

氏名（本籍）	許 漢修 (Han-Hsiu HSU)	( 台湾 )
学位の種類	博 士 ( 生物工学 )	
学位記番号	博 甲 第 6950 号	
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
審査研究科	生命環境科学研究科	
学位論文題目	Roles of Type V Collagen Fibril, Comparative to Types I and IV, in Nephrogenesis (ネフロン発生における V 型コラーゲン線維の役割—I 型と IV 型との比較)	
主査	筑波大学教授	工学博士 王 碧昭
副査	筑波大学教授	博士(農学) 青柳 秀紀
副査	筑波大学准教授	博士(学術) 中島 敏明
副査	筑波大学准教授	博士(理学) 山田 小須弥

## 論 文 の 要 旨

臓器発生において、細胞外マトリックスがどのように寄与しているか、その役割がまだ未解明である。本研究は過渡的に発現する V 型コラーゲンに着目し、発生期腎臓における V 型コラーゲンの存在と構造、発生期の時系列での V 型コラーゲンの時空間的な発現・局在及び機能を解明した。V 型コラーゲンは腎線維症時の糸球体基底膜発現、早老症時の腎糸球体メサンギウム基質発現など、アダルトの腎組織では病気の原因となる細胞外マトリックス (ECM) と見られていた。一方、V 型コラーゲンは腎間質マトリックス、基底膜マトリックス形成の起因 ECM であり、腎組織成熟誘導を担っていると推測された。又、腎発生において、糸球体形成部分に一過的な発現の報告はあったが、通常 V 型コラーゲンが何をしているのか、V 型コラーゲンの腎における役割は不明であった。本研究では ICR マウス発生期の前期、中期、後期の胎児腎臓及び新生児初日のマウス腎臓切片を用い、蛍光免疫染色、RT-PCR、共焦点顕微鏡観察、透過性電子顕微鏡により、V 型コラーゲンの構造、発現量変化および局在を解析した。その結果、V 型コラーゲンは通常のコラーゲンの分子形態ではなく、線維の形態を呈した。また発生腎での発現量変化を検証した結果、発生初期から徐々に出現し、中期に発現量がピークに達し、後期になると消失したといった時間的な変化も認められた。腎臓内部での局在は発生段階により、未成熟な尿細管、糸球体前駆体近傍や周辺に大量発現といった空間的な変化がみられた。これらの結果により、V 型コラーゲン線維は腎臓発生期に過渡的に出現する細胞外マトリックスであることを明らかにした。

本研究はさらに独自で開発した手法で豚の角膜から V 型コラーゲンの分子を抽出・精製し、線維形態を再構成した。蛍光ラベルした線維を足場とし、*in vitro* で発生初期腎臓を培養し、コラーゲンの uptake を確認した。また、コラーゲンの機能を比較するため、市販の I 型コラーゲンと IV 型コラーゲン溶液から、I 型コラーゲン線維と IV 型コラーゲンメッシュも作成し、それぞれの線維を足場として使用した。*in vitro* 培養系においてコラーゲンを培養ディッシュの底部にコートする足場の 2 次元培養とゲルに組み込まれる 3 次元培養法を使用し、発生初期のマウス胎児腎臓を足場上とゲル内で培養した。その結果、コラーゲンコート無しの培養系に比べ、V 型コラーゲン系では培養初日から尿管芽が大幅な運動・伸展した。一方、

I型コラーゲン線維はコントロールと同様に変化が見られない。IV型コラーゲンは培養数日後、尿管芽が顕著に分岐した。siRNAの実験により、発生初期の腎臓にV型コラーゲンの発現が阻害される場合、尿管芽の伸長が顕著に阻害されたことも明らかにした。更に各発生期の腎臓から抽出したECMをカーバガラス上に風乾し、蛍光染色した結果、V型コラーゲンのみが発生初期に細い線維の形態で出現し、中期に入ると、V型線維の場所にI型線維が共局在し、両者は共に太い線維を形成した。これらの結果から、V型コラーゲンは腎臓の発生に必要なECMであり、尿管と糸球体前駆体の形成初期に細胞の移動・伸展及び拡張に影響を及ぼすことを証明した。また、I型やIV型のコラーゲンより早い時期に出現し、I型コラーゲンの線維化に導いたため、パイオニア的ECMとして存在することが考えられた。

上記の結果により、Col V線維が発生初期において、未成熟組織の細胞に移動・配列しやすいダイナミックな環境を提供し、尿管芽の伸展遊走および糸球体構築の細胞凝集を促進することを示唆した。一方、IV型コラーゲンは発生中後期に成熟しつつある尿管芽に均一に分岐と糸球体の成熟に安定維持する環境を与えることを示唆した。この両者の時空間的な配合の制御により、腎組織の構築、臓器再生に応用できると考えられる。

## 審 査 の 要 旨

現在の再生医療では、細胞外マトリクス (ECM) タンパクを利用する場合、安定な接着、増殖、細胞死の抑制という意味でのみの利用に終わり、組織形成用ECMのコンセプトが薄い。本研究では、組織形成の主軸として、細胞外微細環境流動の誘導を置くことで、新たな臓器再生において以下のコンセプトを打ち立てた。①腎形成において、V型コラーゲンというECMが、線維フォームで有効な働きをすることを明示した。さらに、V型コラーゲンは未成熟組織の周辺にしか発現せず、V型コラーゲン遺伝子のノックダウンにより成熟組織が形成できないことから、V型コラーゲン線維が腎臓組織形成に必要なかつ一過性的な環境を誘導できるECMであることを明示した。②未成熟かつ過疎的な尿管原基や糸球体前駆体の微小環境において、発生時系列を経て、安定なECMが織り込み、ダイナミック (V型コラーゲン) とスタティック (I型、IV型コラーゲン) の相反するECMの織り込みが成熟組織を創出することにより、V型コラーゲン線維がパイオニア的ECMであることを明確化した。これらの知見をもとに、腎発生原基の尿管芽と糸球体分化前駆の間充細胞に対して、流動作用を機能するV型コラーゲンと安定作用を機能するECM (IV型コラーゲン) などの適切な配合により超高次構造の構築を可能化することが期待でき、再生医療への応用面で実利を示すことが示唆され、新しい医療の切り口の基盤をなす研究として本論文は評価できる。

平成26年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。