の活性化が認められるのに対し、*Hnf1b*^{-/-} マウスは *Hnf1a* および *Hnf4a* 遺伝子の発現も欠いており、内臓内胚葉の形成不全に陥る (Pontogilo ら、1996 ; Barbacci ら、1999 ; Coffinier ら 1999b)。これらの知見は Hnf1β が Hnf1α より、胎子形成における分子カスケードの上流に存在する因子であることを示す証拠である。また、肝細胞において *Hnf4a* のプロモーターは Hnf1α、あるいは Hnf1β により、競合的に占有される (Hatzis ら、2001)。これらの知見を本章の結果と照らし合わせて考えると、*Hnf4a* の発現はネフロン形成ステージごとに二つの異なった調節を受け、異なる役割を持っている可能性が考察される。すなわち、CM 形成ステージにおいて *Hnf4a* P1 および P2 mRNA の転写が Hnf1β により誘導され、CSB/SSB 形成においては *Hnf4a* P1 mRNA の転写が Hnf1α により誘導される可能性である。この可能性を証明するためには、LMD サンプルを用いてクロマチン免疫沈降法を行うことにより、それぞれのネフロン形成ステージにおいて Hnf1α あるいは Hnf1β 蛋白質のどちらが *Hnf4a* 遺伝子のプロモーター領域を占有しているか明らかにする必要があるであろう。

本章の結論として、*Hnf4a* 遺伝子発現が初期腎臓発生における細胞の生存に関わっていることを提唱する。また本章で作成された *Hnf4a* 遺伝子発現抑制培養後腎モデルにおいて CM 領域の細胞配列が乱れたことから、*Hnf4a* 遺伝子発現は初期 MET に関連している可能性が示唆された。この可能性の検証は、後腎発生における MET の詳細を検索した結果とともに次章に掲載する。

V 小括

*Hnf4α*は胎子発生および器官発生に必要とされる転写因子の一つである。成熟したマウス腎臓において、*Hnf4a* 遺伝子は近位尿細管に高発現している。本遺伝子の発現は胎子期に始まるにも関わらず、腎臓発生における機能はこれまでほとんど明らかにされていない。本章では、培養したマウス後腎において RNAi 法による遺伝子抑制を行うことで、*Hnf4α*の機能を検索することを目的とした。さらに腎臓発生過程の微小環境における *Hnf4a* 遺伝子発現動態を LMD 法により検索した。遺伝子発現抑制の結果、CM において、細胞の配列が乱れ、多数のアポトーシス細胞が出現することが明らかとなった。さらに LMD-RT-PCR において凝集前の MM では発現が認められず、CM においては *Hnf4aP2* のみの発現が、コンマ字体、S 字体においては *P1*、*P2* 両タイプの発現が認められた。さらに CM においては *Hnf4α*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。これらの結果から、ネフロン形成過程において *Hnf4a* 遺伝子発現が CM を構成する細胞の生存に重要な働きを持っていること、さらにその遺伝子発現は *Hnf1β*に誘導されている可能性が示された。

附図および表

表2 プライマーリスト2

Symbol	Official gene name	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size	AT ^{*1}
<i>Hnf4a</i> (1)	Hepatic nuclear factor, 4 alpha	<u>NM 008261.2</u>	GGTCAAGCTACGAGGACAGC	ATGTACTTGGCCCACTCGAC	192 bp	62°C
<i>Hnf4a</i> (2) ^{*2}	Hepatic nuclear factor, 4 alpha	<u>NM 008261.2</u>	GGGAGAATGCGACTCTCTAA	GTTGGCAATCTTCTTTGCCC	554 bp	62°C
<i>Hnf4a</i> (3) ^{*3}	Hepatic nuclear factor, 4 alpha	<u>AF 015275</u>	CTTGTCATGGTCAGTGTGA	GTTGGCAATCTTCTTTGCCC	490 bp	65°C
<i>Hnf4a</i> (4)	Hepatic nuclear factor, 4 alpha	<u>NM 008261.2</u>	CTGCAGGTTTAGCCGACAAT	TCTGCTGGGACAGAACCTCT	208 bp	60°C
<i>Hnf1a</i>	HNF 1 homeobox alpha	<u>NM 009327</u>	TCACAGACACCAACCTCAGC	GAGGACACTGTGGGACTGGT	201 bp	62°C
<i>Hnf1b</i>	HNF1 homeobox beta	<u>NM 009330</u>	TGGTACGTCAGAAAGCAACG	GGTCGTAGGCCTGGTACAAA	243 bp	60°C
<i>Hnf6</i>	One cut domein, family member 1	<u>NM 008262</u>	CCCTGGAGCAAACCTCAAGTC	ACGTCTGTGAAGACCAGCCT	178 bp	60°C
<i>Gata6</i>	GATA binding protein 6	<u>NM 010258</u>	GCCAACTGTCACACCACAAC	TGTTACCGGAGCAAGCTTTT	189 bp	60°C
<i>Wt1</i>	Wilms tumor 1 homolog	<u>NM 144783</u>	ATCCGCAACCAAGGATACAG	TGCAACTGTCAGTAGGGGTGT	199 bp	60°C
<i>Pax2</i>	Paired box gene 2	<u>NM 011037</u>	CAAAGTTCAGCAGCCTTTCC	GTTAGAGGCGCTGGAAACAG	114 bp	60°C
<i>Actb</i> ^{*4}	Actin, beta	<u>NM 007393</u>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	164 bp	60°C

Details for *Hnf4a* (1), (2), (3) and (4) are shown in Fig. 14.

PCRs were carried out with 35 cycles (for tissue sample) or 50 cycles (for LMD sample)

The nested PCR were carried out with 35-35 cycles.

^{*1} Annealing temperature

^{*2-4} These primer sets correspond with *Hnf4aP1*, *Hnf4aP2* and *Actb* of Table 1, respectively.

図8

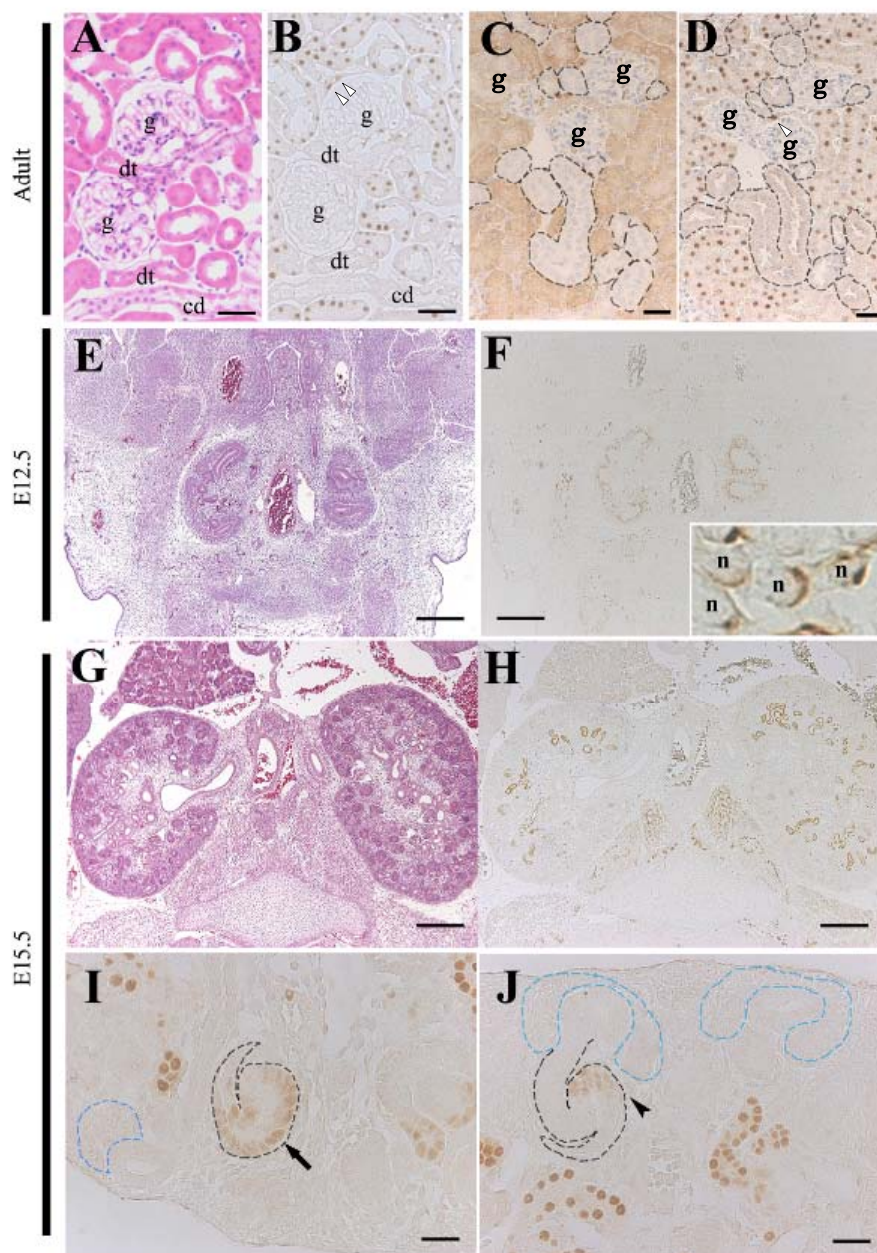


図8 成体および胎子マウス腎臓におけるHnf4 α 蛋白質の局在

A, E, G: HE染色像

B, D, F, H-J: Hnf4 α 蛋白質に対する免疫組織化学法

C: Aqp1蛋白質（近位尿細管マーカー）に対する免疫組織化学法

成体マウスにおいて、Hnf4 α 蛋白質は近位尿細管の核に認められるが、糸球体（g）、遠位尿細管（dt）、集合管（cd）には認められない（A,B）。連続切片で、Aqp1陽性の尿細管にはHnf4 α の分布が認められるが、Aqp1陰性の尿細管（点線で囲まれている）にはHnf4 α の分布は認められない（C,D）。パネルB,D中の白矢頭はボウマン嚢壁細胞の核にみられたHnf4 α の陽性反応を示す。E12.5胎子腎臓において、後腎間葉凝集体の細胞の細胞質に反応が認められる（E,F）。パネルF中の挿入図は後腎間葉凝集体（細胞の核をnで示す）の拡大像を示す。E15.5胎子腎臓において、コンマ字体（矢印）またはS字体（黒矢頭）の一部、および未成熟な尿細管に陽性反応が認められるが、後腎間葉凝集体（青点線で囲まれる領域）に反応は認められない（G,J）。Bars = 20 μ m (A-D,I-J), 100 μ m (E-H)

