

氏名	みやうち なおこ 宮内直子
学位	博士(医学)
学位記番号	新大院博(医)第159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	Synaptic Vesicle Protein 2B Is Expressed in Podocyte, and Its Expression Is Altered in Proteinuric Glomeruli (Synaptic Vesicle Protein 2B の糸球体上皮細胞での発現と蛋白尿期における発現変化について)
論文審査委員	主査 教授 山本 格 副査 教授 追手 巍 副査 教授 下條 文武

博士論文の要旨

蛋白尿は、限定的条件下での移植を除いて未だ治療法の確立していない慢性腎不全につながる重要な症候であり腎臓病学全般にわたる大きな研究テーマであるが、その発症機序については不明な点が多い。糸球体性蛋白尿をきたす難治性ネフローゼ症候群は、数少ない薬剤での治療を余儀なくされ、反復するステロイド投与などの長い治療を経ても透析療法に至る患者が少なくない。

近年、糸球体上皮細胞のバリアー機能の重要性が提唱され、その機能不全が糸球体性蛋白尿の要因と考えられている。今回の研究の目的は、糸球体上皮細胞機能維持に関与する未知の分子群の探索である。cDNA サブトラクション法を用い、蛋白尿惹起モデルの糸球体上皮細胞において正常よりも蛋白尿出現前から発現の低下する分子群を抽出し、その役割を探った。蛋白尿惹起モデルとして puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症ラットを用いた。PAN 腎症は PAN の静脈投与により糸球体上皮細胞が特異的に傷害されて蛋白尿が出現し、ヒトの微小変化型ネフローゼ症候群モデルとして確立されている。

同定された分子群のうち、シナプス小胞表面分子である Synaptic Vesicle Protein 2B (SV2B) に注目し研究を進めた。SV2B は 12 回膜貫通型蛋白であり、当初中枢神経系の前シナプスにおいて神経伝達物質を含有する神経小胞の表面分子として報告された。細胞膜蛋白との結合などを通じ小胞輸送に関連した役割を果たすとされている。現在では中枢神経系以外の組織・臓器にも発現が確認されている。

ラットにおける蛋白レベルでの発現を Western blot 法と免疫蛍光染色法で観察したところ、SV2B は腎においては、主として糸球体上皮細胞に発現していることを確認した。糸球体上皮細胞内ではスリット膜近傍と細胞質での局在が観察され、Western blot 法においても Triton X-100 による可溶化分画で SV2B の発現を明確に認めたことから、SV2B は細胞膜近傍、特にスリット膜近傍に多く発現していると考えられた。ヒトの免疫蛍光染色法

でも同様の染色性・局在を観察した。そこで、スリット膜のバリアー機能維持に中心的な役割を果たす Nephrin に対するモノクローナル抗体 (anti-Nephrin antibody; ANA) をラットに投与することにより誘導された蛋白尿モデル (ANA 腎症モデル) における SV2B の動態を観察したところ、この ANA 腎症においても蛋白尿出現に先行して SV2B の発現が減少することが判明した。今回用いた PAN 腎症・ANA 腎症ともに糸球体上皮細胞が障害されネフローゼ症候群を呈するが、ANA 腎症はより特異的に糸球体上皮細胞のスリット膜の機能障害をきたす。これらのモデルにおける発現動態と局在に関する観察から、SV2B がスリット膜関連蛋白として機能している可能性があると考えられた。

スリット膜機能分子のひとつである CD2 associated protein (CD2AP) は、スリット膜近傍に存在して Nephrin と結合しアダプター蛋白としての役割を果たすほか、近年早期エンドソームへの分布も報告されている。小胞輸送への関与という SV2B 本来の機能を鑑みれば、CD2AP との関連を調べることで SV2B の機能解析の端緒になると考えた。そこで、SV2B の発現抑制実験をおこなって CD2AP の発現状態に与える影響を観察した。マウス由来の培養糸球体上皮細胞を用い、SV2B の siRNA を導入して reverse transcription polymerase chain reaction と免疫蛍光染色法・Western blot 法をおこなった。正常培養糸球体上皮細胞において CD2AP は細胞の突起を含む細胞質全体に分布しているが、SV2B を knock down した状態では、発現量が減少しないにも関わらず核周囲の細胞質に局限した分布に変化した。

以上から、SV2B が CD2AP の正常局在への関与を介して糸球体上皮細胞スリット膜のバリアー機能を維持する役割を果たしていると結論した。

蛋白尿をはじめとした腎機能障害に対し選択できる治療は現在数少ないが、本研究は、今後 SV2B がネフローゼ症候群の新たな治療のターゲットのひとつとなり得ることを示した。

(論文審査の要旨)

本研究は糸球体上皮細胞の機能維持に関与する未知の分子群を探索するために、cDNA サブトラクション法を用いラット正常糸球体と蛋白尿惹起モデル puromycin aminonucleoside 腎症の糸球体とで発現の異なる遺伝子を同定し、同定された分子群のうち、神経細胞で発現していることが示されている synaptic vesicle protein (SV) 2B に注目して解析したものである。その結果、SV2B は腎臓において主として糸球体上皮細胞のスリット膜近傍に局在し、蛋白尿惹起モデルでその発現が減少することが示された。また、培養糸球体上皮細胞で siRNA を用いて SV2B を knock down すると、細胞質に広く分布していた CD2AP 分子が、核周囲に局限し、SV2B は CD2AP の局在を制御している可能性が示された。これらの結果から SV2B はスリット膜機能に深く関与している CD2AP の局在を制御し、スリット膜機能、さらには糸球体濾過機能の維持に働いている可能性が示され、その点に、学位論文としての価値を認める。