The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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、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

【33】

氏　　名	川田典孝（かわだ のりたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　14462　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 *in vivo* （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（SMαA）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，SMαA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SMαA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，P891intΔBH-CAT，P891intΔO-CATをもつトランスジェニックマウス（C57BL／6×DBA／2）を作成した。P891int-CATは，ヒトSMαA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，P891intΔBH-CAT，P891intΔO-CATは，それぞれヒトSMαA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，P891intΔO-CATを各2系列ずつ，P891intΔBH-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SMαA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，SMαA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，891intΔBH-CAT および891intΔO-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。891intΔBH-CAT および891intΔO-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891intΔO-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 SMαA と同様のパターンの CAT の発現を糸球体内に認めた。SMαA 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 SMαA プロモーター解析

Wild-type の BDF 1 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，SMαA 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，891intΔBH または891intΔO 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 SMαA 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 SMαA 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（SMαA），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，SMαA 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，SMαA 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，SMαA 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，SMαA 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る。