図9

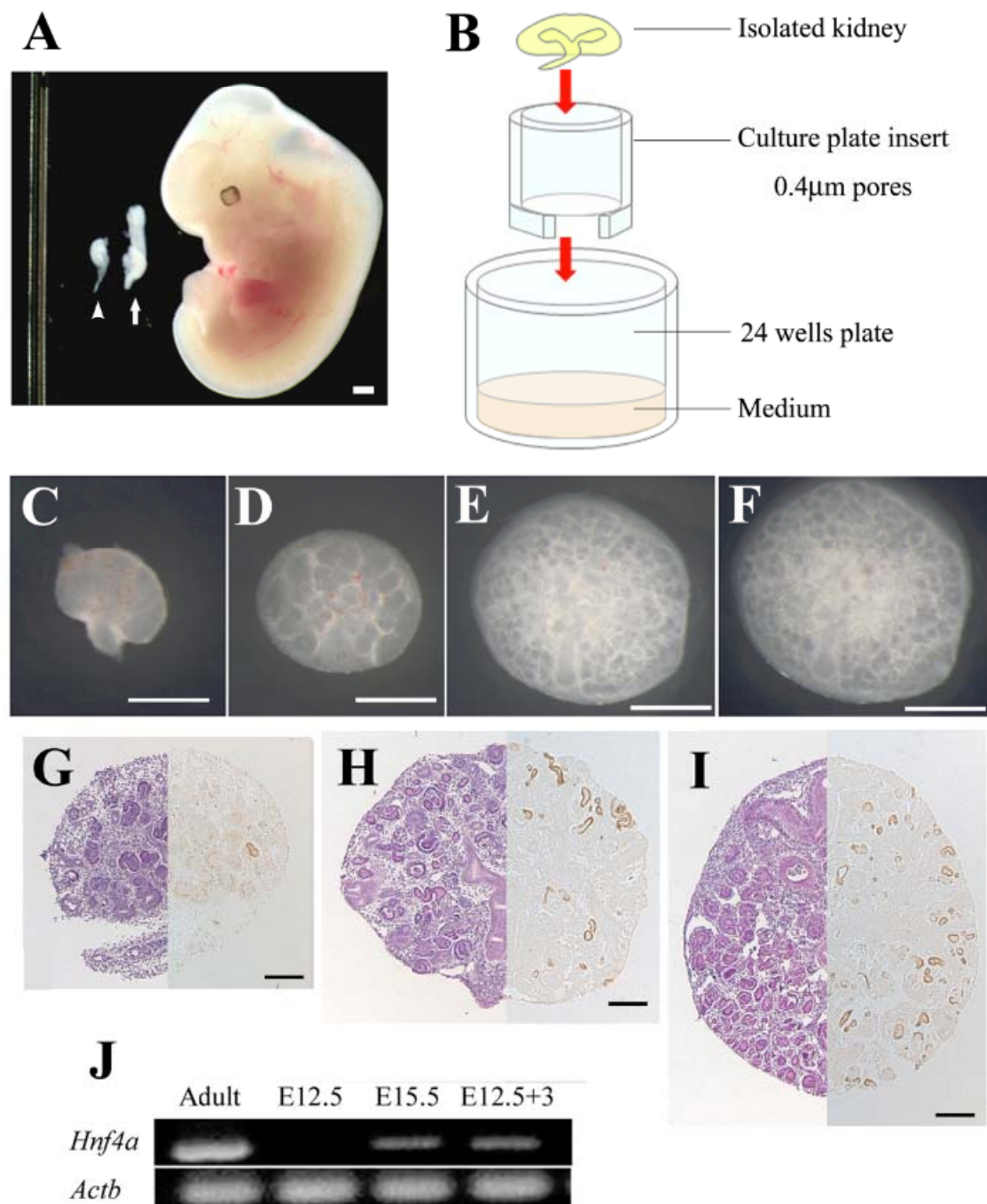


図9 後腎器官培養

A: E12.5胎子全身、後腎（矢頭）および中腎+後腎（矢印）

B: 培養系模式図

C-F: 培養後腎実体顕微鏡写真 E12.5+0 (**C**), +1 (**D**), +3 (**E**), +5 (**F**)

G-I: 培養後腎のHE染色像（右）およびHnf4α蛋白質に対する免疫組織化学法（左）

E13.5+1 (**G**), +3 (**H**), +5 (**I**)

J: *Hnf4a*および*Actb*に対するRT-PCR

培養後腎はHnf4αの局在を伴い、正常に発育していることが確認される（**C-I**）。E12.5+3はE15.5と同等の遺伝子発現量が認められる（**J**）。”E12.5+X”はE12.5胎子後腎の培養X日後を示す。Bars = 500 μm (**A, C-F**), 200 μm (**G-I**)

図10

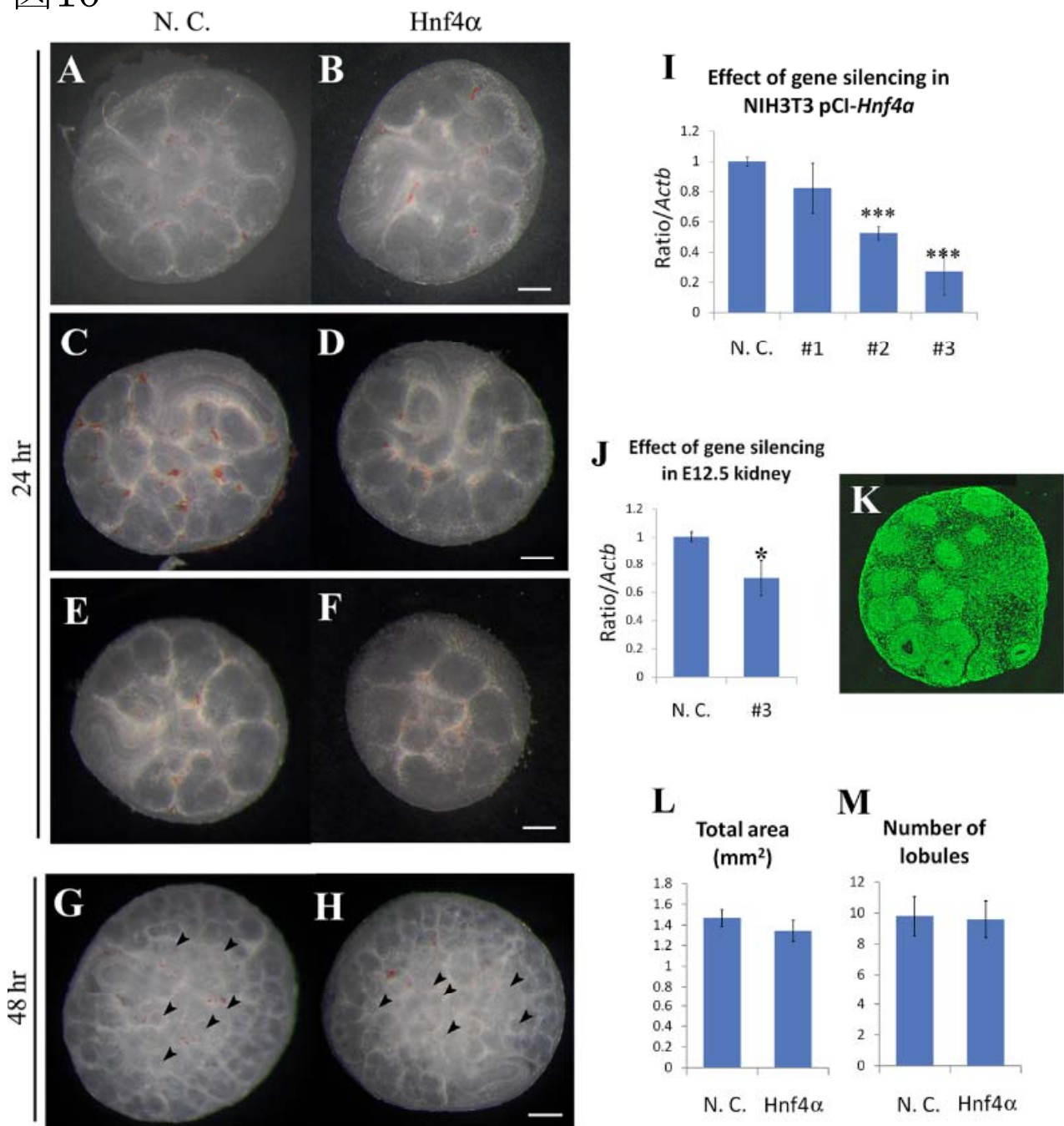


図10 E12.5胎子腎臓における遺伝子発現抑制効率の検証

A-H: *Hnf4a* siRNA処理 (*Hnf4α*) およびネガティブコントロールsiRNA処理 (N. C.) 胎子後腎培養24時間後 (**A-F**) および培養48時間後 (**G-H**)

I: siRNA処理NIH3T3^{*Hnf4a*+}培養細胞における*Hnf4a*遺伝子発現の定量 (n = 3ずつ、平均値±標準誤差)

J: siRNA処理E12.5後腎における*Hnf4a*遺伝子発現の定量 (n = 4ずつ、平均値±標準誤差)

K: FAM標識siRNA処理後腎の組織像

LおよびM: 腎臓総面積および小葉数の定量 (n ≥ 5、平均±標準誤差)

Hnf4a siRNA処理後腎の総面積はN. C.と比較して減少していたが、有意差は認められなかった (P = 0.0871)。また小葉数はN. C.と同程度であった (**L-M**)。また、培養48時間後の後腎にコンマ字体またはS字体が認められる (**G-H**)。有意差検定はStudent T検定により行った。Bars = 200μm、* ; P < 0.05、***; P < 0.005

図11

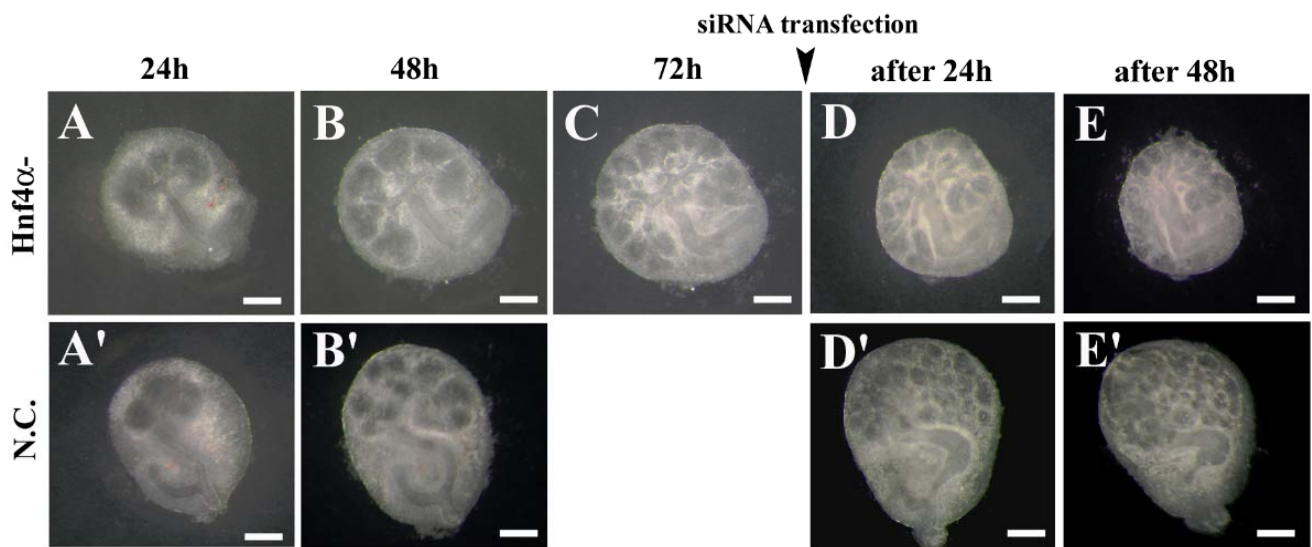


図11 E11.5培養後腎における遺伝子発現抑制効果

A-E: *Hnf4a* siRNA処理E11.5胎子後腎 (Hnf4α-)

A'-E': ネガティブコントロールsiRNA処理E11.5胎子後腎 (N. C.)

予備培養としてsiRNA処理前に72時間培養を行った (**A-C, A'-B'**)。導入24時間後 (**D, D'**) 導入48時間後 (**E, E'**)。Bars = 200 μm

