



Title	Rapid and diverse changes of gene expression in the kidney of mice protein-overloaded proteinuria model detected by Microarray analysis
Author(s)	長澤, 康行
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42595
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	長 澤 康 行
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16064 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Rapid and diverse changes of gene expression in the kidney of mice protein-overloaded proteinuria model detected by Microarray analysis. (マイクロアレイ法を用いた蛋白負荷蛋白尿モデルマウス腎臓における遺伝子発現の急速かつ多様な変化の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 奥山 明彦 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

進行性腎障害において、蛋白尿が、血圧とは独立した予後規定因子であることが米国の MDRD 研究や欧州 GISEN 研究など大規模臨床疫学研究で報告されている。糸球体障害により近位尿細管腔に漏出する蛋白が、尿細管にサイトカイン、ケモカインの放出やストレス応答を引き起こすことで間質への炎症細胞の浸潤が生じる一連の反応がおきるとする蛋白尿による進行性腎障害発症の仮説が提唱されている。さらに蛋白負荷による実験蛋白尿ラットモデルで蛋白尿が、直接増殖因子やサイトカインの産生亢進を惹き起こすことも報告されている。蛋白尿がどのような機序で、どのような影響を腎臓に与えるか遺伝子レベルで検討することは、腎障害の進展機構を理解するために重要であると考えられる。本研究ではマイクロアレイ法を用い、蛋白負荷蛋白尿モデルマウスを作製し、腎臓において蛋白尿によって誘導される遺伝子発現群の情報を集積し進行性腎障害への関与を検討することを目的とした。

【方法と成績】

蛋白負荷蛋白尿モデルマウスの作製

マウスにおいて、Bovine Serum Albumin を腹腔内投与することで、投与後6時間をピークに血中蛋白濃度が上昇し、それとともない尿中蛋白量が増加することを確認した。 α -smooth muscle actin (α SMA) は進行性腎障害においてメサンギウム細胞や間質の線維芽細胞の活性化を示す際の重要なマーカーである。本蛋白負荷蛋白尿モデルマウスにおいて α SMA 遺伝子発現を検討したところ、1週後にすでに α SMA mRNA の亢進を認め4週まで上昇が持続していることが確認できた。本モデルは蛋白尿の腎臓に対する影響を観察する上で有効なモデルであることが示唆された。

マイクロアレイ法による蛋白負荷蛋白尿モデルマウス腎臓における遺伝子発現変化の検討

重複のない18000種の遺伝子が配列されたマイクロアレイにより遺伝子発現の変化を検討した。Bovine Serum Albumin 投与前、投与後1、3週のマウス腎臓を回収し PolyA RNA を精製し、これを鋳型に³²PによりラベルされたcDNA プローブを合成し Filter に Hybridize させ遺伝子発現を検討した。コントロール腎において約1600種の遺伝子発現が認められた。蛋白負荷蛋白尿により133種の遺伝子の発現が有意に変化した。発現量が増加する遺伝子の中には蛋白尿による炎症細胞の腎臓への浸潤に重要な役割を果たしていると考えられているオステオポンチンが含まれており、この結果は Northern blot 法によっても確認された。

AA275245 (mouse vinculin) のクローニングと発現局在の検討

マイクロアレイ法による解析で蛋白尿により腎臓で最も発現増加率の高かった遺伝子 AA275245 を 5' 側にクローニングした。ホモロジー検索により細胞骨格を形成する蛋白の一種である mouse vinculin 遺伝子配列との相同性を確認し、本遺伝子 AA275245 は mouse vinculin の 3' 側 non-coding region で未報告な配列であることが明らかとなった。AA275245 の腎臓での発現分布を in situ hybridization 法や免疫染色法により検討したところ、主に腎糸球体に発現していることが示された。Vinculin は、細胞骨格蛋白であるアクチニンや F-actin と結合する。進行性腎障害に細胞骨格蛋白を構成する遺伝子群が関連する可能性が示唆された。

【総括】

マイクロアレイ法により 18000 種の遺伝子の発現の変化を検討した結果、約 1600 の遺伝子が正常腎において発現していることが確認された。また、133 種の遺伝子において蛋白尿により発現量が変化し、またこの変化は蛋白負荷 1 週目より認められた。蛋白負荷蛋白尿により影響を受けるこれらの遺伝子群の中には炎症反応に関連のあるオステオポンチンや、細胞骨格蛋白である α -smooth muscle actin, Vinculin などが含まれていた。これらの蛋白負荷蛋白尿により影響を受ける遺伝子群の解析および情報の集積が進行性腎障害の機構解明に結びつく可能性がある。

論文審査の結果の要旨

進行性腎障害において、蛋白尿が、血圧とは独立した予後規定因子であることが報告されている。しかし、蛋白尿がどのような機序で腎障害の進展に関わっているか明らかになっていない。本研究では、まず、Bovine Serum Albumin を腹腔内投与することで蛋白負荷蛋白尿モデルマウスの作製をしている。 α -smooth muscle actin (α SMA) は進行性腎障害においてメサンギウム細胞や間質の線維芽細胞の活性化を示す際の重要なマーカーである。本蛋白負荷蛋白尿モデルマウスにおいて α SMA 遺伝子発現を検討したところ、1 週後にすでに α SMA mRNA の亢進を認め 4 週まで上昇が持続していることを確認し、蛋白尿の腎臓に対する影響を観察する上で有効なモデルであることを確認している。さらに、マイクロアレイ法により 18000 種の遺伝子の発現の変化を検討した結果、約 1600 の遺伝子が正常腎において発現していることを確認し、また、133 種の遺伝子において蛋白尿により発現量が変化し、この変化は蛋白負荷 1 週目より認められている。蛋白負荷蛋白尿により影響を受けるこれらの遺伝子群の中には炎症反応に関連のあるオステオポンチンが含まれている。また、マイクロアレイ法による解析で蛋白尿により腎臓で最も発現増加率の高かった遺伝子 AA275245 をクローニングし、細胞骨格を形成する蛋白の一種である mouse vinculin 遺伝子配列との相同性を確認し、AA275245 は mouse vinculin の 3' 側 non-coding region で未報告な配列であることを明らかにしている。AA275245 の腎臓での発現分布を in situ hybridization 法や免疫染色法により検討し、主に腎糸球体に発現していることが示されている。Vinculin は、細胞骨格蛋白であるアクチニンや F-actin と結合し、進行性腎障害に細胞骨格蛋白を構成する遺伝子群が関連する可能性を示している。これらの蛋白負荷蛋白尿により影響を受ける遺伝子群の解析および情報の集積が進行性腎障害の機構解明に結びつくと考えられ、学位に値するものと考えられる。