

称号及び氏名	博士（獣医学）	山口 達弘
学位授与の日付	令和元年8月31日	
論文名	Generation of visualizing mice of type I collagen-producing cells and application on renal fibrosis (1型コラーゲン産生細胞可視化マウスの作製と腎線維化における応用)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	岡田 利也
	副査	三宅 眞実

論文要旨

緒言

1980年代初頭に遺伝子改変技術の基礎が築かれてから今日までに、数多くの遺伝子改変マウスが作製され生命科学研究に活用されてきた。遺伝子改変マウスは3種類に大別される。外来性の遺伝子を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウス、標的遺伝子の機能が欠失されたノックアウト (KO) マウス、ゲノム上の標的部位に外来性遺伝子が挿入されたノックイン (KI) マウスである。単純な KO マウスは標的遺伝子の機能を調べる際に有用であるが、特定組織における遺伝子機能を調べる際には、コンディショナル KO (cKO) マウスが用いられる。cKO マウスでは、組織特異的プロモーターで Cre タンパクを発現する Tg マウスと、標的遺伝子の前後に LoxP 配列が挿入された KI マウスを掛け合わせることで、特定の組織のみで標的遺伝子が KO されている。Tg マウスは cKO マウスの作製以外にも、標的細胞を可視化するためのモニターマウスとして活用されることも多い。

これまで数多くのモニターマウスが報告されてきたが、その内のひとつである、1型コラーゲン産生細胞を可視化した Coll1-GFP Tg マウスは線維化疾患研究で大いに活用されてきた。肝線維化において、病態の形成に重要なのが筋線維芽細胞と呼ばれるコラーゲン産生細胞である。これまでに Coll1-GFP Tg マウスを用いて、肝線維化病態時における筋線維芽細胞の由来が追究されている。このように、Coll1-GFP Tg マウスは線維化疾患研究に非常に有用であるため、本研究では Coll1-GFP Tg マウスの作製を試みた。

第1章では、Coll1-GFP Tg マウスの作製方法について述べる。第2章では、この Tg マウスの全身の組織学的解析を行うことで、1型コラーゲン産生細胞が GFP で標識されているかを解析するとともに、この Tg マウスを用いて、これまでに知られていない1型コラーゲン産生細胞を探索した。第3章では、この Tg マウスの応用性を検証するために、作製した Tg マウスを用いてシスプラチン誘発腎線維化のメカニズム解析を実施した。

第1章：Coll1-GFP Tg マウスの作製

第1章では、Coll1-GFP Tg マウスを新たに作製し、皮膚の組織学的解析を行うことで GFP 発現細胞の分布を確かめた。

Coll1a1 のプロモーター領域とエンハンサー領域、GFP 配列及び polyA 配列を含むベクターを C57BL/6 マウスの前核期受精卵にマイクロインジェクションし、仮親に受精卵を移植した。仮親から産まれた産仔の遺伝子型判定を PCR で実施し、5匹のファウンダー Tg マウスを獲得した。得られたファウンダー Tg マウスをそれぞれ野生型マウスと交配し、その内3匹の Tg マウスで遺伝子の子孫伝達を確認し、3つの Tg 系統の樹立に成功した(系統#2、#13、#14)。

獲得した Tg 系統で1型コラーゲン産生細胞が標識されているかを確認するため、皮膚の組織学的解析を行った。皮膚は表皮と真皮に分けられ、1型コラーゲンを産生する線維芽細胞は真皮に存在する。樹立した Tg 系統の皮膚では、全ての系統で真皮にのみ GFP 発現細胞を認めた。このことから、全ての Tg 系統において1型コラーゲンを産生する細胞が標識されていると考えられた。GFP の発現強度が高い方が1型コラーゲン産生細胞を広く検出できると考え、以降の実験では真皮の線維芽細胞で最も発現強度の高かった#14系統を用いることにした。

第2章：正常組織における GFP 発現細胞の解析

これまで、Coll1-GFP Tg マウスの全身の組織学的解析を行った報告は無い。そこで、第2章では、作製した Tg マウスの全身を組織学的に解析し、GFP 発現細胞の分布を調べた。

第1節 全身組織におけるコラーゲン線維と GFP 発現細胞の分布の比較

全身組織において、コラーゲン線維の分布をシリウスレッド染色により調べ、コラーゲン線維の存在部位と GFP を発現するコラーゲン産生細胞の分布が一致するのかを、蛍光画像を用いて解析した。その結果、今回解析を行った全身11組織(脳、心臓、肺、脾臓、胃、大腸、皮膚、骨格筋、肝臓、腎臓、精巣)の全てで、GFP 発現細胞はシリウスレッド染色陽性領域内に存在していた。また、皮膚や骨格筋において、シリウスレッド染色では同定が難しかったコラーゲン産生細胞が、Coll1-GFP Tg マウスを用いることで明瞭になることが明らかになった。