図12

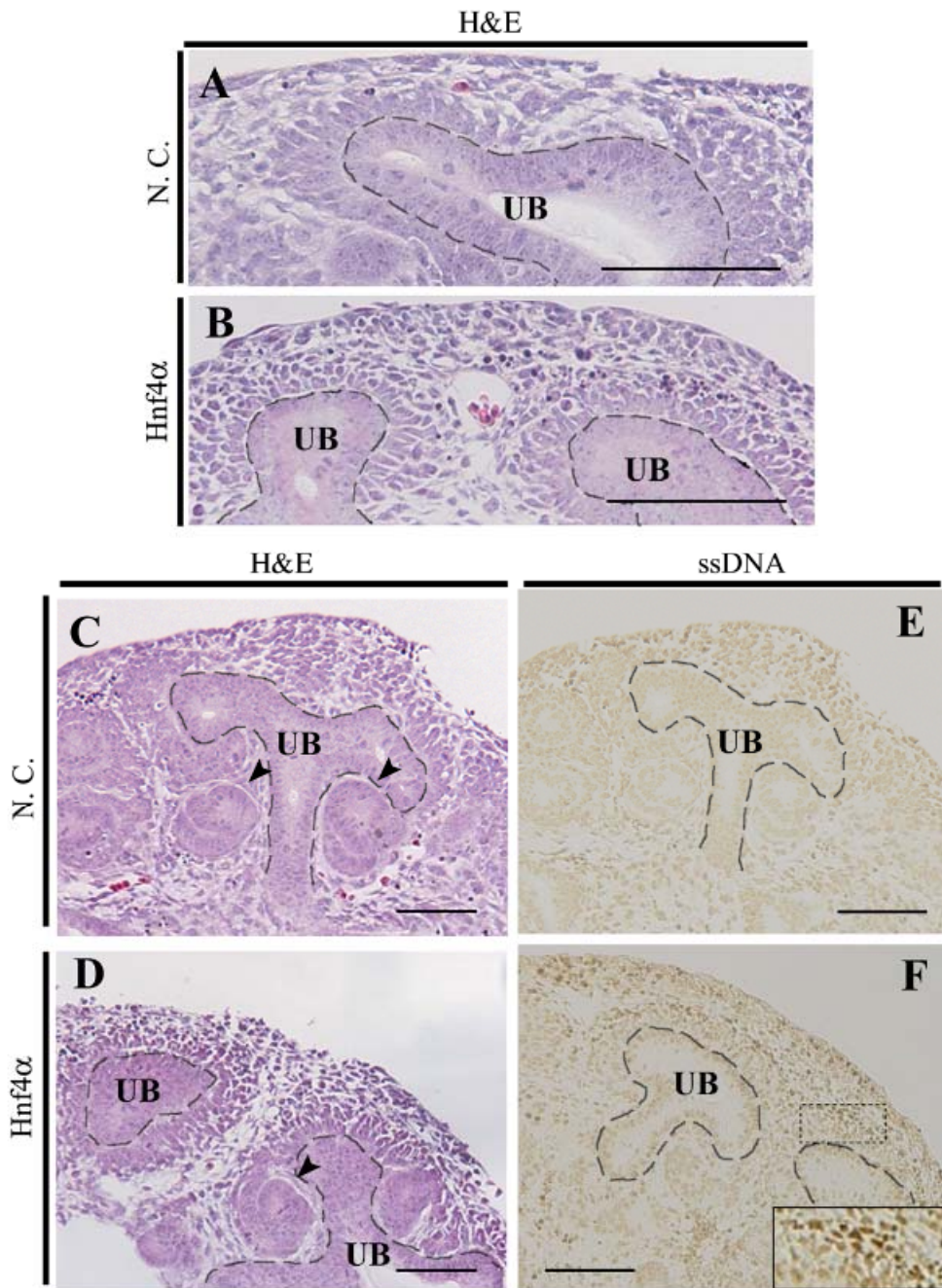


図12 *Hnf4a* siRNA処理胎子後腎でアポトーシス細胞が出現する

A-D: siRNA処理E12.5胎子後腎のHE染色像 (ネガティブコントロール;**A,C**、*Hnf4α*;**B,D**)

EおよびF: siRNA処理E12.5胎子後腎の抗ssDNA免疫組織化学法 (ネガティブコントロール;**E**、*Hnf4α*;**F**)

ネガティブコントロールsiRNAを導入した培養後腎では後腎間葉凝集体の細胞が規則正しく並ぶことが認められるのに対し (**A,C,E**)、*Hnf4a* siRNAを導入した培養後腎では後腎間葉凝集体の細胞の配列が乱れており、アポトーシス細胞の出現が観察される (**B,D,F**)。パネル**F**中の挿入図は後腎間葉凝集体に出現するアポトーシス細胞の拡大像を示す。*Hnf4a* siRNA処理後腎およびネガティブコントロールsiRNA処理後腎の両者で正常なコマ字体/S字体 (矢頭) が認められる。Bars = 100 μm

図13

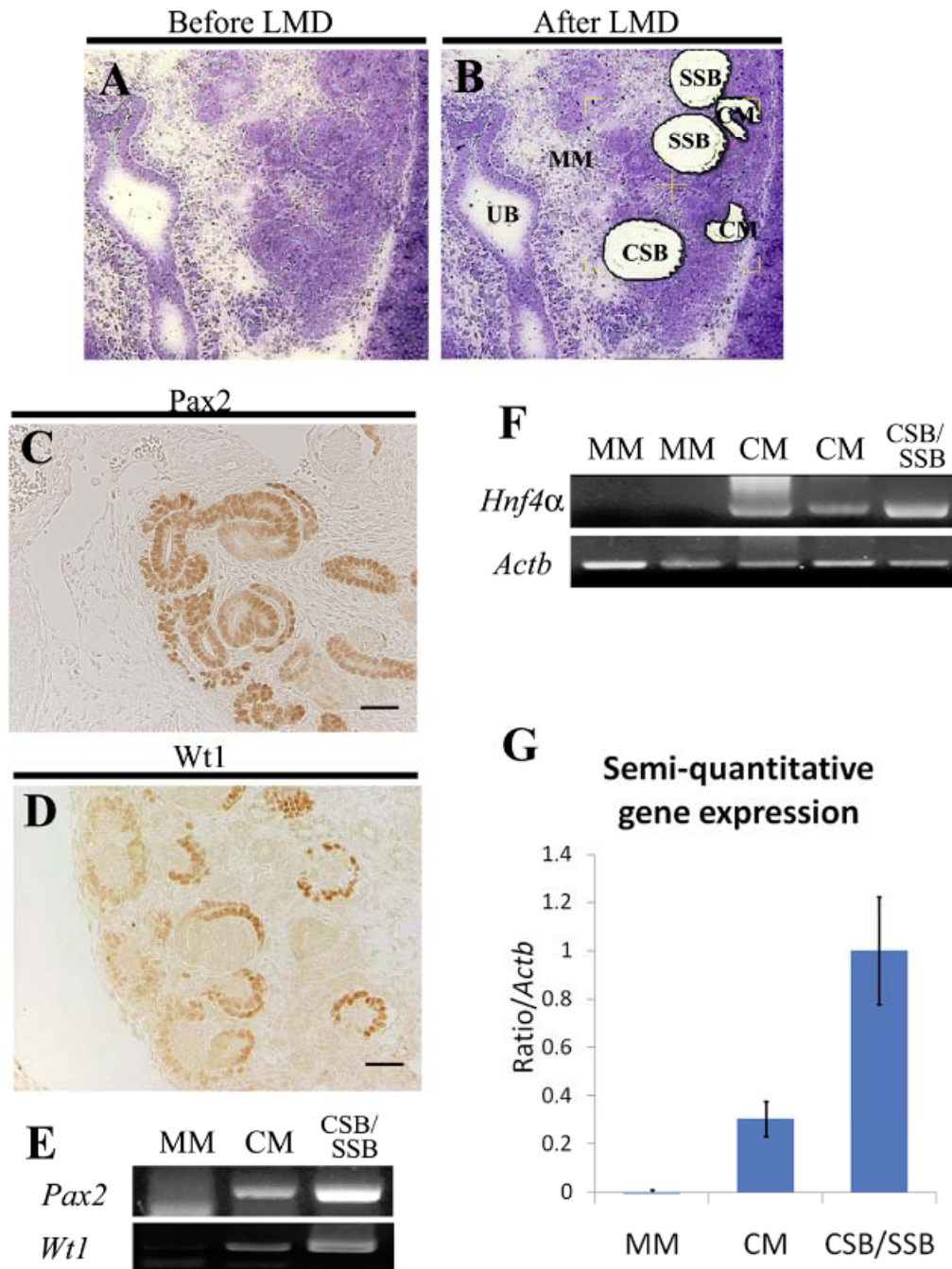


図13 LMD-RT-PCRによる微小環境における*Hnf4α*の発現解析

AおよびB: LMDサンプル (E13.5胎子腎臓、トルイジンブルー染色) LMD前 (A) LMD後 (B)

CおよびD: 抗Pax2および抗Wt1免疫組織化学法 (E15.5)

E: Pax2およびWt1に対するLMD-RT-PCR

F: pan-*Hnf4α*に対するLMD-RT-PCR

G: LMDサンプルに対する半定量的PCR (n = 3、平均値±標準誤差)

Pax2はUB、CMおよびCSB/SSBに陽性反応が認められるのに対し、Wt1はCMで弱い、CSB/SSBの一部および未熟な糸球体足細胞で強い陽性反応が認められ (C,D)、これらはLMD-RT-PCRの結果と一致する (E)。アイソフォームを区別しないpan-*Hnf4α*の発現はMMで発現が認められないのに対し、CMで弱い、CSB/SSBで強い発現が認められる (F,G)。半定量的PCRによる遺伝子発現量の値はハウスキーピング遺伝子*Actb*発現量により補正した。
Bars = 20 μm (C,D)

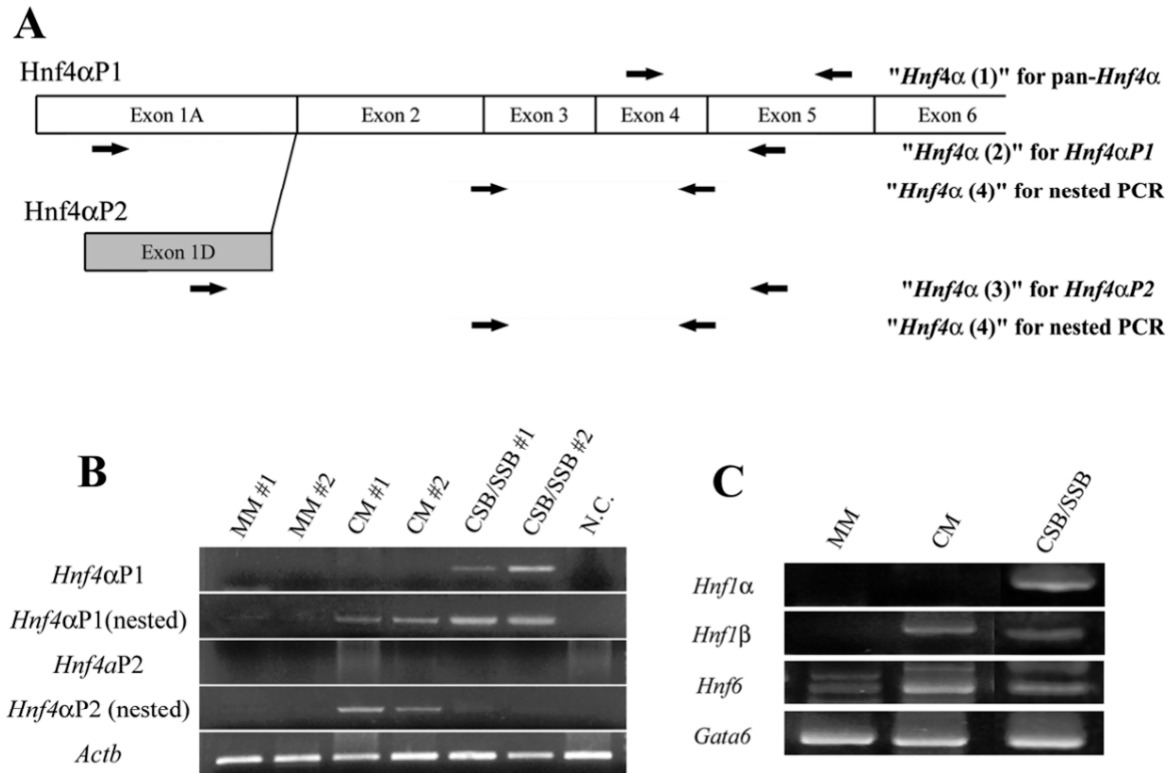


図14 LMD-RT-PCRによる発生後腎の微小環境における *Hnf4aP1/P2* および *Hnf4a* 上流遺伝子の発現解析

A: プライマー作製図

B: *Hnf4aP1/P2* のLMD-RT-nested PCR

C: *Hnf4a* 上流因子のLMD-RT-PCR

プライマーペア *Hnf4a*(1) は P1/P2 共通の配列を、*Hnf4a* (2) は P1 特異的、*Hnf4a* (3) は P2 特異的配列をターゲットとして作製された。また、プライマーペア *Hnf4a* (4) は *Hnf4a* (2) および (3) で増幅される配列に共通する配列をターゲットとしている (A)。一回目のPCRでは *Hnf4aP1* 発現は CSB/SSB のみで認められ (B; line 1)、さらに二回目のPCRでは CM および CSB/SSB で認められる (B; line 2)。それに対し、*Hnf4aP2* の発現は一回目のPCRではすべてにおいて陰性であるが (B; line 3)、二回目のPCRでは CM においてのみ、その発現が認められる (B; line 4)。また、*Hnf1a* は CSB/SSB に、*Hnf1b* は CM および CSB/SSB にそれぞれ発現が認められる (C)。

第三章

マウスネフロン形成における間葉-上皮転換の解析

I 諸論

胎子の器官がその構造を構築してゆく際、比較的自由度の高い間葉細胞が機能的充実を求め上皮細胞へ、あるいは比較的安定した上皮細胞が遊走性を獲得するため間葉細胞へと変化する過程が存在する。前者（mesenchymal-epithelial transition; MET）は体節形成や肝臓形成など多くの器官形成時に観察され、後者（epithelial-mesenchymal transition; EMT）は羊膜の原腸陥入、神経堤の移動、心臓の弁や中隔形成等において観察される現象である（Shook と Keller、2003 ; Hay、2005 ; Chaffer ら、2007）。近年、慢性的炎症に伴う臓器の線維化や癌細胞の浸潤、転移などの病態の際に EMT が起こることが注目されており（Thiery、2003 ; Guarino、2007）、これらの病態解明には発生時における MET および EMT の分子生物学的知見の蓄積が必要とされている。

