

Title	Snail, a transcriptional regulator, represses nephrin expression in glomerular epithelial cells of nephrotic rats
Author(s)	松井, 功
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47456
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	まつい いさお 松 井 功
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20901 号
学位授与年月日	平成 19 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	Snail, a transcriptional regulator, represses nephrin expression in glomerular epithelial cells of nephrotic rats (転写制御因子 Snail はネフローゼラットの腎糸球体上皮細胞における nephrin 発現を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 高井 義美 教授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の細胞間接着はスリット膜を形成し、原尿濾過に重要な役割を担っている。近年ポドサイト傷害は蛋白尿のみならず、腎病変共通の終末像である糸球体硬化の原因となることが明らかにされた。このためポドサイト傷害メカニズムを明らかにすることは、新たな治療戦略を構築する上で重要である。Nephrin はフィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子として同定されたスリット膜の構成成分であり、多くのヒト腎疾患・動物腎疾患モデルで、その発現が減少することが知られている。Nephrin の欠失あるいは発現減少は尿蛋白と密接に関連しているが、その発現制御機構は十分に理解されていないため検討した。

[方法ならびに成績]

ポドサイト傷害モデルとして puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症を作成した。このモデルではポドサイト傷害に伴いスリット膜の構成成分である nephrin の発現が減少し、vimentin 発現が上昇した。この変化は epithelial to mesenchymal transition (EMT) を想起させたため、以下 EMT において重要な役割をになう転写制御因子 Snail がポドサイト傷害に関与しているのではないかと考え検討した。

まず、immunoblot 及び electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて、ポドサイト傷害時に糸球体において Snail 発現が誘導されることを確認した。また *in situ* hybridization にて Snail がポドサイトに発現することも確認した。次に Snail と nephrin の関係を明らかにするため、nephrin の転写調節領域を用いてデュアルルシフェラーゼアッセイを行い、Snail が nephrin の open reading frame 上に結合し同遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。温度感受性ポドサイト細胞株である 2DNA1D7 において Snail を強制発現させると、内因性 nephrin の発現が抑制されることも確認した。2DNA1D7 は 33°C 条件下では未分化のまま増殖し、37°C 条件下で分化するポドサイト細胞株であるが、同細胞の 33°C および 37°C 条件下での nephrin と Snail の発現を検討すると、分化誘導条件で Snail は抑制され、nephrin が発現上昇することも確認できた。また同細胞を用いた chromatin immunoprecipitation assay で、Snail が nephrin 転写調節領域に結合することも明らかにした。

Snail は Wnt シグナル伝達系の下流にある GSK3 β によりリン酸化されると、核から細胞質に運ばれ、ユビキチン

依存性に分解されることが近年明らかにされた。このため、ポドサイト傷害時の Snail 誘導にも Wnt 経路が関与しているのではないかと考え検討を行った。Wnt1、2、2b、3、4、5a の糸球体における発現変化を調べたところ、傷害糸球体では Wnt2 の発現が上昇しており、同遺伝子はポドサイトに発現した。また EMSA にて Wnt canonical pathway の下流である TCF/LEF が傷害糸球体において活性化されること、および TOP-FLASH luciferase assay で Wnt2 が同経路を活性化することを確認した。Wnt canonical pathway 活性化による nephrin 発現の変化を検討するため GSK3 阻害剤である LiCl と 2Z, 3E-6-bromoindirubin-3-oxime (BIO) を用いて検討したところ、2DNA1D7 における内因性 nephrin の発現は減少し、dual luciferase assay でも nephrin 転写が抑制されることが明らかとなった。また PAN 腎症ラットに BIO を投与したところ、nephrin の発現は PAN 腎症+vehicle 群に比べ PAN 腎症+BIO 投与群で有意に低下し、これに伴い尿蛋白が増加することが確認された。

[総 括]

傷害ポドサイトでは Snail が nephrin 転写を抑制し、病態促進性に作用した。また傷害ポドサイトでは Wnt2 による GSK3 β 抑制により Snail が安定化された。

論文審査の結果の要旨

ポドサイト傷害時に nephrin の発現が減少するが、この変化に転写制御因子 Snail が重要な役割を担っていることを明らかにした。Snail は傷害ポドサイトで発現が誘導され、活性化した Snail は nephrin の open reading frame 上に結合し同遺伝子の転写を抑制した。また、Wnt canonical pathway 活性化による Snail 制御機構についても検討し、傷害糸球体ポドサイトでは Wnt2 の発現上昇に伴い、Wnt canonical pathway が活性化され、これにより Snail 蛋白分解が抑制され、nephrin 転写抑制に寄与することを明らかにした。本研究は Snail および Wnt 経路によるポドサイトの機能変化について新たな知見を与えるものであり、学位論文に値する。