

Title	Timp-3 plays important roles in kidney following unilateral ureteral obstruction.
Author(s)	河本, 秀宣
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46169
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	かわもと 秀宣 河本 秀宣
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20094 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Timp-3 plays important roles in kidney following unilateral ureteral obstruction. (尿管結紮術後の腎臓における Timp-3 の機能)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 堀 正二 教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞外基質は全ての組織にとって重要な構成成分である。細胞外基質は合成と分解の平衡の上に成り立っているが、血管炎や自己免疫疾患などの炎症性疾患においては分解が亢進し恒常性は維持されなくなっている。細胞外基質の分解を行っているのは Matrix metalloproteinase (MMP) とよばれる一群の酵素でありコラーゲナーゼ、エラスターゼ、ストロームリジン、膜型 MMP の 4 群に分類され、現在までに少なくとも 23 種類が報告されている。細胞外基質の恒常性維持のため MMP の活性は転写、活性化、抑制の三つの段階で厳密に制御されており、抑制を行っているのは Tissue inhibitor of metalloproteinase (Timp) と呼ばれる内因性の阻害因子である。現在、Timp には Timp-1 から Timp-4 まで 4 種類が哺乳類で報告されており、これらのなかで Timp-3 は細胞外基質に結合し、MMP 活性を局所的に抑制するという点で他の Timp とは異なっている。一方、片側尿管結紮術 (UUO) は腎臓皮質の尿管間質を線維化させるモデルとしてしばしば用いられる手技である。Timp-3 はマウスの腎臓において最も強い発現が認められる。これより、本研究においては腎臓での Timp-3 の機能を調べるために Timp-3 欠損マウスを作製し、UUO を用いて組織の観察を行った。

〔方法〕

Timp-3 欠損 (KO) マウスは胎児胚細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により作製した。遺伝子ターゲティングではプロモーター領域を含むエクソン 1 をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。野生型 (WT) マウスと Timp-3 欠損 (KO) マウスの血圧測定は無麻酔下に非侵襲的な tail-cuff 法で行った。UUO では麻酔下に左側の尿管を結紮・閉塞し、7 日間の飼育後、腎臓を摘出・観察した。組織学的な評価のためにはヘマトキシリン・エオシン染色を用い、線維化の評価にはマッソン・トリクローム染色を用いた。筋線維芽細胞を観察するためには抗 α -SMA 抗体による染色を行った。組織の MMP 活性には in situ Zymography 法を用いた。TGF- β の発現解析には腎臓より抽出した RNA を用いて Northern Blotting 法を行った。

〔成 績〕

通常飼育の条件下において KO マウスの外観は WT マウスと同様であり肝臓、腎臓、脾臓、心臓、および大動脈の組織学的観察においても差異はみられなかった。KO マウスでは細胞外基質の分解が亢進しているものと予想されることから、血管組織の線維化も低下して抹消血管抵抗は減少し血圧は低下しているものと予想された。しかし両群間では収縮期血圧および脈拍数に差は見られなかった。そこで Timp-3 が最も強く発現している腎臓に注目して UUO を行なった。UUO 後 7 日目において KO マウスの腎臓は WT マウスよりも腫大しており重篤な水腎症様の外観を呈し腎実質は菲薄化していた。腎髄質と皮質の比を計算したところ、KO マウスでは WT マウスに比して腎髄質の菲薄化が著明であった。また腎組織全体に占める腎実質の面積は KO マウスで小さくなっていた。次に腎皮質線維化の程度を比較するためにマッソン・トリクローム染色および筋線維芽細胞の染色を行ったところ、WT と KO マウス間で差は認められず、UUO による尿細管間質の線維化に大きな差異はないものと考えられた。腎臓組織中の MMP 活性を観察するために行った *in situ* zymography の結果、通常飼育条件下の腎臓では WT と KO マウス間で差はないものの、UUO 後 7 日目においては WT で MMP 活性の軽度の上昇が認められたのに対し、KO マウスでは著明な上昇が見られた。腎臓の線維化の亢進に中心的な役割を果たしている TGF- β の発現は UUO 後の KO マウスの腎臓において WT よりも上昇が認められた。したがって腎臓での MMP 活性上昇による細胞外基質の分解亢進の代償機構として線維化を促進する TGF- β 発現が亢進しているため、線維化の明らかな差異は観察されないものと考えられた。

〔総 括〕

KO マウスと WT マウス間で血圧に差は見られなかった。したがって通常飼育下では両マウスの血管周囲の線維化と末梢結果抵抗は同等であると考えられた。一方、UUO 後の腎臓組織では皮質尿細管間質の線維化に差は見られなかったものの、KO マウスの腎臓は明らかに菲薄化し、重篤な水腎症様の外観を呈していた。この結果は Timp-3 が UUO 後の腎臓組織の維持に重要であることを示している。

論文審査の結果の要旨

Tissue Inhibitor of metalloproteinase (Timp) は Matrix Metalloproteinase を抑制し、細胞外基質の分解を制御していることは知られている。Timp には Timp-1 から Timp-4 まで 4 種類が哺乳類で報告されており、これらのなかで Timp-3 は細胞外基質に結合し、MMP 活性を局所的に抑制するという点で他の Timp とは異なっている。本論文においては Timp-3 がマウスの腎臓において最も強い発現が認められることに着目し、片側尿管結紮術 (UUO) を用いて腎臓での Timp-3 機能の検討を行った。その結果、UUO 7 日後の腎皮質の線維化については野生型 (WT) と Timp-3 欠損型 (KO) マウスの間に有意な差はみられなかったものの、KO マウスで TGF- β 1 の発現やゼラチナーゼ活性の亢進がみられた。一方、KO マウスの腎臓は明らかに菲薄化し、重篤な水腎症様の外観を呈していた。これらの結果は、Timp-3 が UUO 後の腎臓組織構造の維持に重要であることを示している。本論文は、Timp-3 発現の腎臓における重要性を示し、線維化のメカニズムや組織の維持機構を解明する上で重要な報告であり、学位の授与に値する。