

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	西原 久美子
論文題目	単離尿細管を用いた腎病変進展の分子機構解明に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>腎臓は、異物排除を司ることにより体液の恒常性を維持する。腎病変時には薬物等の排泄遅延に起因する有害反応の発現頻度が上昇するため、個々の腎機能に応じた薬物投与設計が望まれる。腎臓の最小機能単位であるネフロンは、糸球体とそれに続く様々な尿細管分節から構成される。多くの薬剤性腎障害では近位尿細管が主な毒性発現部位となるにも拘らず、尿細管機能を加味した腎機能評価法は未確立である。従って、尿細管病変進展の分子機構解明は、高精度な腎機能評価法の構築のみならず腎障害の増悪抑制を考慮した治療法の開発にも有用と考えられる。</p> <p>そこで著者は、慢性腎不全のモデル動物である5/6腎摘出(Nx)ラットおよび尿細管障害の典型的モデルであるシスプラチン腎症ラットを用いて、腎障害時における尿細管の機能変化および遺伝子発現変化に着目した系統的な検討を行い、以下の新知見を得た。</p>			
I. 腎不全時におけるH⁺/有機カチオン逆輸送体Multidrug and toxin extrusion (MATE) 1 の発現・機能変動			
<p>雄性ホルモンによる発現調節を受ける側底膜型有機カチオントランスポータOCT2の影響を避けるため、雌性ラットを選択しNx処置を行った。その結果、シメチジンの分泌クリアランスは模擬処置群の約20%にまで減少したが、OCT2発現量は一定であった。一方、刷子縁膜側のMATE1発現量は顕著に低下し、シメチジンの分泌クリアランスはMATE1タンパク質発現量と良好な正の相関関係を示した。また、MATE1の駆動力となる内向きH⁺勾配の生成に重要なNa⁺/H⁺ exchanger (NHE) 3 発現量もNxによって顕著に減少した。すなわち、腎不全時のMATE1とNHE3の発現低下はカチオン性薬物排泄遅延の主要因となることが示された。</p>			
II. 代償性腎不全期の近位尿細管上皮細胞におけるCyclin B2およびCell division cycle (Cdc) 2 の役割			
<p>腎臓における遺伝子発現変化を調べるに際し、全腎組織を試料とした場合には尿細管局所の分子挙動を的確に評価し得ないため、単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析を行った。本法により近位尿細管における遺伝子発現を選択的に評価できることを確認した後、Nx処置後1, 2, 4, 8週間目の近位尿細管を実験に供した。その結果、Nx処置後1, 2週間目の代償性腎不全期には細胞周期関連因子の発現変化が顕著であり、中でも分裂期を制御するCyclin B2およびCdc2が近位尿細管特異的に上昇することを見出した。細胞周期調節の上流に位置するmTOR経路の阻害薬をNxラットに投与したところ、Cyclin B2およびCdc2の発現が減少し、腎肥大の消失と腎機能の著しい低下が観察された。また、Cdc2特異的阻害剤の投与により、リン酸化ヒストンH3を指標とした尿細管上皮細胞の増殖抑制と、それに伴う腎機能の低下傾向が認められた。以上より、Cyclin B2およびCdc2はネフロン数減少を補完する機能的代償反応の鍵分子であり、増殖能を維持した尿細管上皮細胞を判別するための分子生物学的指標として有用であることが示唆された。</p>			
III. シスプラチン腎症ラットにおける近位尿細管毒性発現マーカーの探索			

シスプラチンは近位尿細管障害を起点として腎組織障害を引き起こすことから、単離尿細管解析系を用いて障害の進展・増悪を反映する分子の探索を行った。その結果、数種のサイトカインやケモカインの顕著な発現亢進が認められた。この内、**Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)** について近位尿細管と全腎組織における mRNA 発現変化を比較したところ、近位尿細管においては投与翌日から顕著な発現上昇を認めたが、全腎組織中では投与1, 2日後に発現低下傾向を示し、両試料間の発現プロファイルに乖離が見られた。一方、尿中MCP-1はシスプラチン投与の翌日から約3倍程度に上昇しており、血清クレアチニン値や血中尿素窒素値に比して鋭敏に近位尿細管障害を反映することが明らかとなった。このように、単離尿細管を用いた発現解析によって、より感度の高い薬剤性腎障害発現マーカーの特定が可能となった。

