

Title	Analysis of gene expression in renal proximal tubules regulated by proteinuria
Author(s)	中島, 英明
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45280">https://hdl.handle.net/11094/45280</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	なか じま ひで あき 中 島 英 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 8 4 4 4 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科微生物生理学専攻
学位論文名	Analysis of gene expression in renal proximal tubules regulated by proteinuria (尿蛋白で調節される腎近位尿細管遺伝子発現の解〜酸化ストレスおよび JAK/STAT 系の関与)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 谷口 直之

#### 論 文 内 容 の 要 旨

【背景】蛋白尿は、高血圧と共に、腎不全に至る予後を規定する因子である。すなわち、蛋白尿が多いほど、腎不全に至る危険率は高い。糸球体で濾過された原尿に含まれる蛋白は近位尿細管で再吸収され、近位尿細管細胞を刺激し、腎臓間質の傷害および線維化を促進すると考えられている。

【目的-1】蛋白尿が腎近位尿細管細胞に及ぼす影響について遺伝子プロファイルを作成し、蛋白尿と関連する遺伝子群を解析する (Nakajima et al. : *Kidney Int* 61 1577-1587, 2002)。

【方法-1】我々は正常及びアルブミン過剰負荷蛋白尿モデルマウス (C57B6) の腎臓から、実体顕微鏡下 microdissection 法により近位尿細管細胞 (PT) を約 30 cm 単離し、cDNA ライブラリを作成した。約 3000 クローンずつをランダムにシークエンスし、PT に発現する遺伝子発現プロファイルを作成した。

【結果-1】正常と蛋白尿モデルのプロファイルを比較検討した結果、発現が変化した遺伝子は 2345 種類であった。これらの中には 1492 種類 (当時) の新規遺伝子が含まれる。その中にはレニンと約 45% の相同性を有するアスパラギン酸様プロテアーゼであった GS4001 や四回膜貫通型蛋白と推定されゴルジ体に局在する稀な蛋白であった GS188 が含まれていた。蛋白尿により PT に発現増加した遺伝子には、腎障害との関連が示唆される免疫関連遺伝子を多数確認した。その大部分は IFN- $\gamma$  誘導遺伝子であった。

【目的-2】蛋白尿が PT に免疫関連遺伝子を誘導するメカニズムについて、IFN- $\gamma$  シグナル伝達経路の中心的役割をする STAT 系を中心に解析する (Nakajima et al. *J Am. Soc. Nephrol.* 15 276-285, 2004)。

【方法-2】C57B6 マウス由来の腎近位尿細管細胞 (mProx24; Patent: WO9927363 (JP, US, EU)) にアルブミン負荷し、蛋白及び核蛋白を回収した。免疫沈降及びウェスタンブロット法 (WB)、ゲルシフト法 (EMSA) を用いて、Stat1/3/5 の活性化を解析した。STAT を活性化する因子として、細胞内酸化ストレスについては、CM-H<sub>2</sub>DCFDA(5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester)を用いた FACS 解析を行った。

【結果-2】蛋白負荷により、mProx24 細胞において Stat1/5 が 15 分以内の早期に活性化することが WB、EMSA にて確認された。一方、Stat3 の早期活性化は認めなかった。この Stat1/5 の活性化は、抗 IFN- $\gamma$  中和抗体や蛋白合成

阻害剤の Cycloheximide (CHX) で阻害されなかった。JAK family では、アルブミン負荷に伴い Jak2 の活性化が確認された。FACS 解析より、蛋白負荷された mProx24 細胞は酸化ストレスを受けていることが確認された。この酸化ストレスは、グルタチオンの前駆体で ROS のスカベンジャーである NAC (N-Acetyl-L-Cysteine) 、および NADPH oxidase 阻害剤の DPI (DiPhenylene Iodonium chloride) により阻害された。Stat1/5 の活性化も、NAC および DPI により阻害された。免疫関連遺伝子の中で Ly-6 family の一員である thymic shared antigen-1 (TSA-1, GS6736) について検討を加えた。T 細胞の活性化マーカーである TSA-1 は、蛋白負荷に伴い mProx24 細胞においても発現誘導が認められた。また、その発現誘導は NAC および Jak2 特異的阻害薬である AG490 にて阻害された。

【総括】蛋白尿モデルマウスの腎近位尿細管細胞遺伝子プロファイルには様々な新規遺伝子と共に、免疫関連遺伝子が多数認められた。免疫関連遺伝子の発現には、酸化ストレスおよび JAK/STAT 系の活性化が関与している可能性が示された。

### 論文審査の結果の要旨

蛋白尿は高血圧と共に腎疾患進行に関わり、腎不全に至る予後規定因子である。申請者はこの腎傷害メカニズムを明らかにするため、蛋白尿モデルマウスを作成した。尿蛋白を再吸収する近位尿細管 (PT) の遺伝子プロファイルを作成、蛋白尿と関連する遺伝子群を解析した。正常と比べ発現変化した遺伝子は 2345 種類で、その中には腎障害との関連が示唆される免疫関連遺伝子を多数確認し、その大部分は IFN- $\gamma$  誘導遺伝子であった。そこで蛋白尿が PT に免疫関連遺伝子を誘導するメカニズムについて、IFN- $\gamma$  のシグナル伝達経路である JAK/STAT 系を解析した。腎近位尿細管細胞 (mProx24) に蛋白負荷したところ、Jak2、Stat1/5 が早期に活性化することが確認された。FACS 解析より、蛋白負荷された mProx24 は酸化ストレス (ROS) を受けており、ROS のスカベンジャーの NAC (N-Acetyl-L-Cysteine) や NADPH oxidase 阻害剤の DPI (DiPhenylene Iodonium chloride) により ROS は阻害された。Stat1/5 の活性化も、NAC、DPI により阻害された。次に免疫関連遺伝子の中で T 細胞の活性化マーカーである thymic shared antigen-1 (TSA-1) に着目した。TSA-1 は蛋白負荷に伴い mProx24 においても発現誘導が認められ、その発現誘導は NAC および Jak2 阻害剤の AG490 にて阻害された。これらの結果から、尿蛋白により PT に認められた免疫関連遺伝子の発現には、ROS および JAK/STAT 系の活性化が関与していることを初めて見出した。この研究成果は、これまで不明であった蛋白尿の腎疾患進行に対するメカニズムを解明するものとして意義が大きく、博士の学位授与に値すると考える。