典型的な上皮細胞は基底膜と接する basal 膜、隣接する細胞と接する lateral 膜、管腔表面を構成する apical 膜の三種類の細胞膜を持つ。apical 膜と lateral 膜の境界部には ZO1、claudin、occludin などにより構成される密着結合、ならびに E-cadherin、 β -catenin により構成される接着結合と呼ばれる細胞間接着構造が存在する（Fanning ら、1999 ; Schneeberger と Lynch、2004 ; Meng と Takeuchi、2009）。また、basal 膜には、基底膜と integrin α および β サブユニットのヘテロ重合体により構成される基底膜-細胞間接着構造が存在する（Barczyk ら、2010）。細胞間接着および基底膜細胞間接着により細胞の管腔側と基底側の極性、すなわち頂底極性（apico-basal polarity）を形成することで上皮細胞の特徴を獲得してゆく。

近年、頂底極性獲得のシグナル伝達経路の一つとして nectin-afadin 経路が注目されている。nectin 蛋白質はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型蛋白質で Nec1、-2、-3、-4 の 4 つのサブタイプが存在する（Eberle ら、1995 ; Satoh-Horikawa

ら、2000 ; Reymond ら、2001)。一方、afadin 蛋白質は細胞膜上に存在する nectin 蛋白質を裏打ちし、F-actin 蛋白質と結合させるアンカー蛋白質として機能している (Takai と Nakanishi、2003)。この nectin-afadin 経路は、Par3 蛋白質を介在し、接着結合因子や密着結合因子を apical 膜と lateral 膜の境界部に配置し、頂底極性の形成を誘導する (Chen と Macara、2005 ; Ooshio ら、2007 ; Takai ら、2008)。

腎臓の発生において、尿管芽周囲に後腎間葉組織が凝集しネフロンを形成してゆく過程で、後腎間葉組織から尿細管上皮、糸球体上皮へと MET がおこる。また、第二章で示したように、器官培養後腎において *Hnf4a* 遺伝子を発現抑制した結果、後腎間葉凝集体の細胞の配列が乱れ、Hnf4 α と MET との関連が示唆された。本章では、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た。さらに、間葉細胞である NIH3T3 マウス皮膚由来線維芽細胞に、哺乳類蛋白質発現ベクターによりマウス *Hnf4a* 遺伝子発現を導入した細胞モデルを作製し、Hnf4 α 蛋白質の MET に与える影響を解析した。

II 材料と方法

1. 供試動物

第一章、第二章に準ずる。

2. 細胞とプラスミド

細胞培養および pCI-*Hnf4α1/7* プラスミドの作製は第二章と同様に行った。マウス *Hnf4α1/7* mRNA の蛋白翻訳領域全長 cDNA はマウス肝臓 cDNA を鋳型にした PCR 反応(*Hnf4α1*; forward primer: 5'-GGGAGAATGCGACTCTCTAA-3' reverse primer: 5'-AGCTTGCTAGATGGCTTCTTG-3' 、 *Hnf4α7* forward primer: 5'-CTTGGTCATGGTCAGTGTGA-3' reverse primer: 5'-AGCTTGCTAGATGGCTTCTTG-3')により得た。pCI-*Hnf4α* プラスミドの細胞への導入は Fugene 6 (Roche)により行った。すなわち、NIH3T3 細胞は 6 穴プレートで 2.0 ml の培養液中で培養し、細胞密度が約 70%になるように準備した。1.0 μg プラスミドと 3.0 μl Fugene 6 試薬を 97 μl Opti-MEM 培養液(Invitrogen)に添加し、15 分間静置した後、細胞培養上清中に加えた。プラスミド導入 48 時間後に mRNA 抽出および細胞組織化学法を行った。

3. LMD

E16.5 胎子を対象に、第二章と同様に行った。

4. RT-PCR および定量的 real-time PCR

第一章および第二章と同様に行った。使用したプライマーを表 3 に示す。

5. 組織学的解析

a) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

採材した後腎組織に前固定 2.5% グルタルアルデヒド、後固定 1 % 四酸化オスミウム (溶媒 ; 0.1 M カコジル酸緩衝液、pH 7.2) を施し、エポン樹脂包埋した。70 nm に超薄切後、酢酸ウラン水溶液およびクエン酸鉛水溶液で二重染色を施し、TEM (JEM-1210 ; JEOL, Akishima, Tokyo) で超微形態観察に供した。

b) 免疫組織化学法

5 μ m 厚凍結切片を 5 分間 4%PFA で固定後、0.5% H_2O_2 / メタノール中に一時間浸透し、内因性ペルオキシダーゼ活性の不活性化処理を行った。ブロッキングおよび抗原抗体反応は第一章、第二章と同様に行った

c) 細胞組織化学

滅菌した 24 mm $\times$ 24 mm のカバーガラスを 6 穴プレートの底面に置き、その上に細胞を播種した。固定は、培養上清を除去した後、冷却 4 % PFA で 5 分間行い、その後 0.1% Triton X100 中、4 $^{\circ}$ C 10 分間浸透処理を行った。10% ウサギ血清を用いて、室温で 30 分間、非特異的反応のブロッキングを行った後、一次抗体で室温 1 時間、抗原抗体反応を行った。その後、蛍光色素標識二次抗体で室温 1 時間、暗室で反応させた後、水溶性封入剤 FluoromountTM (Diagnostic Bio Science, Pleasanton, USA) によりスライドガラス上に封入した。各工程間に 3 回以上 PBS による洗浄を行った。

6. 抗体

一次抗体として 600 倍希釈した goat polyclonal anti-Hnf4 α (sc-6556, Santa Cruz,

Santa Cruz, USA)、100 倍希釈した rabbit polyclonal anti-ZO1 (61-7300, Invitrogen)、100 倍希釈した rabbit polyclonal anti-E-cadherin (sc-7870, Santa Cruz)、100 倍希釈した rabbit polyclonal anti-laminin (L9393, Sigma, Saint Louis, USA)を使用した。二次抗体として 100 倍希釈した biotinated goat polyclonal anti-rabbit IgG (Funakoshi, Tokyo, Japan)、あるいは 100 倍希釈した TRITC-conjugated rabbit polyclonal anti-goat IgG (Invitrogen)を使用した。

III 結果

1. 後腎間葉凝集体における MET の詳細

MET の過程を詳細に観察するため、E16.5 の腎臓を透過型電子顕微鏡により超微形態観察を行った。尿管芽 (UB)、S 字体 (SSB)、および近位尿細管では、細胞間管腔側に高電子密度の接装置が、また、上皮細胞基底側に基底膜の形成が認められ、典型的な上皮細胞の形態を示した (図 15A, D-E)。凝集していない後腎間葉組織 (MM) の細胞は細胞間接着および基底膜の形成が認められなかった (図 15B)。それに対し、後腎間葉凝集体 (CM) を構成する細胞では、隣り合う細胞間に高電子密度の構造物が認められる一方、基底膜構造は確認されなかった (図 15C)。

細胞間接着と基底膜の構築を確認するため、接着結合蛋白質 E-cadherin、密着結合蛋白質 ZO-1 および基底膜蛋白質 laminin の分布を免疫組織化学法により調べた。その結果、E-cadherin および ZO-1 蛋白質が CM の細胞間に線上に局在していることが認められた (図 16A-D)。一方 laminin 蛋白質は凝集していない後腎間葉組織の細胞質および UB、CSB および SSB の基底側細胞膜にのみ認められた (図 16E-F)。

さらに LMD - RT-PCR により、MM では、CM と比較して、間葉細胞マーカーである *Vim* および *Acta2* 遺伝子の発現量が低いのに対し、上皮細胞マーカーの *Krt8*, *Tjp1*, および *Cdh1* 遺伝子発現量は増加していた (図 17A)。以上の結果から、CM を構成する細胞は、間葉細胞としての特徴が減弱する一方、細胞間接着は有するが基底膜構造をもたない、部分的に上皮細胞としての特徴を持つことが示された。

2. 転写因子 Hnf4a が間葉細胞の上皮化に関連する

次に、Hnf4a が MET を誘導するかどうか明らかにするため、Hnf4a 蛋白質を強制発

現させた細胞モデルの解析を行った。pCI-*Hnf4a1*、pCI-*Hnf4a7*、pCI-*Hnf4a1/7* および空ベクターを導入した 4 つの細胞は、それぞれ正常に作製されたことが確認された (図 18A)。さらに蛍光抗体法により、空ベクター導入細胞には反応が認められないのに対し、pCI-*Hnf4a1/7* 導入細胞群において約 10% の細胞に発現が検出され、Hnf4 α 蛋白質が核内に分布することが認められた (図 18B, C)。一部の Hnf4 α 蛋白質陽性細胞は、上皮細胞様形態をとるものと、集簇し凝集塊を形成するものが認められた (図 18D, D')。

Hnf4 α と MET の関連性を検証するため、4 群の細胞モデルにおいてそれぞれ 6 回の定量的 PCR により遺伝子発現を検索した。間葉マーカー *Vim* および *Acta2* 遺伝子発現量の減少がすべての pCI-*Hnf4a* 導入群で認められ、pCI-*Hnf4a1* 導入群の *Vim* 遺伝子を除くすべての群で、空ベクター導入群と比較して有意差が認められた。また、上皮マーカー *Tjp1* 遺伝子発現量の増加が、すべての pCI-*Hnf4a* 導入群で有意差をもって確認された。一方、*Cdh1* 遺伝子発現量は陰性対照群を含むすべての群で検出限界未満であった (図 19)。

さらに、MET のメディエーターとして nectin-afadin 系に着目し、nectin 蛋白質をコードする *Pvrl1*~*4* 遺伝子、ならびに afadin 蛋白質をコードする *Mlt4* 遺伝子の発現量を 4 群で比較した。*Pvrl1*、*-2*、ならびに *Mlt4* 遺伝子発現量は pCI-*Hnf4a* 導入群で増加が認められ、それぞれの遺伝子において、すべての pCI-*Hnf4a* 導入群と空ベクター導入群間に、有意差が認められた。一方、*Pvrl3* 遺伝子発現は 4 群いずれも同程度の値で陰性対照群と比較しても有意差は認められなかった。*Pvrl4* 遺伝子はすべての群において検出限界未満であった (図 20)。これら *Vim*、*Acta2*、*Tjp1*、*Pvrl1*、*-2* および *Mlt4* 遺伝子発現の変化は、pCI-*Hnf4a1* 導入群より pCI-*Hnf4a7* 導入群、pCI-*Hnf4a1/7* 導入群でより強い傾向にあった。

IV 考察

本章ではネフロン形成過程における MET を観察するとともに、Hnf4 α 発現細胞モデルの解析を行った。本章の結果は以下の二点に集約される。

- 1) ネフロン形成過程において MET は二段階に分かれて進行し、CM 形成ステージで細胞間接着を、CSB/SSB 形成ステージで基底膜を形成し、頂底極性を獲得した。
- 2) *Hnf4a* 遺伝子を一般的間葉系培養細胞に導入することで、間葉細胞に特有の遺伝子発現減少と上皮細胞に特有の遺伝子発現亢進が生じ、細胞の上皮化が誘導された。

本章の結果より、CM では、細胞間接着は存在するものの、基底膜は存在しないこと、ならびに CM では、MM と比較して、間葉マーカー遺伝子の発現量が低く、上皮マーカー遺伝子の発現量が高いことが認められた。この結果は、CM の細胞が上皮細胞としての形質を一部有しているものの頂底極性が未だ備わっておらず、MET の途中段階にあることが考察された。EMT の研究において、上皮細胞から間葉細胞へ完全に転換するまでにさまざまな中間段階が存在すること、さらに嚢状構造から管状構造を形成する際において、apico-basal 極性を一時的に消失させ、中間的形態に移行し再び極性を獲得する現象 (partial EMT) が報告されている (Grünert ら、2003 ; O'brien ら、2002)。本章の結果は MET の過程においても EMT の過程と同様に中間的形態をとることが示唆された。すなわち、ネフロン形成において MET は二段階に分かれて進行し、CM 形成ステージで細胞間接着を、CSB/SSB 形成ステージで基底膜を形成し、頂底極性を得ることが示された。

次に細胞モデル解析において、Hnf4 α 蛋白質陽性 NIH3T3 細胞の一部は上皮細胞様の形態を示すものや、凝集し三次元的な集塊を形成するものが観察された。この結果は、