以上のことから、作製した Tg マウスは全身組織において1型コラーゲン産生細胞を標識し、その同定に有用であることが示された。

第2節 免疫組織化学染色を用いた GFP 発現の特異性の確認

第2章第1節において、GFP 発現細胞は常にシリウスレッド染色陽性領域内に存在することを示したが、この領域にはコラーゲンを産生しない血管内皮細胞も存在する。そこで、血管内皮細胞が GFP を発現しているかを確認するために血管内皮細胞のマーカーであるフォンビレブランド因子に対する免疫組織化学染色を実施した。その結果、心臓や肝臓において、GFP 発現細胞と血管内皮細胞は常に隣接しているが異なる細胞であることが分かった。

以上より、作製した Tg マウスでは、血管内皮細胞は GFP を発現しておらず、1型コラーゲン産生細胞が特異的に標識されていることが示唆された。

第3節 1型コラーゲン産生細胞の探索

第2章第1節及び第2節において、この Tg マウスが1型コラーゲン産生細胞を標識していることを明らかにした。そこで、この Tg マウスを用いて免疫組織学的解析を行い、これまでに知られていない1型コラーゲン産生細胞を探索した。

腎糸球体において GFP 発現細胞が見られ、その核内で足細胞のマーカーである Wilms' tumor 1 の共発現が確認された。肝臓では、肝細胞周囲に GFP 発現細胞が見られ、肝星細胞のマーカーであるグリア細線維性酸性蛋白質の共発現が確認された。また、精巣では、間質で多角形の GFP 発現細胞が見られ、ライディッヒ細胞のマーカーである 3 β -hydroxy- Δ 5-steroid dehydrogenase の共発現が確認された。

以上のことから、糸球体足細胞、肝星細胞やライディッヒ細胞が1型コラーゲン産生能を持つことが示唆された。

第3章：シスプラチン誘発腎線維化の解析

シスプラチン誘発腎線維化は、シスプラチンの毒性により近位尿細管が傷害され、その後炎症が生じ、徐々に線維化が進行する病態である。第3章では、Coll-GFP Tg マウスにシスプラチンを投与して腎線維化を誘導し、線維化の病態進展に関わるコラーゲン産生細胞の解析を行った。

Coll-GFP Tg マウスにシスプラチンを 15 mg/kg で腹腔内投与した後、1、2、5週後にマウスを安楽殺して腎臓を取り出し、組織学的解析を実施した。HE 染色の結果、1週後には多くの尿細管に上皮細胞の壊死・脱落が見られ、2週と5週後には傷害された尿細管に再生上皮細胞が見られた。シリウスレッド染色の結果、傷害尿細管の間質にコラーゲンの沈着が経時的に増加した。GFP 蛍光の観察から、1週後の間質で GFP 強発現細胞が間質に観察された。2週と5週後では上述した間質細胞の GFP 蛍光強度は減弱したが、一方再生尿細管上皮細胞で軽度の GFP 蛍光が見られた。

腎線維化におけるコラーゲン産生細胞の主体は筋線維芽細胞とされることから、筋線維芽細胞のマーカーである α -平滑筋アクチン (α -SMA)、vimentin と desmin に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、1週後の間質における GFP 発現細胞は α -SMA を共発現していたが、2週と5週後にはそのような細胞は見られなくなった。また、1週、

2 週、5 週間後の間質において GFP 発現細胞は vimentin あるいは desmin を共発現することが分かった。

以上より、シスプラチン誘発腎線維化では、病態の初期には α -SMA 発現の筋線維芽細胞がコラーゲン産生の主たる細胞であること、後期には vimentin あるいは desmin 発現の筋線維芽細胞に加え、再生尿細管上皮細胞もコラーゲンを産生する可能性が示された。後者の所見は上皮 - 間葉転換を示唆するものと考えられた。

総括

この研究では、遺伝子改変技術を用いて 1 型コラーゲン産生細胞を可視化する Col1-GFP Tg マウスを作製し、以下のことを明らかにした。

1. 作製した Tg マウスの全身組織における GFP 発現細胞の分布を解析することで、GFP が 1 型コラーゲン産生細胞に特異的に発現していることが分かった。
2. 作製した Tg マウスを用いて、糸球体足細胞、肝星細胞やライディッヒ細胞が 1 型コラーゲン産生能を持つ可能性が示された。
3. 作製した Tg マウスにシスプラチンを投与することで腎線維化モデルを作製し、初期では筋線維芽細胞が、その後は再生尿細管上皮細胞からもコラーゲンが産生される可能性を示した。後者の所見は、上皮 - 間葉転換を示唆すると考えられた。

以上、作製した Tg マウスはコラーゲン産生細胞の生理的役割や、医薬品開発における薬効薬理学的な病態解析、特に線維化におけるコラーゲン産生細胞の役割を解明する上で、有用なモデルになると思われる。

