



Title	The role of intron 1 in smooth muscle α - actin transcriptional regulation in activated mesangial cells in vivo
Author(s)	川田, 典孝
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41647
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	川 田 典 孝
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 6 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	The role of intron 1 in smooth muscle α -actin transcriptional regulation in activated mesangial cells <i>in vivo</i> (活性化メサンギウム細胞での平滑筋 α アクチン遺伝子発現におけるイントロン 1 の重要性—トランスジェニックマウスを用いた検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 安 東 明 夫 (副査) 教 授 堀 正 二 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

糸球体メサンギウム細胞の活性化は糸球体病変進展過程で最も早期から認められ、重要な特徴の一つである。平滑筋 α アクチン(SM α A)は活性化メサンギウム細胞の最も優れたマーカーとして利用されている。しかしながら、SM α Aの転写制御機構についての知見は培養細胞を用いた検討に限られている。本研究は、*in vivo*の活性化メサンギウム細胞でのSM α A遺伝子発現に重要な転写調節領域を同定することを目的とした。

【方法ならびに成績】

1. トランスジェニックマウスの作成

4種類のトランスジェニックベクター；P891int-CAT, P123int-CAT, P891int Δ BH-CAT, P891int Δ O-CATをもつトランスジェニックマウス(C57BL/6 $\times$ DBA/2)を作成した。P891int-CATは、ヒトSM α A遺伝子の5'上流-891からエクソン1, イントロン1, エクソン2の最初の14bp(+3828)までの領域を含む4.7kbのフラグメントにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を結合した構造をもつ。P123int-CAT, P891int Δ BH-CAT, P891int Δ O-CATは、それぞれヒトSM α A遺伝子の-123から+3828, -891から+3828の領域でイントロン1に3.8kbの欠失を加えたもの、-891から+3828の領域でイントロン1に137bpの欠失を加えたものにCAT遺伝子を結合した構造をもつ。P891int-CAT, P123int-CAT, P891int Δ O-CATを各2系列ずつ, P891int Δ BH-CATは3系列作成した。

2. 検討項目および結果

1. トランスジェニックマウスの正常組織でのCAT発現分布

各トランスジェニックマウスから採取した正常組織標本を用い、CATの発現をCAT免疫組織化学法で検討した。891int-CATおよび123int-CATトランスジェニックマウスでは内因性のSM α Aと同様に、腎細動脈と大動脈中膜でCAT蛋白の発現を認めた。一方、SM α A遺伝子イントロン1に3316bpまたは137bpの欠失を加えたトランスジェニックマウスではCAT発現を認めなかった。いずれのトランスジェニックマウスでも正常糸球体にはCAT蛋白の発現を認めなかった。

2. トランスジェニックマウスから作成した培養メサンギウム細胞でのCATの発現

培養メサンギウム細胞は多くの点で *in vivo* の活性化メサンギウム細胞と類似している。各トランスジェニックマウスの腎臓から糸球体を単離し、RPMI 1640+17%FCS 培地で培養した。培養開始14日後のメサンギウム細胞でのCATの発現をCAT assay, CAT免疫組織化学法で検討した。CAT免疫組織化学染色法では、891int-CATおよび123int-CATトランスジェニックマウス由来のメサンギウム細胞でCATの発現を認めた。一方、891int Δ BH-CATおよび891int Δ O-CATトランスジェニックマウス由来のメサンギウム細胞ではCATの発現を認めなかった。CAT assayを用いた検討では、891int-CATの系列が最もCAT活性が強く、123int-CATの系列が2番目であった。891int-CATと123int-CATの系列間ではCATの活性は4から10倍程度の差を認めた。891int Δ BH-CATおよび891int Δ O-CATの系列でCATの活性を認めなかった。

3. メサンギウム増殖性腎炎モデルで出現する活性化メサンギウム細胞でのCATの発現

ハブ毒により実験的メサンギウム増殖性腎炎が惹起される。6週齢の891int-CATおよび891int Δ O-CATトランスジェニックマウスに、ハブ毒 (*Trimeresurus flavoviridis*) を1.5mg/kg体重静注してハブ毒腎炎を作成した。ハブ毒投与8日後の病変糸球体でのCATの発現を免疫組織化学法で検討した。891int-CATではSM α Aと同様のパターンのCATの発現を糸球体内に認めた。SM α A遺伝子イントロン1の137bpを891int-CATから欠失させるとCATの発現は検出感度以下となった。

4. 培養メサンギウム細胞へのtransient transfectionによるSM α Aプロモーター解析

Wild-typeのBDF1マウス由来の培養メサンギウム細胞 (passage 5-7) を用いたtransient transfection (Lipofectamine法) では、最も高い転写活性はcore promoterと呼ばれる-123から+1の領域で認められた。-891から-124の領域はCAT活性を低下させ、SM α Aの発現を抑制する結果であった。培養メサンギウム細胞へのtransient transfection解析では、891intや123intの転写活性は、891int Δ BHまたは891int Δ Oより低値で、トランスジェニックマウスを用いて得られた結果と解離した。

以上の結果より、*in vivo* の活性化メサンギウム細胞でのSM α Aの遺伝子発現には-123から+1のcore promoterに加え、イントロン1に含まれるCArG motif周辺の領域が必須であることが示された。

【総括】

トランスジェニックマウスを用いた*in vivo* promoter解析により、活性化メサンギウム細胞でのSM α A遺伝子発現にイントロン1のCArG motif周辺の領域が必須であることが初めて明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

メサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質の増加は糸球体病変の指標であると同時に、それ自体が腎疾患の進展に重要な役割を果たす。糸球体病変部位のメサンギウム細胞は活性化し、種々のサイトカインや成長因子を分泌すると共に、細胞外基質成分の過剰産生にも関与する。したがって、メサンギウム細胞活性化機構の解明は、腎糸球体障害進展についての理解を深めるとともに、新たな治療法開発へのアプローチとしても重要である。活性化メサンギウム細胞にはいくつかの分子マーカーが報告されている。smooth muscle α -actin (SM α A)、カルデスモンやSMembに代表される収縮関連蛋白質群の発現増強は、活性化メサンギウム細胞に特徴的な形質として報告されており、収縮関連蛋白質群の発現には何らかの共通した機序が関与している可能性が示唆される。収縮関連蛋白質群のなかでも、SM α Aは活性化メサンギウム細胞のマーカーとして最も広く認知され利用されている。

本研究では、SM α Aの転写制御機構をトランスジェニックマウスを利用した*in vivo* promoter解析により検討している。その結果、SM α A遺伝子発現にイントロン1のCArG motif周辺の領域が重要であることを初めて明らかとした。このイントロン1の機能は、培養細胞を用いた通常のtransient transfection解析では検出できなかった。イントロン1のCArG motif周辺の領域が、SM α A遺伝子の転写制御に果たす役割を分子生化学的に検討することは、メサンギウム細胞の形質制御機構解明への重要なアプローチとなると考える。さらに、腎炎の進展機序解明にも資すること大と期待され、学位に値するものと考ええる。