Hnf4 α 蛋白質発現が NIH3T3 細胞や肝細胞腫細胞を上皮様の形態に変化させるという報告 (Parviz ら、2003 ; Lazarevich ら、2004) および、HEK293 細胞において凝集塊を作るという報告 (Lucas ら、2005) と一致した。この表現系の違いは Hnf4 α 蛋白質の発現量や、発現させる細胞の性質の違いに依存している可能性が期待され、その解明にはさらなる研究が必要である。

定量的 PCR の結果、Hnf4 α 蛋白質導入細胞で間葉マーカー遺伝子の発現量が減少し、上皮マーカー遺伝子の発現量が増加した。さらに、Hnf4 α 蛋白質導入細胞で上皮化誘導因子である *Pvr11*、*2* および *Mlt4* の遺伝子発現量が増加した。これらの結果から Hnf4 α 蛋白質発現により MET が誘導されることが示唆される。過去の知見で、ヒト肝細胞、ならびに豚島における HNF4 α 蛋白質結合プロモーターの網羅的解析により、HNF4 α が直接的に転写調節している遺伝子が明らかにされている (Odom ら、2004)。*Pvr11*、*2* および *Mlt4* は、HNF4 α が直接的に転写調節している遺伝子リストに含まれていなかったことから、*Pvr11*、*2* および *Mlt4* 遺伝子は Hnf4 α に直接的に調節されているのではなく、Hnf4 α との間にいくつかの分子を介している可能性が示唆される。さらに、上皮化の傾向は Hnf4 α 7 (P2) で強く、Hnf4 α 1 (P1) で弱く現れた。Hnf4 α P2 は、P1 と同じく DNA 結合ドメイン、リガンド結合ドメインを持つが、転写活性ドメインである AF1 を持たず、転写活性能が低いことが報告されていることから (Hadzopourou-Cladaras ら、1997 ; Torres-Padilla ら、2002 ; Eeckhoutte ら、2003 ; Ihara ら、2005)、Hnf4 α 下流の分子カスケードに発現量によりスイッチングされるネガティブフィードバックが存在している可能性が示唆される。

本章の結論として、腎臓発生過程において MET は二段階に分けておこり、CM 期に最初の partial MET として細胞間接着を、CSB/SSB 期に二度目の partial MET として基底膜を形成する。Hnf4 α 発現細胞モデルにおいて、Hnf4 α が MET を誘導することか

ら、腎臓発生 CM におこる *Hnf4a* 遺伝子発現が最初の partial MET の引き金となっている可能性が示唆された。

V 小括

腎臓発生において、後腎間葉組織は MET の結果、ネフロンへと変化してゆく。前章の結果から、マウス培養後腎における *Hnf4a* 遺伝子の発現抑制が CM の細胞配列の乱れを引き起こすことが示された。本章ではネフロン形成過程における MET の詳細を明らかにするため、マウス胎子腎臓を超微形態学的、免疫組織化学的、分子生物学的に解析を行うとともに、MET と *Hnf4a* の関連を明らかにするために、線維芽細胞由来培養細胞に *Hnf4a* 蛋白質を強制発現させた細胞モデルの解析を行った。その結果、CM において細胞間接着が認められる一方、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 (*Krt8*, *Tjp1*, *Cdh1*) の発現が上昇し、間葉細胞マーカー遺伝子 (*Acta2*, *Vim*) の発現の減少が認められた。また、*Hnf4a* 発現細胞モデルにおいて、*Hnf4a* が上皮マーカー遺伝子の発現を上昇させる一方、間葉マーカー遺伝子の発現を減少させることが明らかとなった。さらに、細胞の頂底極性の形成に関わる nectin および afadin 蛋白質をコードしている *Pvr11, -2* および *Milt4* 遺伝子の発現上昇が認められた。前章の結果と合わせ、これらの結果から *Hnf4a* 蛋白質が、初期ネフロン形成における MET の開始に関わっている可能性が示唆された。

附図および表

表3 プライマーリスト3

Symbol	Official gene name	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size	AT ^{*1}
<i>Hnf4a1</i> ^{*2}	Hepatic nuclear factor 4, alpha, transcript variant 1	<u>NM 008261.2</u>	GGGAGAATGCGACTCTCTAA	GTTGGCAATCTTCTTTGCCC	554 bp	62°C
<i>Hnf4a7</i> ^{*3}	Hepatic nuclear factor 4, alpha, transcript variant 7	<u>AF 015275</u>	CTTGGTCATGGTCAGTGTGA	GTTGGCAATCTTCTTTGCCC	490 bp	65°C
<i>Acta1</i>	Actin, alpha 1, skeletal muscle	<u>NM 007392.2</u>	CAGCACCATGAAGATCAAGATC	CGTTCACAGTTGTGTGCTAGAG	213 bp	60°C
<i>Vim</i>	Vimentin	<u>NM 011701.4</u>	CAGGATTTCTCTGCCTCTGC	TCAAGGTCATCGTGATGCTG	171 bp	60°C
<i>Fn1</i>	Fibronectin 1	<u>NM 010233.1</u>	TGACAACTGCCGTAGACCTG	TCGTCTCTGTCAGCTTGAC	162 bp	60°C
<i>s100</i>	S100 calcium binding protein A4	<u>NM 011309.1</u>	CAGGCAAAGAGGGTGACAAG	GCAATGCAGGACAGGAAGAC	190 bp	60°C
<i>Krt8</i>	Keratin 8	<u>NM 031170.2</u>	GGAGATGGCCATTAAGGATG	TGTTCTGCATCCCAGACTCC	200 bp	60°C
<i>Tjp1</i>	Tight junction protein 1	<u>NM 009386.1</u>	GCACCATGCCTAAAGCTGTC	ACTCAACACACCACCATTGC	122 bp	60°C
<i>Tjp2</i>	Tight junction protein 2	<u>NM 011597.2</u>	AATGCGAGGATCGAAATAGC	TAGCTTCCTCTGGTGTCTCTG	158 bp	60°C
<i>Cdh1</i>	Cadherin 1	<u>NM 009864.2</u>	ACGTCCATGTGTGTGACTGTG	AGGAGCAGCAGGATCAGAATC	139 bp	60°C
<i>Pvrl1</i>	Poliovirus receptor-related 1	<u>NM 021424.2</u>	GGCCATCTACAACCCGACTA	ATGTACATGCCCTCGTCTCTC	116 bp	60°C
<i>Pvrl2</i>	Poliovirus receptor-related 2	<u>NM 008990.3</u>	ATCCATCTCCGGCTATGATG	TCCACAGAGTGGACAAGCAG	171 bp	60°C
<i>Pvrl3</i>	Poliovirus receptor-related 3	<u>NM 021496.3</u>	GGCAAAGCACAACTTTCCTC	ACATTCTTTCCCCACACTGC	179 bp	60°C
<i>Pvrl4</i>	Poliovirus receptor-related 4	<u>NM 027893.3</u>	AGTGGCATAAGCAGGTACGG	GCGGAATATTGGCCTGTAAA	233 bp	60°C
<i>Mllt4</i>	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	<u>NM 010806.1</u>	TGGGAGGAGATGTCCACAGT	CAGTTCAGGCCCAGTAGCAT	191 bp	60°C
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<u>NM 008084.2</u>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	150 bp	60°C

PCRs were carried out with 35 cycles (for tissue sample) or 50 cycles (for LMD sample)

^{*1} Annealing temperature

^{*2-3} These primer sets correspond with *Hnf4aP1* and *Hnf4aP2* of Table 1, respectively.

図15

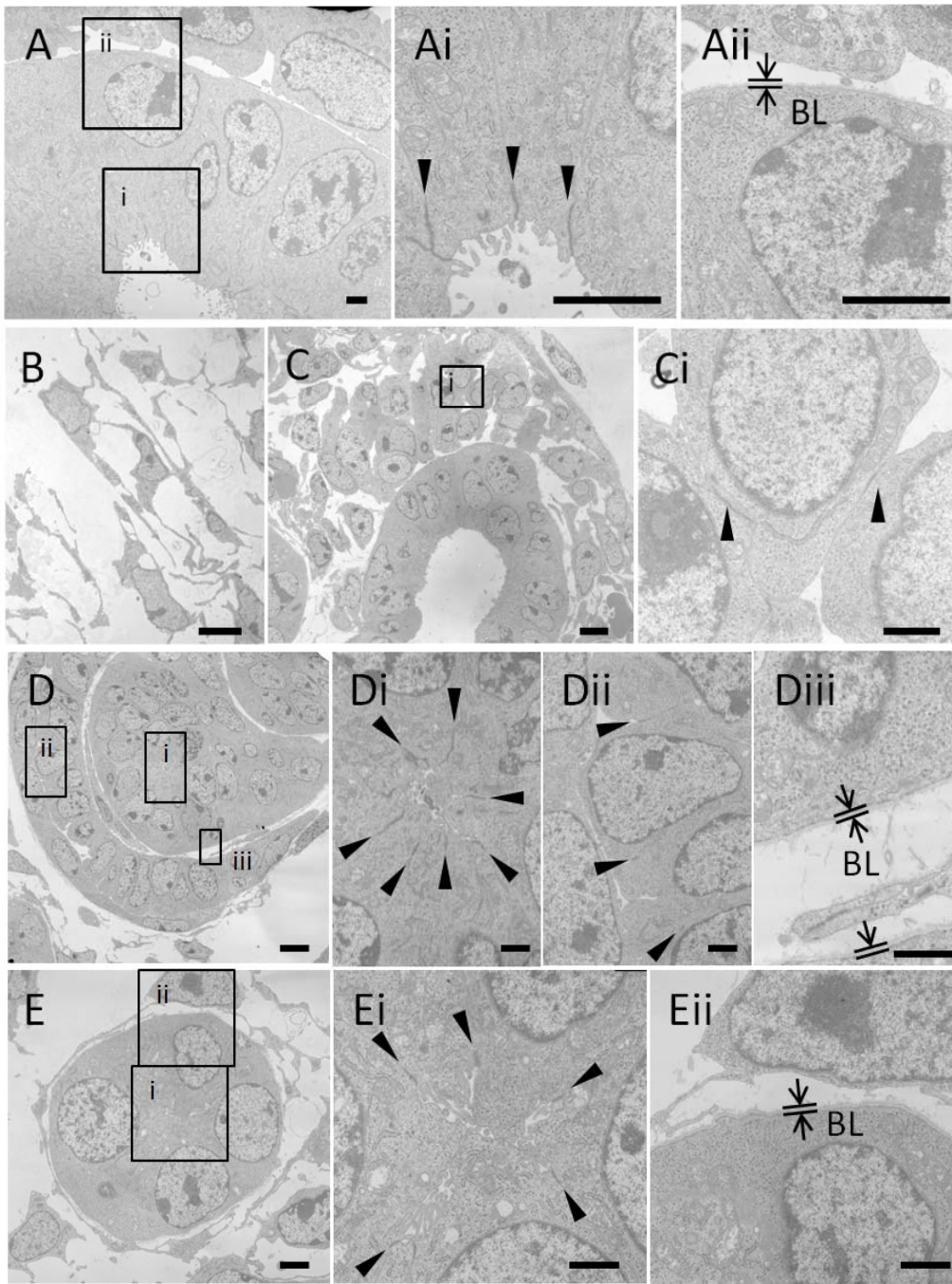


図15 発生後腎の透過型電子顕微鏡観察

A, Ai-ii: 尿管芽、**B:** 後腎間葉組織（凝集前）、**C, Ci:** 後腎間葉凝集体、**D, Di-iii:** S字体、**E, Ei-ii:** 未熟近位尿細管

尿管芽、S字体および未熟近位尿細管において、細胞間接着装置（矢頭）および基底膜（BL）が認められる（**A, D, E**）。凝集前後腎間葉組織においては細胞間接着および基底膜はいずれも認められないのに対し（**B**）、後腎間葉凝集体においては基底膜は認められないが細胞間接着（矢頭）が認められる（**C**）。Bars = 5 μm （**B, C, D, E**）、1 μm （**A, Ai-ii, Ci, Di-iii, Ei-ii**）