審査結果の要旨

遺伝子改変動物の一つであるトランスジェニック(Tg)マウスは、人為的に導入した外来性遺伝子を過剰発現させることが可能であり、バイオサイエンス分野の研究において広く利用されている。そのような Tg マウスは、ヒトの疾患モデルとしての利用に加え、特定の細胞を可視化するためのモニターマウスとしても用いられている。モニター Tg マウスとしては、1 型コラーゲン産生細胞を可視化した Col1-GFP Tg マウスが良く知られている。線維化の形成において、重要な役割を演じる細胞がコラーゲンを産生する筋線維芽細胞であり、この細胞は既存の線維芽細胞から形成される。そのために、この Col1-GFP Tg マウスを用いて、実験的に誘発した肝線維化に出現する筋線維芽細胞の細胞特性が追究されている。しかし、この既報の Col1-GFP Tg マウスには、いくつか改善すべき点が指摘されている。

この研究では、既報の Tg マウスの課題を改善する新たな手法を用いて Col1-GFP Tg マウスを作製することに成功している。この新たな Tg マウスの有用性を検討する目的で、

1型コラーゲンを産生する GFP 発現細胞の全身組織における分布と特徴を解析するとともに、さらに、この新たに作製した Tg マウスを用いてシスプラチン誘発腎線維化モデルを作製することで、腎線維化の進展に係る 1 型コラーゲン産生細胞の動態と起源を追究している。

第 1 章では、受精卵インジェクション法による新たな Coll-GFP Tg マウスの作製法について報告している。既報では C3H/C57B1 という雑種系統のマウスを用いているのに対して、この研究では、疾患モデル作製に応用する際に安定した病態を誘導できることが期待出来る C57BL/6 の純系マウスを用いている。また、1 型コラーゲン産生細胞の検出感度を上げるために、既報のマウスで用いられたベクターコンストラクトに polyA 配列を付加することで mRNA の安定性を向上させ、GFP 蛋白質の発現量を増加させている。その結果、3 つの Tg 系統の樹立に成功し、さらに真皮における GFP 発現を系統間で比較することで、GFP 発現の 1 型コラーゲン産生細胞の分布に系統間の差はないが、GFP の発現強度に差があることを見出している。最終的に最も高感度に 1 型コラーゲン産生細胞を標識した Tg 系統を選抜し、第 2 章と第 3 章の研究に用いている。

第 2 章では、第 1 節において作製した Tg マウスの全身組織を用いて GFP 発現細胞の分布を解析している。方法としては、全身 11 組織におけるコラーゲンを染色するシリウスレッド染色画像と、1 型コラーゲン産生 GFP 発現細胞の蛍光画像との局在を、組織化学的手法により比較解析している。その結果、その分布が一致していることを明らかにしている。また、第 2 節において、心臓と肝臓における血管内皮細胞をフォンビルブランド因子に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を施し、GFP 発現細胞との蛍光画像を比較している。その結果、血管内皮細胞と 1 型コラーゲン産生細胞とは異なることを明らかにしている。さらに、第 3 節では、肝星細胞のマーカであるグリアル線維性酸性蛋白質、糸球体足細胞のマーカである Wilms' tumor 1、そして精巣のライディッヒ細胞のマーカである 3β -hydroxy- Δ 5-steroid dehydrogenase に対するそれぞれの抗体を用いた免疫蛍光染色像と GFP 発現画像を観察することで、これらの細胞が 1 型コラーゲンを産生する可能性を提示している。以上、第 2 章では、新たな Coll-GFP Tg マウスを用いて、1 型コラーゲン産生細胞の分布と細胞特性を明らかにしている。

第 3 章では、腎毒性のあるシスプラチンをこの Tg マウスに投与することで腎線維化を誘導し、線維化の進展における 1 型コラーゲン産生細胞の経時的な細胞特性を追究している。その結果、病態の初期には尿細管間質の線維芽細胞が 1 型コラーゲン産生の主体であり、病態の進展とともに傷害後に再生する尿細管上皮細胞も次第に 1 型コラーゲンの産生を増加させる可能性を示した。また、筋線維芽細胞は、 α -平滑筋アクチン (α -SMA)、vimentin そして desmin などの細胞骨格を種々の割合で発現することが知られているが、GFP 発現間質線維芽細胞において、vimentin や desmin は常に発現していたのに対し、活性型筋線維芽細胞に発現する α -SMA は病態の初期においてのみ一過性に発現していた。以上、第 3 章で

は、シスプラチン誘発腎線維化では、間質線維芽細胞に由来する筋線維芽細胞は初期においてのみ α -SMA を発現すること、さらに、進展した線維化では傷害後の再生尿細管上皮細胞も 1 型コラーゲンを産生する可能性を提示している。なお、後者の所見は上皮 - 間葉転換がこの現象に関与する可能性を示唆すると考察している。

本研究は、新たに作製した Tg マウスの 1 型コラーゲン産生細胞の分布と細胞特性を明らかにするとともに、医薬品開発における薬効薬理学的な病態解析、特に腎線維化における 1 型コラーゲン産生細胞の役割を解明する上で、有用なモデルになることを提示している。よって、この研究成果は、獣医学・医学、特に実験動物学・毒性病理学の研究分野の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。