

氏名	なか つえ たけ し 中 枝 武 司
学位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第21号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy (実験的膜性腎症においてネフリンとポドシンは蛋白尿発 症時に解離する)
論文審査委員	主査 教授 山 本 格 副査 教授 下 條 文 武 副査 教授 清 水 不 二 雄

#### 博士論文の要旨

膜性腎症は、蛋白尿を主な症状とする疾患であるが、その蛋白尿発症の機序は未だ明らかにされていない。蛋白尿発症において、糸球体上皮細胞足突起の間に存在するスリット膜が糸球体係蹄壁のバリアー機能を維持する上で重要な役割を果たしていることは既に報告されている。近年、スリット膜関連分子として、ネフリン、ポドシン、CD2APなどの重要な分子の存在が明らかにされてきた。しかし、ラットの膜性腎症モデルであるハイマン腎炎において、それらの分子の発現、相互関係に関する報告はなかった。今回、ハイマン腎炎における糸球体上皮細胞関連分子、特にスリット膜関連分子の動態を検討した。

ラットの尿細管刷子縁抗原である Fx1A を抽出し、ウサギとヒツジの二種類の抗 Fx1A 抗体を用いて受け身型ハイマン腎炎を惹起した。Fx1A を直接免疫する能動型ハイマン腎炎も惹起し、スリット膜関連分子（ネフリン、ポドシン、CD2AP）とその他の糸球体上皮細胞関連分子（ポドカリキシン、 $\alpha 3$  インテグリン）の発現を、蛍光抗体法を用いて検討した。また、スリット膜関連分子の相互関係を蛍光抗体法の二重染色を用いて検討した。糸球体の可溶化材料と尿を用いて、ウェスタンブロッティングを行い、ネフリンとポドシンの発現を検討した。リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を用いて、早期の受け身型ハイマン腎炎におけるスリット膜関連分子の mRNA の発現を解析した。

リアルタイム RT-PCR では、受け身型ハイマン腎炎におけるネフリンとポドシンの mRNA の発現は、蛋白尿出現前から減少していた。蛍光抗体法では、受け身型ハイマン腎炎の早期から、ネフリン、ポドシン、CD2AP の染色性は線状から顆粒状に変化していた。 $\alpha 3$  インテグリンの染色性に変化は認められなかった。能動型ハイマン腎炎でも同様であった。二重染色によって、正常では共局在しているネフリンとポドシンが、受け身型、および、能動型ハイマン腎炎では解離しているのが示された。これは、共焦点レーザー顕微鏡でも確認された。受け身型ハイマン腎炎の糸球体可溶化材料を用いたウェスタンブロッティングでは、ネフリンとポドシンの発現は減少していた。また、ネフリンが豊富な分画は、Triton X-100 に難溶性の分画から可溶性の分画に変化していた。受け身型ハイマン

腎炎の尿を用いたウェスタンブロッティングでは、蛋白尿出現前に尿中にネフリンが認められた。これらの変化はポドシンでは認められなかった。

これらの実験から、ハイマン腎炎の蛋白尿発症において、スリット膜関連分子の役割が、他の糸球体上皮細胞関連分子のそれよりもむしろ重要であると考えられた。スリット膜関連分子の mRNA の減少が、これらの分子の蛋白レベルの減少に関与しており、スリット膜関連分子の再構成が蛋白尿発症に重要であると考えられた。ネフリンとポドシンが結合し、ポドシンがネフリンをスリット膜につなぎとめていることは既に報告されており、正常ラットの糸球体でも、ネフリン、ポドシンは共局在していた。一方、ハイマン腎炎では、早期からネフリン、ポドシンが解離していた。また、ウェスタンブロッティングで、ネフリンの細胞内の局在が偏移し、尿中にネフリンが認められることから、ポドシンから解離したネフリンは、細胞骨格からも解離し、尿中に漏出しているものと考えられた。蛋白尿出現前の尿中ネフリンは、糸球体障害を理解する上で、診断的価値があると考えられた。

ハイマン腎炎の早期において、ネフリンはポドシンから解離し、尿中に漏出する。ネフリンとポドシンの発現の減少と解離が、膜性腎症の蛋白尿の出現に関与しているものと考えられた。

## 審査結果の要旨

本研究は、ラットの膜性腎症モデルであるハイマン腎炎における、蛋白尿発症時の糸球体上皮細胞関連分子、特にスリット膜関連分子の動態を検討したものである。

受身型、能動型ハイマン腎炎における糸球体上皮細胞関連分子（ネフリン、ポドシン、CD2AP、ポドカリキシン、 $\alpha 3$ インテグリン）の発現を、蛍光抗体法、ウェスタンブロッティング、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。

ネフリンとポドシンの mRNA、蛋白の発現は早期から減少していた。蛍光抗体法では早期からネフリン、ポドシン、CD2AP の染色性は線状から顆粒状に変化しており、正常では共在しているネフリンとポドシンが解離していた。ウェスタンブロッティングで、ネフリンが豊富な分画は、Triton X-100 に難溶性の分画から可溶性の分画に変化しており、蛋白尿出現前に尿中にネフリンが認められた。

ハイマン腎炎の早期において、ネフリンはポドシンから解離し、尿中に漏出する。ネフリンとポドシンの発現の減少と解離が、膜性腎症の蛋白尿の出現に関与していると考えられた。

以上の知見は、学位論文としての価値があると認められる。