図16

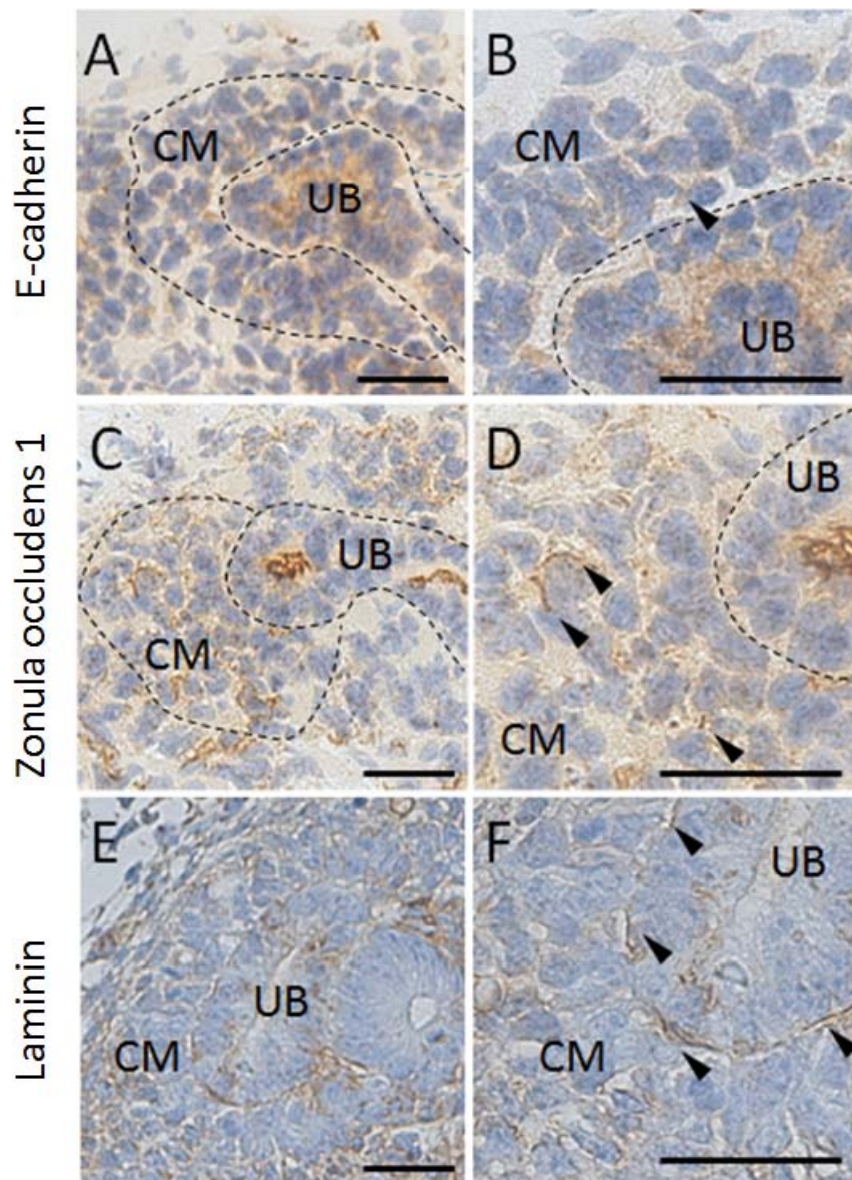


図16 免疫組織化学法による、発生後腎における細胞間接着および基底膜の形成の解析

A, B: 接着結合因子E-カドヘリンに対する免疫組織化学法

C, D: 密着結合因子ZO-1に対する免疫組織化学法

E, F: 基底膜蛋白質ラミニンに対する免疫組織化学法

E-カドヘリンおよびZO-1に対する陽性反応は尿管芽（UB）および後腎間葉凝集体（CM）の細胞間に認められるが、凝集していない後腎間葉組織には認められない（A-D）。ラミニンに対する陽性反応はUBの基底側に認められるが、CMには認められない（E-F）。Bars = 50 μ m

図17

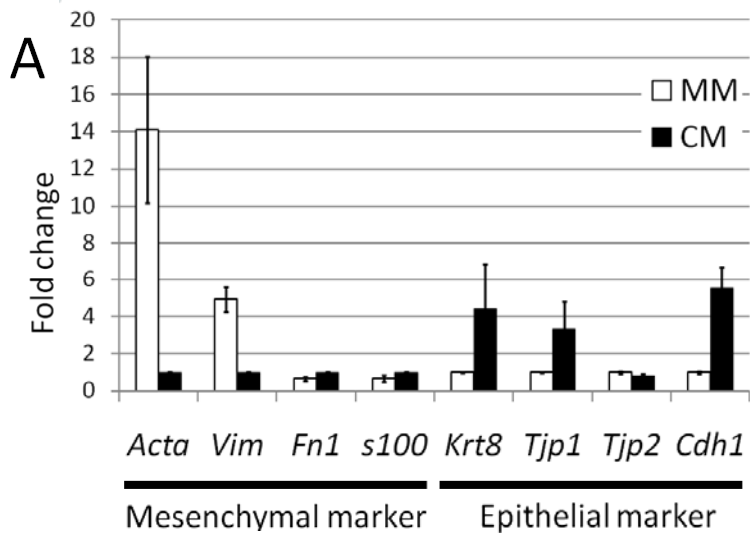


図17 凝集前後腎間葉組織（MM）と後腎間葉凝集体（CM）における上皮/間葉マーカー遺伝子の発現

上皮マーカー遺伝子（*Krt8*, *Tjp1*, *Tjp2*, *Cdh1*）および間葉マーカー遺伝子（*Acta2*, *Vim*, *Fn*, *s100*）に対する定量的PCR

CMにおいて*Krt8*、*Tjp1*および*Cdh1*遺伝子の発現は、MMと比較して高い。一方、*Acta2*および*Vim*遺伝子の発現は、MMと比較して低い。グラフ中のカラムは間葉マーカー遺伝子の場合にはCMの値と比較した倍率の、上皮マーカー遺伝子の場合にはMMの値と比較した倍率の平均値を表し、エラーバーは標準誤差を示す（n = 3）。すべての値はハウスキーピング遺伝子である*Gapdh*により補正した。

図18

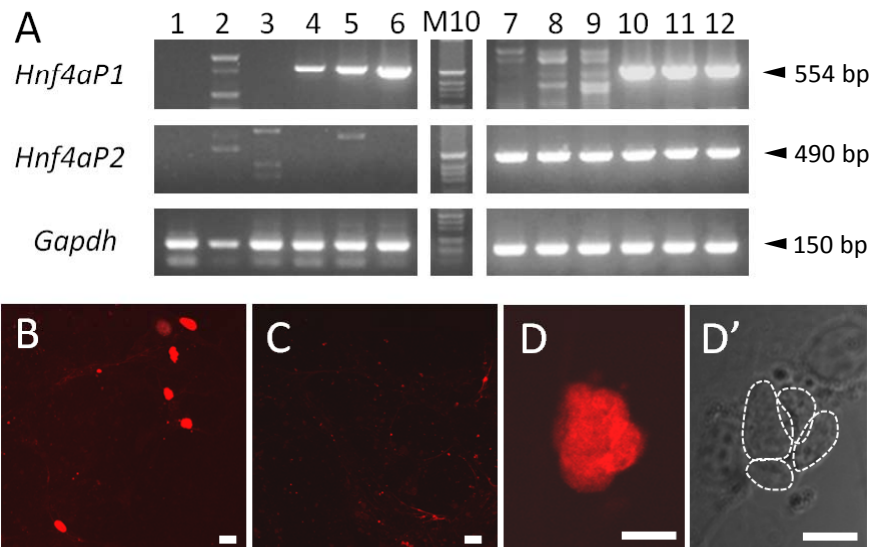


図18 細胞モデルにおけるHnf4α遺伝子発現と蛋白質局在の評価

A: *Hnf4aP1*、*Hnf4aP2*および*Gapdh*遺伝子に対するRT-PCR

B, C, D, D': Hnf4α蛋白質に対する蛍光抗体法（赤: Hnf4α-TRITC）。
pCI-*Hnf4a1/7*導入細胞（**B, D, D'**）空ベクター導入細胞（**C**）

空ベクター導入細胞に*Hnf4a*遺伝子発現はどちらも認められない（**A**; lane 1-3） pCI-*Hnf4a1*導入細胞で*Hnf4aP1*遺伝子のみ発現が認められる（**A**; lane 4-5）。 pCI-*Hnf4a7*導入細胞で*Hnf4aP2*遺伝子のみ発現が認められる（**A**; lane 6-9）。 pCI-*Hnf4a1/7*導入細胞で*Hnf4aP1*および*P2*遺伝子の発現が認められる（**A**; lane 10-12）。 Hnf4α蛋白質はpCI-*Hnf4a1/7*導入細胞の核に認められる（**B**）。一方、空ベクター導入細胞には認められない（**C**）。 Hnf4α蛋白質発現細胞は線維芽細胞様のものと上皮細胞様の形態を示すものに加え、凝集して集塊を作るものも認められた（**D, D'**）。 **D'**は**D**の位相差顕微鏡像を示し、点線により核の外周を示している。

Bars = 10 μm

図19

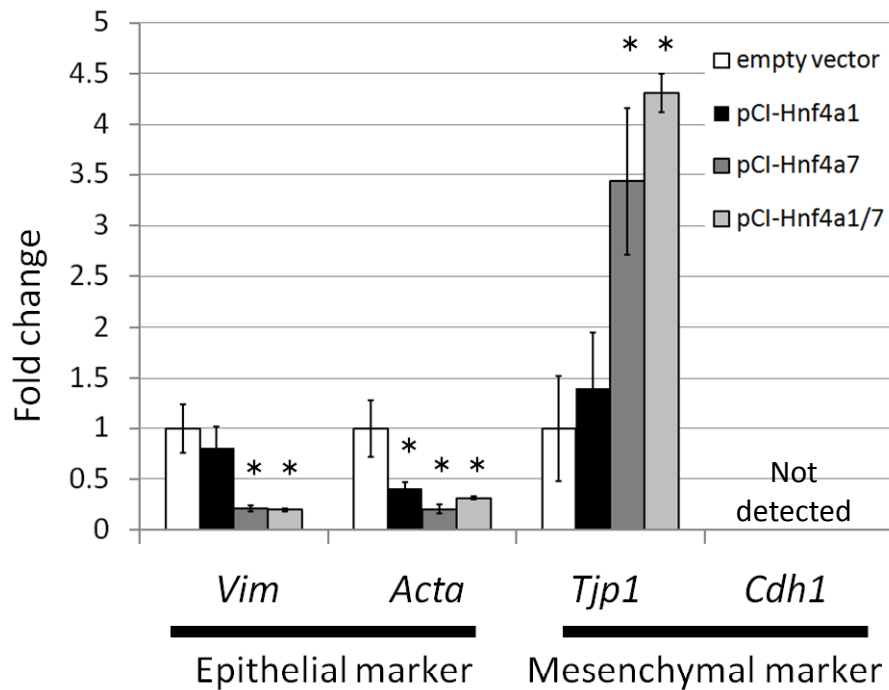


図19 pCI-*Hnf4a*ベクター導入細胞における上皮/間葉マーカー遺伝子の発現

間葉マーカー遺伝子（*Vim*, *Acta2*）および上皮マーカー遺伝子（*Tjp1*, *Cdh1*）に対する定量的PCR

*Vim*および*Acta2*遺伝子の発現はpCI-*Hnf4a1*、pCI-*Hnf4a7*およびpCI-*Hnf4a1/7*で空ベクター導入細胞と比較して減少が認められる。一方、*Tjp1*遺伝子の発現はpCI-*Hnf4a1*、pCI-*Hnf4a7*およびpCI-*Hnf4a1/7*で空ベクター導入細胞と比較して増加が認められる。*Cdh1*の遺伝子発現はすべての細胞で検出限界未満であった。すべての結果は*Gapdh*遺伝子発現量により補正した。グラフ中のカラムは空ベクター導入細胞における遺伝子発現量との比として表し、エラーバーは標準誤差を表す（ $n = 6$ ）*は空ベクター導入細胞と比較して、Mann-Whitney *U*検定により有意差（ $P < 0.05$ ）が認められることを示す。

