

論文内容の要旨

申請者氏名 川本 明代

副甲状腺は、血中のカルシウム恒常性を司る内分泌組織で、カルシウム濃度低下を感知し、副甲状腺ホルモン(*parathyroid hormone*; PTH)を分泌する。マウスの発生過程で、副甲状腺は胸腺との共通の原基として第三咽頭嚢内に形成され、胎生 10 日目 (E10.0) 前後にその背前部位で副甲状腺マスター因子 *gcm2* が発現して胸腺と区別される。その後、副甲状腺と胸腺の原基は分離し、副甲状腺は甲状腺へと移動して付着する。これまでに、共通原基の決定に関わる遺伝子群 (*hoxa3*, *pax1/9*, *gata3* など) が同定され、*gcm2* ノックアウトマウス (*gcm2*^{-/-}) は副甲状腺を完全に欠くことが明らかにされている。しかし、より後期の副甲状腺の発生過程 (胸腺との分離や甲状腺への移動) の制御機構や PTH 遺伝子の発現制御機構はわかっていない。本論文では、成熟した副甲状腺に転写因子 MafB が発現することを見いだし、副甲状腺の発生過程や機能制御におけるその役割の解明を試みた。

マウス胎児切片の免疫染色により、副甲状腺原基において MafB は、*gcm2* の発現よりも遅い E11.5 から発現が開始し、以後成体まで発現が持続することを明らかにした。一方、*gcm2*^{-/-} の副甲状腺原基では MafB の発現は検出されず、MafB は Gcm2 の下流で機能すると考えられた。

次に、*mafB* ノックアウトマウス (*mafB*^{-/-}; *mafB*:GFP knock-in mouse) の解析を行なったところ、副甲状腺は胸腺上皮内に存在しており、PTH の発現は認められなかった。また、*mafB*^{+/-} の副甲状腺は甲状腺と胸腺の間の頸動脈に付着していたことから、MafB は副甲状腺と胸腺の分離や移動を制御することが示唆された。*mafB*^{-/-} の副甲状腺様細胞では、細胞間反発に関わる EphA1 の発現が減少していたが、*epha1* ノックアウトマウスの副甲状腺は正常に胸腺と分離して甲状腺近傍に存在していたことから、副甲状腺と胸腺の分離への EphA1 の関与は否定的であり、その分子機構は未解明である。

一方、*mafB*^{-/-} の血清 PTH 量と腎臓での PTH 標的遺伝子 *cyp27b1* mRNA は激減していた。そこで MafB が PTH 遺伝子の転写を直接制御しているかを検討し、PTH 遺伝子プロモーター領域の動物種間で高度に保存された領域 (evolutionally conserved region; ECR) のひとつ ECR4 (-4.3~4.8 kb) を介して、MafB、Gcm2、GATA3 が協調的に転写を活性化することを明らかにした。この領域内に、Maf と Gcm2 が結合する配列をそれぞれ 1 つずつ同定した。さらに免疫沈降法により MafB、Gcm2、GATA3 は互いに物理的に相互作用することを見いだした。

以上の結果により、MafB は Gcm2 の下流で副甲状腺の発生の後期過程 (胸腺からの分離と甲状腺への移動) を制御しており、さらに Gcm2 や GATA3 と協調して PTH プロモーターを活性化することが明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 川本 明代

内分泌組織のひとつである副甲状腺は、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone; PTH) を分泌し、血中のカルシウムホメオスタシスを司ることで生命の維持に必須の役割を果たしている。副甲状腺の初期発生過程を制御する転写因子 Gcm2 や Gata3 の遺伝子変異はヒト副甲状腺低形成症の原因となることから、その発生過程や PTH の発現制御機構の理解は重要であるが、よくわかっていない点が多い。本論文では、マクロファージや膵内分泌細胞などの分化・機能維持との関連が深い転写因子 MafB の副甲状腺の発生過程や機能制御における役割の解明を行い、以下の知見を得た。

まず、マウスの発生段階における MafB の発現を調べ、副甲状腺マスター因子 *gcm2* の下流で E11.5 から発現が開始し、以後成体まで発現が持続することを明らかにした。次に、*mafB* 遺伝子破壊マウスの副甲状腺を調べたところ、ホモ欠失 (*mafB*^{-/-}) 個体では、副甲状腺は本来あるべき甲状腺付近ではなく、胸腺上皮内に異所性に存在していた。また、ヘテロ欠失 (*mafB*^{+/-}) 個体でも、副甲状腺は甲状腺と胸腺の間の頸動脈に付着して存在していた。これらの異所性の副甲状腺には初期分化マーカー CaSR が発現していたことから、MafB は副甲状腺の発生後期過程・成熟過程を制御し、胸腺との分離や甲状腺への移動に必須であることがわかった。MafB の下流でそれらの過程に関与する分子を検索し、細胞間反発に関与する EphA1 や細胞接着に関与する P-Cadherin の発現が *mafB* ホモ欠失あるいはヘテロ欠失個体で消失あるいは減少していることを見いだしたが、*ephA1* ホモ欠失マウスと *P-cadherin* ホモ欠失マウスの副甲状腺に異常は認められず、これらの分子の関与は否定的であった。

一方で、*mafB* ホモ欠失個体においては、その副甲状腺には PTH の発現は認められず、血清 PTH 量は激減し、PTH の腎臓での標的遺伝子 25-hydroxyvitamin D₃ 1- α -hydroxylase の mRNA 発現量も激減していることを見いだした。そこで、MafB が PTH 遺伝子の転写を直接制御しているかを検討し、転写開始点より上流-4.3~-4.8 kb に保存された領域 ECR4 を見だし、この領域内に MafB と Gcm2 の結合配列を同定した。その上で、PTH 遺伝子のプロモーターが、ECR4 領域を介して、MafB, Gcm2, Gata3 の3つの転写因子によって協調的に活性化されることをレポーターアッセイにより示した。さらに、副甲状腺の発生過程を司るこれらの3つの転写因子が、互いに物理的に相互作用することも免疫沈降法により示した。

以上のように、本論文は哺乳動物の副甲状腺の発生後期過程・成熟過程と PTH 遺伝子発現の分子機構を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。