

	おがわ あさ
氏 名	小 川 麻
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第186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	SM22 α :The novel phenotype marker of injured glomerular epithelial cells in anti-glomerular basement membrane nephritis (SM22 α :抗糸球体基底膜腎炎における糸球体上皮形質変化の新しい指標)
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 追 手 巍

博士論文の要旨

糸球体上皮細胞は糸球体基底膜の外側に存在する高度に分化した細胞である。尿蛋白の最終的なサイズバリアーの役割を果たしているため、ネフリンやポドシンなどの特異的蛋白の遺伝子変異が起こって蛋白が発現されなくなると、尿蛋白が出現する。また、糸球体上皮細胞はアクチン、ミオシンなどの細胞骨格蛋白やアンジオテンシンIIなどの血管作動性物質に対する受容体を持っているため、収縮する能力を持ち、糸球体内圧の変化に反応して糸球体濾過率を変化させると考えられている。糸球体上皮細胞は炎症反応が起こると、その表現型が変化すると考えられている。半月体形成腎炎では上皮細胞由来の細胞が半月体形成に関与するとされているが、その特異的蛋白は消失していると報告されている。微小変化群では大量の蛋白尿にもかかわらず特異的蛋白は消失しないが、巣状糸球体硬化症などの進行性腎炎では、特異的蛋白が消失すると報告されている。これらのことより、糸球体上皮細胞における特異的蛋白の消失は、進行性の糸球体硬化に関与していると考えられている。

Wister-Kyoto ラットにおける抗糸球体基底膜腎炎はヒトにおける半月体形成性腎炎の実験モデルである。以前私達はこの腎炎モデルで DNA arrays による発現遺伝子解析を行い、7 日目に SM22 α の発現が増加することを見出した。SM22 α は分化した平滑筋細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白であるが、その役割ははっきりしていない。本研究では SM22 α の抗糸球体基底膜腎炎における mRNA と蛋白の発現と局在を調べた。

Wister-Kyoto ラットにウサギ抗糸球体基底膜血清を静注し、抗糸球体基底膜腎炎を惹起した。7 日目に病変腎を取り出し、ノーザンブロット解析と蛍光抗体法のため凍結切片を作製し、In situ hybridization (ISH) のため 4%パラフォルムアルデヒド液で固定し、免疫組織化学法のためカルノア液で固定した。600 塩基対の cDNA を PCR により増幅して pGEM-T ベクターに挿入し、ノーザンブロット解析と ISH のためのテンプレートを作製した。257 塩基対の cDNA を pQE-30UA ベクターに挿入して大腸菌 JM109 株を形質転換し、組み換え蛋白を合成した。組み換え蛋白を抽出して 2 週間毎にウサギに免疫し、得られた抗 SM22 α 抗体の特異性はウエスタンブロット法で確認した。免疫組織化学法のため、ポリクローナル IgG 抗体を抽出し、二重染色法のためビオチン化抗体を作製した。作製したテンプレートと抗体を使用して、正常腎と 7 日目の病変腎でノーザンブロット解析、ISH、免疫組織化学法、二重染色法を行った。

ノーザンブロット解析で、SM22 α mRNA の発現が7日目に増加していることを確認した。ISHで、SM22 α mRNA は糸球体上皮細胞、ボウマン嚢上皮細胞、血管平滑筋細胞に発現していた。一方正常腎では血管平滑筋細胞にのみ発現していた。免疫組織化学法でも、SM22 α 蛋白は同様の局在を示した。SM22 α の局在を確認するため、糸球体上皮細胞の特異的蛋白であるポドカリキシン、ネフリリンなど糸球体細胞に対する抗体を用いた二重染色法を行った。これらの蛋白は一部の糸球体上皮細胞で消失しており、SM22 α は同蛋白の発現が消失・減弱した糸球体上皮細胞に発現していた。

SM22 α は糸球体上皮細胞の特異的蛋白であるポドカリキシンが消失した糸球体上皮細胞(ポドサイトとボウマン嚢上皮細胞)に発現すると考えられた。糸球体上皮細胞は炎症反応が起こると特異的蛋白を発現しなくなり、進行性の糸球体硬化を起こすと考えられている。一方糸球体上皮細胞は間葉系細胞由来と考えられており、アクチンやミオシンなどの細胞骨格蛋白を持つことから、抗糸球体基底膜腎炎で高度に障害された糸球体上皮細胞が平滑筋細胞のマーカーである SM22 α を発現することは脱分化と考えられる。以上により、糸球体上皮細胞における SM22 α の発現は高度な進行性糸球体病変の新しい指標となりうると考えられた。抗糸球体基底膜腎炎においてポドカリキシンが消失した高度に障害された糸球体上皮細胞は、構造的・機能的変化を起こし、平滑筋細胞のマーカーである SM22 α を発現する可能性が考えられた。

(論文審査の要旨)

Wister-Kyoto ラットにおける抗糸球体基底膜腎炎はヒトにおける半月体形成性腎炎の実験モデルである。申請者らは最近この腎炎モデルで DNA arrays による発現遺伝子解析を行い、7日目に SM22 α の発現が増加することを見出した。本研究では、抗糸球体基底膜腎炎における SM22 α mRNA と蛋白の発現の局在について検討した。

正常腎と7日目の病変腎を用いて、Northern blot 解析、in situ hybridization(ISH)、免疫組織化学法、二重染色法を行った。抗 SM22 α 抗体は組み換え蛋白をウサギに免疫して作製した。

ISHで、SM22 α mRNA は糸球体上皮細胞、ボウマン嚢上皮細胞、血管平滑筋細胞に発現を認め、免疫組織化学法でも、SM22 α 蛋白は同様の局在を示した。ポドカリキシンなど糸球体上皮細胞に対する抗体を用いた二重染色法で、SM22 α は同蛋白の発現が消失した糸球体上皮細胞に発現していた。

抗糸球体基底膜腎炎において高度に障害された糸球体上皮細胞は、構造的・機能的変化を起こして SM22 α を発現する可能性が考えられ、SM22 α は高度な進行性糸球体病変の新しい指標となりうると考えられた。

以上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。