



Title	Differences in binding of glucocorticoid receptor to DNA in chronic renal graft rejection
Author(s)	市丸, 直嗣
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41846">https://hdl.handle.net/11094/41846</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	いちまるなお つく 市丸直嗣
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15317 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Differences in binding of glucocorticoid receptor to DNA in chronic renal graft rejection (腎移植慢性拒絶反応におけるグルココルチコイドレセプターの DNA 結合能の差異)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦  (副査) 教授 堀 正二 教授 網野 信行

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

近年の免疫抑制法の進歩により腎移植後における急性拒絶反応の治療成績は大きく向上したが、移植後維持期の腎機能廃絶の主要な原因である慢性拒絶反応については、その複雑な病態について不明な点が多く治療成績の向上もみられていない。HLA ミスマッチ数などの背景因子に差がない症例において、同じプロトコールの免疫抑制法を用いても慢性拒絶反応の出現には個体差がみられることが知られており、慢性拒絶反応の症例に対してはステロイドなどの免疫抑制剤の増量が必要となる。本研究では、このようなステロイドの増量が必要となる機序を検討するため、慢性拒絶反応の症例から採取した末梢血単核球を用いグルココルチコイドレセプター (GR) のグルココルチコイド応答因子 (GRE) との結合能を正常コントロール症例と比較検討した。また、免疫反応を亢進させる役割をもつ転写調節因子である NF $\kappa$ B と AP-1 についても同様に検討し、慢性拒絶反応との関連を解析した。

#### 【方法】

大阪大学医学部泌尿器科通院中の生体腎移植後症例のうち慢性拒絶反応の症例5名と正常コントロール症例7名の2群を対象とした。慢性拒絶反応症例としては、現在進行中あるいは再発性の拒絶反応の病歴を有しており、かつ腎機能が徐々に悪化し、腎生検上慢性拒絶反応の所見と一致する症例を選択した。なお原疾患の再発や薬剤性の腎障害など非免疫学的な慢性移植腎症の関与が疑われた症例は除外した。正常コントロール症例としては、拒絶反応の病歴がなく、腎生検上病理学的に慢性拒絶反応が否定され、腎機能が安定している症例を選択した。

各々の症例より採取したヘパリン加血液20mlを用い、Ficoll密度勾配法により末梢血単核球を分離した。この末梢血単核球から total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により GAPDH に対する GR の相対発現量を測定した。

さらに末梢血単核球より核蛋白抽出液を精製し、GR、NF $\kappa$ B、AP-1 各々の標的 DNA 配列を標識プローブとして gel mobility shift assay を行った。また、それぞれの結合反応が特異的であることを確認するため GR、NF $\kappa$ B、AP-1 の標的 DNA 配列の一部を変異させたプローブを用いて同様の assay を行った。

#### 【成績】

2群の症例の背景因子のうち血清クレアチニン値、尿蛋白は慢性拒絶反応症例が有意に高値であった。その他の年齢、性別、ドナー年齢、HLA ミスマッチ数、移植後年数、ステロイド投与量、シクロスポリンのトラフ濃度は2群間で差がなかった。末梢血単核球中の GR の発現量も2群間で差がなかった。以上より症例として選択した2群間の

背景因子には差がないものと考えられた。

Gel mobility shift assay については GR の GRE との結合能は正常コントロール症例と比較して慢性拒絶反応症例で有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。また、AP-1 と NF $\kappa$ B における各々の DNA 結合能は正常コントロール症例と比較して慢性拒絶反応症例で有意に高値であった (共に  $p < 0.01$ )。それぞれの変異プローブを用いた検討では対応する band が得られなかったことから標的プローブはそれぞれ特異的な band を形成していることが確認された。

#### 【総括】

慢性拒絶反応はいまだメカニズムが明らかにされていない難治性で予後不良な腎移植後合併症である。本研究では、臨床検体を用いてこの慢性拒絶反応の病態解明を試みた。慢性拒絶反応症例では GR の DNA 結合能が低下していることが示され、そのため正常コントロール症例と同様な免疫抑制法によっても拒絶反応が抑制されなかった可能性が示唆された。また、これらの症例では AP-1、NF $\kappa$ B の DNA 結合能が高値であることが明らかとなった。このことからこれらの転写調節因子の DNA 結合能の変化が慢性拒絶反応の発生機序に関わっている可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

慢性拒絶反応は、難治性で予後不良な腎移植後合併症であるがその病態は複雑で不明な点が多い。

本研究は、臨床検体を用い、慢性拒絶反応症例においてはグルココルチコイドレセプター (GR) のグルココルチコイド応答因子 (GRE) との結合能が低下していることを見出した。このことはそのため慢性拒絶反応症例においてはグルココルチコイドの作用が減弱し拒絶反応が抑制されなかった可能性を示している。さらに、慢性拒絶反応症例では免疫反応に重要な役割を持つ転写調節因子の AP-1、NF $\kappa$ B の DNA 結合能が高値であることを明らかにした。以上の知見は、これら転写調節因子の DNA 結合能の変化が慢性拒絶反応の発生機序に関与している可能性を示唆している。

本研究は、腎移植後慢性拒絶反応の機構について貴重な知見を明らかにしたものであり、学位に値するものと認める。