以上、著者は腎病変時における近位尿細管の機能および遺伝子発現変化について精査し、代償性腎不全期における尿細管上皮細胞の機能維持および修復に関連する分子機構の一部を明らかにした。また、シスプラチンによる尿細管障害の早期診断マーカーとして、尿中MCP-1測定の有用性を見出した。本研究成果は、構造的に多様な腎臓において尿細管特異的な遺伝子発現情報の重要性を明らかにするとともに、尿細管機能に焦点を絞った新たなバイオマーカーの特定に向けて有用な分子基盤になると考える。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

体液の恒常性維持という重要な生理的役割を担う腎臓には、糸球体濾過された栄養物質やイオンの再吸収機能に加えて、薬物や異物の尿中への排除機構が備わっており、肝臓に次いで重要な解毒装置として認識されている。従って、腎病変時には薬物等の蓄積に起因する毒性発現頻度が上昇するため、個々の腎機能に応じた薬物投与設計が望まれる。腎臓の最小機能単位であるネフロンは、糸球体とそれに続く様々な尿細管分節から構成されるが、多くの薬剤性腎障害では近位尿細管が主な毒性発現部位となるにも拘らず、尿細管機能を加味した腎機能評価法は未確立である。すなわち、尿細管病変進展の分子機構解明は、高精度な腎機能評価法のみならず腎障害の増悪抑制を考慮した治療法の開発にも有用と考えられる。

申請者は、単離尿細管を用いた網羅的な遺伝子発現解析を通じて、腎障害時における近位尿細管の機能変化および遺伝子発現変化に着目した系統的な検討を行い、以下の新知見を得た。

腎側底膜型有機カチオントランスポータOCT2の発現は雄性ホルモンによる誘導を受けることから、その影響を避けるために雌性ラットを用いた結果、OCT2発現量は5/6腎摘出(Nx)による影響を受けなかったものの、刷子縁膜側のMATE1発現量は顕著に低下し、シメチジンの分泌クリアランスはMATE1タンパク質発現量と良好な正の相関関係を示した。また、MATE1の駆動力となる内向きH⁺勾配の生成に重要なNHE3発現量もNxによって顕著に減少した。すなわち、腎不全時のMATE1とNHE3の発現低下はカチオン性薬物排泄遅延の主要因となることが示された。

次に腎近位尿細管局所における遺伝子発現変化を調べるため、単離近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、本手法によって近位尿細管特異的な遺伝子発現変化を検出することができ、Nx処置後1, 2週間目の代償性腎不全期には細胞周期関連因子の発現変化が顕著であり、中でも分裂期を制御するCyclin B2およびCdc2が近位尿細管特異的に上昇することを見出した。そこで、細胞周期調節の上流に位置するmTOR経路阻害薬や、Cdc2特異的阻害剤の投与により、Cyclin B2およびCdc2がネフロン数減少を補完する機能的代償反応の鍵分子であり、再生下の上皮細胞を判別するための分子生物学的指標として有用であることが示唆された。

さらに、臨床上問題視されているシスプラチン腎症の早期検出マーカーについて検討を進めたところ、数種のサイトカインやケモカインの顕著な発現亢進が認められた。この内、MCP-1の発現は、近位尿細管においては投与翌日から顕著な発現上昇を認めた。また、尿中MCP-1はシスプラチン投与の翌日から約3倍程度に上昇しており、血清クレアチニン値や血中尿素窒素値に比して鋭敏に近位尿細管障害を反映する、より感度の高い薬剤性腎障害発現マーカーの特定が可能となった。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：平成 年 月 日以降