図20

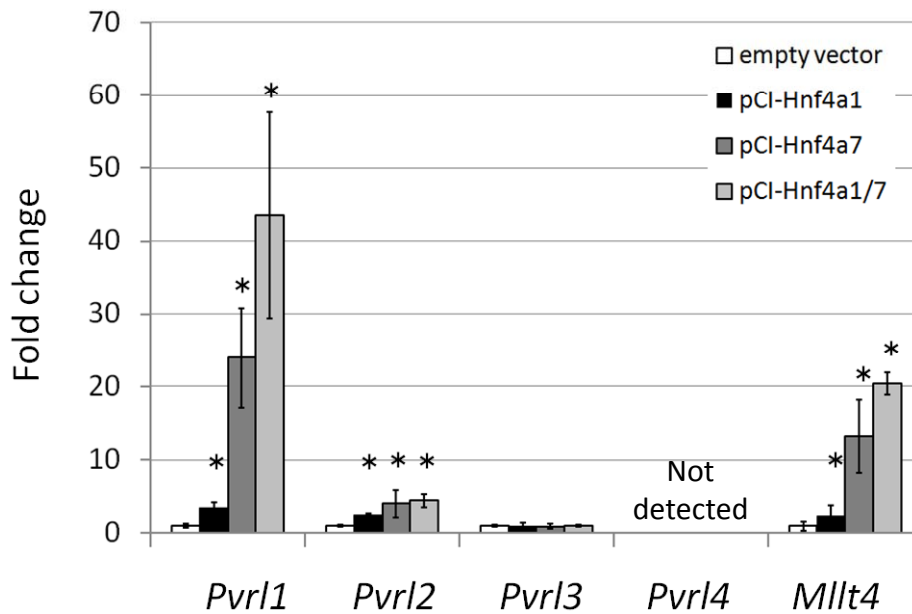


図20 pCI-*Hnf4a*ベクター導入細胞におけるnectin-afadin遺伝子の発現

*Pvr11-4*および*Mlt4*遺伝子に対する定量的PCR

Pvr11、*-2*および*Mlt4*遺伝子の発現はpCI-*Hnf4a1*、pCI-*Hnf4a7*およびpCI-*Hnf4a1/7*で空ベクター導入細胞と比較して増加が認められる。一方、*Pvr13*遺伝子の発現はすべての細胞間に差は認められず、*Pvr14*遺伝子発現はすべての細胞で検出限界未満であった。すべての結果は*Gapdh*遺伝子発現量により補正した。グラフ中のカラムは空ベクターにおける遺伝子発現量の比として表し、エラーバーは標準誤差を表す (n = 6) *は空ベクター導入細胞と比較して、Mann-Whitney *U*検定により有意差 ($P < 0.05$) が認められることを示す。

総 括

マウス後腎の発生は、ウォルフ管から伸びる尿管芽 (UB) が後腎間葉組織 (MM) に侵入することから始まる。MM は 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。こうしたネフロン形成過程で、後腎間葉細胞からネフロンへ、すなわち間葉細胞から上皮細胞へと形質転換がおこる。

Hnf4 α 蛋白質は Zn フィンガー型核内転写因子の一つであり、肝臓や消化管の内胚葉由来上皮や膵島 β 細胞のほか、腎臓においても近位尿細管を中心に高レベルで発現している。Hnf4 α は様々な遺伝子の転写調節を行う結果、肝臓および膵島 β 細胞において脂代謝、インスリン分泌や恒常性維持などの機能に大きく寄与している。

本研究の目的は、Hnf4 α 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である。第一章では、Hnf4 α 蛋白質の全身臓器における分布を明らかにするとともに、腎臓における分布と、その発生過程における発現動態を検索した。第二章では、発生中の後腎器官培養系において RNA 干渉法による遺伝子発現抑制を行い、Hnf4 α 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調節ネットワークを解析した。第三章では、腎臓発生過程の MET を超微形態学、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、Hnf4 α 蛋白質の MET に与える影響を解析した。

第一章において、Hnf4 α の全身臓器における分布を明らかにするとともに、腎臓における分布ならびにその発生過程における発現動態を検索した。その結果、肝臓、小腸、大腸では *P1*、*P2* 両タイプの、胃、膵臓では *P2* タイプのみの遺伝子が発現するのに対し、腎臓では *P1* タイプのみの遺伝子発現が認められた。免疫組織化学的検索の結果、近位尿細管上皮細胞の核内に蛋白質の局在が認められ、ほかのセグメントに局在は認め

られなかった。発生時の後腎においては、Hnf4α蛋白質局在は 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限局していた。興味深いことに胎子期の胃、脾臓および腎臓において両タイプの遺伝子発現が検出された。さらに Hnf4αと Hnf1αの免疫組織化学的検索の結果、同一ネフロンにおいて Hnf4αは Hnf1αより早く発現が開始することが明らかとなり、Hnf ネットワークの中でより根源的役割を持つことが示唆された。

第二章において、Hnf4αの機能解析のため、培養後腎における *Hnf4a* 遺伝子発現抑制をおこなった。その結果、CM において細胞の配列が乱れ、多数のアポトーシス細胞が出現することが明らかとなった。正常マウス後腎における LMD-RT-PCR の結果、凝集前の MM では発現が認められず、CM においては *Hnf4aP2* タイプのみの発現が、コンマ字体、S 字体においては P1、P2 両タイプの発現が認められた。さらに CM においては Hnf4α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。これらの結果から、ネフロン形成過程において *Hnf4a* 遺伝子発現が CM を構成する細胞の生存に重要な働きを持っていること、さらにその遺伝子発現は Hnf1βに誘導されている可能性が示された。

Hnf4a 遺伝子発現抑制培養後腎モデルの解析において CM の配列が乱れたことから、Hnf4αは細胞の生存のみならず MET に関連している可能性が考えられた。そこで第三章において、ネフロン形成過程における MET の詳細を観察するとともに、線維芽細胞由来培養細胞に Hnf4α蛋白質を強制発現させた細胞モデルを作製し、MET と Hnf4αの関連を解析した。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 (*Krt8*, *Tjp1*, *Cdh1*) の発現が上昇し、間葉細胞マーカー遺伝子 (*Acta1*, *Vim*) の発現が減少した。さらに Hnf4α発現細胞モデルにおいて、Hnf4αが上皮マーカー遺伝子の発現を上昇させ、間葉マーカー遺伝子の発現は減少させること

が明らかとなった。さらに、細胞の頂底極性の形成に関わる *Pvr11,-2* および *Milt4* 遺伝子の発現上昇が認められた。これらの結果から CM は上皮細胞と間葉細胞の中間的形質を有し、Hnf4 α により MET が誘導されることが示唆された。すなわち、MM から CM に変わる過程で Hnf4 α に誘導される最初の partial MET が進行し細胞間接着を形成し、CM から CSB/SSB に変わる過程で二回目の partial MET が進行し、基底膜が形成されると考えられる。

これらの研究成果から、本稿の結論として以下の動態モデルを提示する。すなわち、腎臓の発生過程において Hnf4 α は CM と CSB/SSB 二つの時期に出現する。CM 期においては *P1*、*P2* 両タイプが Hnf1 β により発現誘導され、細胞の生存に関連するとともに、間接的に Nectin-Afadin 系を活性化し、初期 partial MET を促進させる。CSB/SSB 期においては *P1* タイプのみが発現し、さらに *Hnf1a* を発現誘導する。Hnf1 α と Hnf4 α はお互いの遺伝子発現を活性化し合うことで安定した発現量を確保し、微絨毛や酵素群の発現に関与することにより、近位尿細管としての性格決定に関与する。

本研究の成果が、医学・獣医学において、再生医療や遺伝子治療を発展させてゆく上で有用な知見となることを期待する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、始終懇切なるご指導ならびに論文のご校閲くださいました北海道大学獣医学部研究科 解剖学教室 昆 泰寛 教授、教育改革室 橋本善春 教授、解剖学教室 市居 修 助教、同 大塚沙織 特任助教、同 今野明弘 前助教に衷心より感謝いたします。また、論文草稿のご校閲をいただきました本研究科 教育改革室 橋本善春 教授、臨床分子生物学教室 稲葉 睦 教授、実験動物学教室 佐々木宣哉 准教授に深くお礼申し上げます。

また実験をおこなうにあたり、貴重なご助言を賜りました帯広畜産大学畜産学部獣医学科 解剖学教室 佐々木基樹 准教授と鳥取大学農学部獣医学科 解剖学教室 保坂善真 准教授に謹んでお礼申し上げます。ならびに、本研究科動物飼育施設の村上重美 技術専門員をはじめとする施設の皆様に心から感謝いたします。

いつも暖かく励ましてくださり、多岐にわたり協力していただきました教室員をはじめとする獣医学部の皆様に心より感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、尊い生命を犠牲にされた多くの動物達に謹んで哀悼の念を捧げるとともに、深く感謝いたします。

参考文献

1. Bailly, A., Trres-Padilla, M. E., Tinel, A. P. and Weiss, M. C. 2001. An enhancer element 6 kb upstream of the mouse Hnf4 α 1 promoter is activated by glucocorticoids and liver-enriched transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3495-3505.
2. Barbacci, E., Reber, M., Ott, M. O., Breillat, C., Huetz, F. and Cereghini, S. 1999. Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm. *Development* **126**: 4795-4805.
3. Boyle, S., Misfeldt, A., Chandler, K. J., Deal, K. K., Southard-Smith, E. M., Mortlock, D. P., Baldwin, H. S. and De Caestecker, M. 2008. Fate mapping using Cited-CreER^{T2} mice demonstrates that the cap mesenchyme contains self-renewing progenitor cells and gives rise exclusively to nephric epithelia. *Dev. Biol.* **313**: 234-245.
4. Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**: 269–280.
5. Bard, J. B. 2002. Growth and death in the developing mammalian kidney: Signals, receptors and conversations. *Bioessays* **24**: 72-82.
6. Broadbeck, S. and Englert, C. 2004. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. *Pediatr. Nephrol.* **19**: 249-255.
7. Carroll, T. J., Park, J. S., Hayashi, S., Majumdar, A. and McMahon, A. P. 2005. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev. Cell* **9**: 283-292.
8. Chaffer, C. L., Thompson, E. W. and Williams, E. D. 2007. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* **185**: 7–19.
9. Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R.,

- Bachvarova, R. F. and Darnell, J. E. Jr. 1994. Disruption of the *HNF-4* gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* **8**: 2466–2477.
10. Chen, X. and Macara, G. 2005. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat. Cell Biol.* **7**: 262–269.
 11. Chiba, H., Sakai, N., Murata, M., Osanai, M., Ninomiya, T., Kajima, T. and Sawada, N. 2006. The nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α acts as a morphogen to induce the formation of microvilli. *J. Cell Biol.* **175**: 971-980.
 12. Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C. and Yaniv, M. 1999a. Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech. Dev.* **89**: 211-213.
 13. Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M., and Barra, J. 1999b. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1 β in visceral endoderm differentiation. *Development* **126**: 4785-4794.
 14. Couillard, M and Trudel, M. 2009. C-myc as a modulator of renal stem/progenitor cell population. *Dev. Dyn.* **238**: 405-414.
 15. Davies, J. A. and Fisher, C. E. 2002. Genes and proteins in renal development. *Exp. Nephrol.* **10**: 102-113.
 16. Davies, J. A., Lodomery, M., Hohenstein, P., Michael, L., Shafe, A., Spraggon, L. and Hastie, N. 2004. Developmental of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum. Mol. Genet.* **13**: 235-246.

17. Dressler, G. R. 2006. The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**: 509-529.
18. Duncan, S. A., Manova, K., Chen, W. C., Hoodless, P., Weinstein, D. C., Bachvarova, R. F. and Darnell, J. E. Jr. 1994. Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7598-7602.
19. Duncan, S. A., Nagy, A. and Chan, W. 1997. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* **124**: 279-287.
20. Eberle, F., Dubreuil, P., Mattei, M. G., Devilard, E. and Lopez, M. 1995. The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene. *Gene* **159**: 267-272.
21. Eeckhoutte, J., Moerman, E., Bouckennooghe, T., Lukoviak, B., Pattou, F., Formstecher, P., Kerr-Conte, J., Vandewalle, B. and Laine, B. 2003. Hepatocyte nuclear factor 4 α isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic β -cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology* **144**: 1686-1694.
22. Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrere, N., Gerber, H. P., Kikkawa, Y., Miner, J. H. and Quaggin, S. E. 2003. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* **111**: 707-716.

23. Fanning, A. S., Mitic, L. L. and Anderson, J. M. 1999. Transmembrane proteins in tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 1337–1345.
24. Furuta, H., Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y., Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J. and Ogata, M. 1997. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY1 gene and identification of missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* **46**: 1652–1657.
25. Garrison, W. D., Battle, M. A., Yang, C., Kaestner, K. H., Sladek, F. M. and Duncan, S. A. 2006. Hepatocyte nuclear factor 4 α is essential for embryonic development of mouse colon. *Gastroenterology* **130**: 1207–1220.
26. Grewal, J. S., Tsai, J. Y. and Khan, S. R. 2005. Oxalate-inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells. *Biochem. J.* **387**: 609-616.
27. Grünert, S., Jechlinger, M. and Beug, H. 2003. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 654–665.
28. Guarino, M. 2007. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 2153–2160.
29. Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. and Ladias, J. A. 1997. Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* **272**: 539–550.
30. Hatzis, P. and Talianidis, I. 2001. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4 α gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7320-7330.
31. Hay, E. D. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* **233**: 706–720.

32. Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. 2001. Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1393-1403.
33. Herzlinger, D., Koseki, C., Mikawa, T. and Al-Awqati, Q. 1992. Metanephric mesenchyme contains multipotent stem cells whose fate is restricted after induction. *Development* **114**: 565-572.
34. Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B. N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Koruki, H., Kasahara, T., Iwamoto, Y. and Bell, G. I. 1997. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* **17**: 384-385.
35. Ichii, O., Otsuka, S., Sasaki, N., Yabuki, A., Ohta, H., Takiguchi, M., Hashimoto, Y. and Kon, Y. 2010. Local overexpression of interleukin-1 family, member 6 relates to the development of tubulointerstitial lesions. *Lab. Invest.* **90**: 459–475.
36. Ihara, A., Yamagata, K., Nammo, T., Miura, A., Yuan, M., Tanaka, T., Sladek, F. M., Matsuzawa, Y., Miyagawa, J. and Shimomura, I. 2005. Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8) expressed in pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**: 984–990.
37. Jiang, S., Tanaka, T., Iwanari, H., Hotta, H., Yamashita, H., Kumakura, J., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T. and Naito, M. 2003. Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms in human and rats. *Nuclear Receptor* **1**: 5.
38. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M. and Zaret, K. S. 1999. Initiation of mammalian liver

- development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**: 1998-2003.
39. Kaufman, M. H. 1992. The atlas of mouse development. Academic Press, Tokyo. 465-468.
 40. Kobayashi, A., Kwan, K. M., Carroll, T. J., McMahon, A. P., Mendelsohn, C. L. and Behringer, R. R. 2005. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* **133**: 2809-2823.
 41. Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Husman, D. and Jaenisch, R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**: 679-691.
 42. Lazzaro, D., De Simone, V., De Magistris, L., Lehtonen, E. and Cortese, R. 1992. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development* **114**: 469-479.
 43. Lazarevich, N. L., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavitseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V. and Duncan, S. A. 2004. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* **39**: 1038-1047.
 44. Li, J., Ning, G. and Duncan, S. A. 2000. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF4 α . *Genes Develop.* **14**: 464-474.
 45. Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aqqarwall, A. K., Maas, R., Rosa, D. W. and Rosenfeld, M. G. 2003. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426**: 247-253.
 46. Lucas, B., Grigo, K., Erdmann, S., Lausen, J., Klein-Hitpass, L. and Ryffel, G. U. 2005.

- HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene* **24**: 6418–6431.
47. Meng, W. and Takeuchi, M. 2009. Adherens Junction: Molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**: a002899.
 48. Miura, A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takahashi, N., Fukui, K., Nammo, T., Yoneda, K., Inoue, Y., Sladek, F. M., Magnuson, M. A., Kasai, H., Miyagawa, J., Gonzalez, F. J. and Shimomura, I. 2006. Hepatocyte nuclear factor-4 α is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 5246–5257.
 49. Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, H. D. and Schedl, A. 1999. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **126**: 1845-1857.
 50. Nishinakamura, R. and Osafune, K. 2006. Essential roles of *Sall* family genes in kidney development. *J. Physiol. Sci.* **56**: 131-136.
 51. Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I. and Ryffel, G. U. 1998. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 α predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acid Res.* **26**: 497-504.
 52. Niehof, M. and Borlak, J. 2008. HNF4 α and Ca-channel TRPC1 are novel disease candidate genes in diabetic nephropathy. *Diabetes* **57**: 1069-1077.
 53. Ninomiya, T., Hayashi, Y., Saijoh, K., Ohta, K., Yoon, S., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., Kasuga, M. and Itoh, H. 1996. Expression ratio of hepatocyte nuclear factor-1 to variant hepatocyte nuclear factor-1 in differentiation of hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma. *J. Hepatol.* **25**: 445-453.

54. Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I. and Young, R. A. 2004. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**: 1378-1381.
55. O'Brien, L. E., Zegers, M. M. P. and Mostov, K. E. 2002. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 531–537.
56. Olsen, L., Bressendorff, S., Troelsen, J. T. and Olsen, J. 2005. Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**: G220-G226.
57. Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K. and Takai, Y. 2007. Cooperative role of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *J. Cell Biol.* **15**: 2352–2365.
58. Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kastner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S. and Duncan, S. A. 2003. Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* **34**: 292–296.
59. Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J. P., Babinet, C. and Yaniv, M. 1996. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal fanconi syndrome. *Cell* **84**: 575-585.
60. Reymond, N., Febre, S., Lecoq, E., Adelaide, J., Dubreuil, P. and Lopez, M. 2001. Nectin4/PRR4: A new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J. Biol. Chem.* **276**: 43205–43215.
61. Sainio, K., Suvanto, P., Davies, J., Wartiovaara, J., Wartiovaara, K., Saarma, M., Arumäe, U.,

- Meng, X., Lindahl, M., Pachnis, V. and Sariola, H. 1997. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development* **124**: 4077-4087.
62. Satoh-Horikawa, K., Nakanishi, H., Takahashi, K., Miyahara, M., Nishimura, M., Tachibana, K., Mizoguchi, A. and Takai, Y. 2000. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activity. *J. Biol. Chem.* **275**: 10291–10299.
63. Sariola, H. 2002. Nephron induction revisited: from caps to condensates. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11**: 17-21.
64. Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **288**: C1213–C1228.
65. Sel, S., Ebert, T., Ryffel, G. U. and Drewes, T. 1996. Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 α and HNF1 α . *Cancer Lett.* **101**: 205-210.
66. Shook, D. and Keller, R. 2003. Mechanisms, mechanistic and function of epithelial-mesenchymal transition in early development. *Mech. Dev.* **120**: 1351–1383.
67. Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E. and Darnell, I. E. 1990. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Develop.* **4**: 2353-2365.
68. Spath, G. F. and Weiss, M. C. 1998. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J. Cell Biol.* **140**: 935-946.

69. Stark, K., Vainio, S., Vassileve, G. and McMahon, A. P. 1994. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372**: 679-683.
70. Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W. and Ogita, H. 2008. Nectins and nectin-like molecules: role in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 603–615.
71. Takai, Y. and Nakanishi, H. 2003. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J. Cell Sci.* **116**: 17–27.
72. Tang, M. J., Worley, D., Sanicola, M. and Dressler, G. R. 1998. The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **142**: 1337-1345.
73. Taraviras, S., Monaghan, A. P., Schütz, G. and Kelsey, G. 1994. Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech. Develop.* **48**: 67-79.
74. Thiery, J. P. 2003. Epithelial-mesenchymal transition in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 740–746.
75. Thomas, H., Jaschkowitz, K., Bulman, M., Borgschulze, M., Lingott, A., Hattersley, A. T. and Ryffel, G. U. 2001. A distant upstream promoter of the Hnf-4 α gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 2089–2097.
76. Tirona, R. G., Lee, W., Leake, B. F., Lan, L. B., Cline, C. B., Lamda, V., Parviz, F., Duncan, S. A., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Schütz, E. G. and Kim, R. B. 2003. The orphan nuclear

- receptor HNF4 α determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat. Med.* **9**: 220-224.
77. Torres-Padilla, M. E., Sladek, F. M. and Weiss, M. C. 2002. Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complex. *J. Biol. Chem.* **277**: 44677–44687.
 78. Watt, A. J., Garrison, W. D. and Duncan, S. A. 2003. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* **37**: 1249-1253.
 79. Winter, W. E. and Silverstein, J. H. 2001. Molecular and genetic bases for maturity onset diabetes of youth. *Curr. Opin. Pediatr.* **12**: 388-393.
 80. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X., Cox N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S. and Bell, G. I. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**: 455-458.
 81. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M. and Bell, G. I. 1996. Mutations in the hepatic nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458-460.

Clarification of molecular network during nephrogenesis in mice

-Hepatocyte nuclear factor 4 alpha plays a central role in nephrogenesis-

Tomonori Kanazawa

Laboratory of Anatomy

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Veterinary Medicine

Hokkaido University

Kidney development is started by invasion of the ureteric bud (UB) arising from the Wölfian duct into the metanephric mesenchyme (MM). Then the MM concentrates around the UB tips and forms the condensed mesenchyme (CM). The CM transforms sequentially to the renal vesicles, comma-shaped body (CSB), S-shaped body (SSB) and finally the nephron. In these processes, MM cells turn to nephron resulting by the mesenchymal-epithelial transition (MET). Although the biological mechanism of nephrogenesis and MET have been clarified gradually, a lot of uncertain points still remain, owing to the complexity of kidney structure.

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Hnf4 α) protein is one of the Zinc finger type-nuclear transcription factors expressing in the liver, intestine, pancreatic beta cells and kidney. Hnf4 α has a relationship among large amount of gene regulation in hepatocytes and pancreatic beta cells, playing a key role in fat metabolism, insulin secretion and maintenance of the homeostasis. However, since disruption of the *Hnf4a* gene results in embryonic lethality due to embryonal endodermal cell death and failure of gastrulation before kidney development, its renal function

is still unknown.

In this research, to clarify the dynamics and the function of Hnf4 α during nephrogenesis, following analyses were performed. In chapter 1, the localization of Hnf4 α in several organs and the dynamics of this gene during nephrogenesis were investigated. In chapter 2, to assess the function during nephrogenesis, gene-silencing of *Hnf4a* was performed in organ-cultured kidney by RNAi method. Additionally, micro-environmental gene expression of Hnf family was investigated. In chapter 3, to elucidate the details of MET during nephrogenesis, the embryonic kidneys were analyzed by electron microscopy, immunohistochemistry, and molecular biology. In addition, cellular model inducing the expression of *Hnf4a* gene into fibroblast cell line was produced and analyzed, in order to assess the relationship between Hnf4 α and MET.

In chapter 1, it was clarified that *Hnf4aP1* or *P2* was expressed dominantly in kidney and in stomach and pancreas respectively, while both types were expressed in liver, small intestine and large intestine. In immunohistochemical analysis, Hnf4 α protein was located only in the segment of the proximal tubules in kidney, but not in the other segment. In the developing kidney, Hnf4 α was detected first at the epithelial cell nuclei in part of the CSB/SSB, distributed widely throughout the developing nephron and finally restricted to proximal tubules. Interestingly, it was noted that *Hnf4aP1* and *P2* were detected from stomach, pancreas and kidney tissues in embryonic periods. Additionally, Hnf4 α was expressed earlier than Hnf1 α in the same tubule, giving the impression that Hnf4 α played the more fundamental role in Hnf network during nephrogenesis.

In chapter 2, as a result of gene-silencing, the cellular organization in the CM fell into disorder and many apoptotic cells appeared in cultured kidney. LMD-RT-PCR revealed that both

of *Hnf4aP1* and *P2* were expressed in the CM and only *P1* was expressed in the CSB/SSB, while both were not detected in the MM. Additionally, only *Hnf1b* which are up-stream genes of *Hnf4a* was expressed in the CM and *Hnf1a* and *Hnf1b* were expressed in the CSB/SSB. These results suggested that Hnf4 α played an important role during cell survival in the CM and this gene expression was induced by Hnf1 β .

In chapter 3, the TEM observation and immunohistochemistry in developing kidney showed that the intercellular junction, but not the basal lamina, was present in the CM. Additionally, immediately after *Hnf4a* gene expression, the expression of epithelial genes (*Krt8*, *Tjp1*, and *Cdh1*) increased, and those of mesenchymal genes (*Acta1* and *Vim*) decreased, in the CM compared to the MM. In the cellular model analysis, it was noted that Hnf4 α induced increasing epithelial and decreasing mesenchymal gene expression. In this analysis, up-regulation of *Pvr11*, -2, and *Mlt4* genes which mediate the formation of apico-basal polarity, were found. These results suggested that the cells in the CM showed the intermediated forms between epithelial and mesenchymal and Hnf4a proteins induced the MET in typical fibroblast.

In conclusion, following dynamics model was provided; Hnf4 α appears in the CM stage and in the CSB/SSB stage. In the CM stage, both of *P1* and *P2* induced by Hnf1 β relate to the cellular survival and the initiation of MET via activating Nectin-Afadin. In the CSB/SSB stage, only *P1* is expressed and up-regulates the expression of *Hnf1a*. Hnf1 α and Hnf4 α activate the gene expression each other and relate to the characterization of proximal tubules.