

たかだ たくま

氏名	高田 琢磨
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1196号
学位授与の日付	平成19年3月22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	Glomerular podocytes express protocadherin 17 (糸球体ポドサイトはプロトカドヘリン 17 を発現している)

論文審査委員	主査	教授	追手	巍
	副査	教授	下條	文武
	副査	教授	山本	格

博士論文の要旨

糸球体上皮細胞であるポドサイトは、たこ足細胞とも呼ばれるように独特の形態をとり、糸球体基底膜を覆っている。このポドサイトの細胞間接着装置として、スリット膜、ギャップ結合、タイト結合などが報告され、ポドサイト発生分化、傷害修復、糸球体濾過に深く関わっている。

形態学的観察から、ポドサイトの細胞間接着装置にカドヘリンスーパーファミリーに属する分子が含まれると考え、古典的カドヘリンに比較的保存されている領域の配列を元に degenerate primer を制作した。これを用いて、ラット糸球体から抽出した RNA で RT-PCR を行った。その結果、既に報告している Fat1 のほかに、新たにプロトカドヘリン (Pcdh) 17 をコードする cDNA を分離同定した。Pcdh17 はカドヘリン関連蛋白の一つであり、細胞間接着や細胞配列に寄与している分子と考えられているが、これまでのところ体内での分布や機能については知られていない。

ヒト Pcdh17 やラットゲノムを参考にしながら primer を制作し、RT-PCR および 5'/3' RACE を繰り返し行ってラット Pcdh17 cDNA の塩基配列を決定した。また Ribonuclease Protection Assay (RPA) を行い、ラットの全身臓器における Pcdh17 の局在と発現を確認した。また病的な状態や発生初期の段階での発現を調べるために、PAN 腎症ラットおよび新生児ラットを対象に RPA を行った。腎組織での発現の分布を確認するために in situ hybridization を行った。また得られた cDNA 塩基配列を元にオリゴペプチドおよび GST 融合タンパク質を合成し、家兎に免疫して Pcdh17 蛋白に対する抗体作成を試みた。

RPA の結果、Pcdh17 は大脳、小脳、肺、脾臓、腎臓に発現していた。腎臓の中では糸球体で強く発現が認められたが、皮質や髄質には僅かな発現しか認められなかった。In situ hybridization によって、糸球体内の Pcdh17 は主にポドサイトに発現していることが示された。

RT-PCRの結果、poly A tailを含む3875bpのPcdh17 cDNA塩基配列を確認した。この配列から予想されるアミノ酸配列は1159個のアミノ酸からなり、6箇所の細胞外カドヘリン配列領域、1箇所の細胞膜貫通部位領域、および細胞内領域から形成されていた。細胞内領域にはCM-1、CM-2というモチーフが存在した。また第二エクソンが欠損することにより停止コドンが出現し、細胞内領域が欠損した alternative splice variant が僅かながら存在していることも同時に確認した。

PAN腎症におけるラット糸球体でのPcdh17発現量は正常のものとは変わらなかった。腎臓全体でのPcdh17発現量を検討したところ、新生児のそれは成体ラットに比べて二倍程度高かった。細胞内領域欠損 splice variant 発現の割合は、いずれにおいても明らかな変化を認めなかった。

抗体については、オリゴペプチド、融合タンパク質を用いて5回制作を試みたが、免疫学検討に耐えうる高力価の抗血清を得ることはできなかった。

Pcdh17は δ 2-Pcdh群に属する。これは細胞内領域にCM-1、CM-2という共通のモチーフを有する δ -Pcdh群のうち、protein phosphate 1 α と結合するCM-3モチーフを持たないものである。 δ -Pcdh群は中枢神経系のみならず、原始線条、沿軸中胚葉、腎臓、心臓、肺に発現していることが報告されている。これまでもいくつかのPcdhが腎臓で発現していることが報告されているが、糸球体特異的に発現していることが確認されたのはPcdh17が最初である。

一般的な他の δ -Pcdh群蛋白と同じように、Pcdh17には全長が保たれた標準的な構造のものに加えて、細胞内領域が欠落した splice variant も存在した。その機能や発現の制御についてはまだわかっていないが、全長の保たれたものでは細胞配列能力が低下するなど negative regulation として働いていることが報告されている。

In situ hybridizationの結果から、Pcdh17は糸球体ではポドサイト特異的に発現していることが明らかとなった。同様にポドサイト特異的に発現しているカドヘリン群の蛋白分子としてFat1を報告している。Fat1は、スリット膜を含めたポドサイト間接着装置に広く存在する蛋白であり、細胞間接着の初期に関与していると考えられている。Pcdh17は、Fat1と同様PAN腎症でもその発現量を変化させなかった。またPcdh17は新生児ラット腎では成熟したものに比べて強く発現しており、この傾向もFat1と類似している。これらのことから、カドヘリン群蛋白の特徴を備えるPcdh17は、Fat1と同じように複数のポドサイト間接着装置に関与する分子ではないかと考えた。特異的な抗体が出来れば更に糸球体での詳細な分布が明らかになるものとする。

(論文審査の要旨)

糸球体上皮細胞(ポドサイト)の細胞間接着部位に発現している分子についてはなお不明の点が多い。申請者らはポドサイトの細胞間接着装置にカドヘリンスーパーファミリーに属する分子が存在すると想定して、カドヘリン関連分子に保存されている領域の配列を元に degenerate primer を制作し、ラット糸球体 RNA で RT-PCR を行った。その結果、既に報告している Fat1 のほかに新たにプロトカドヘリン(Pcdh) 17 をコードする cDNA を分離同定した。

Pcdh17 はカドヘリン関連蛋白の一つであり、細胞間接着や細胞配列に寄与している分子と考えられているが、これまでのところ体内での分布や機能については知られていない。我々は Pcdh17 の RT-PCR を行い、3875bp の Pcdh17 cDNA 塩基配列を確認した。この配列から予想されるアミノ酸配列は 1159 個のアミノ酸からなり、 δ -Pcdh としての特徴を備えていた。

次いで Ribonuclease Protection Assay(RPA) および in situ hybridization (ISH) を行い、ラットの全身臓器および腎における Pcdh17 の局在と発現を確認した。その結果、Pcdh17 は大脳、小脳、肺、脾臓、腎臓に発現していた。腎臓の中では糸球体で強く発現が認められた。ISH によって、糸球体内の Pcdh17 は主にポドサイトに発現していることが示された。これは Fat1 の発現様式と類似していた。

これまでもいくつかの Pcdh が腎臓で発現していることが報告されているが、糸球体、とりわけポドサイト特異的に発現していることが確認されたのは Pcdh17 が最初である。Pcdh17 は Fat1 と同じようにポドサイト間接着装置に関与する分子の一つではないかと考えている。

以上、初めて Pcdh17 のポドサイト局在を明らかにした点に、本研究の学位論文としての価値を認める。