

京都大学	博士 (医学)	氏 名	鳥越 和雄
論文題目	Protein inhibitor of activated STAT, PIASy regulates $\alpha$ -smooth muscle actin expression by interacting with E12 in mesangial cells. (Protein inhibitor of activated STAT、PIASy はメサンギウム細胞において E12 と共役し $\alpha$ -SMA の発現を制御する。)		
(論文内容の要旨) メサンギウム細胞の形質変化は種々の糸球体疾患の病変形成に重要な位置をしめる。Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )等のサイトカインがメサンギウム細胞の形質変化を誘導することは報告されているが詳細は不明である。形質変化を来したメサンギウム細胞は増殖能を獲得し、平滑筋細胞関連分子を発現する。なかでも $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)の発現は重要な指標とされており、その発現機構の解明が形質変化の制御機構解明につながると考えられる。 $\alpha$ SMA 遺伝子のプロモーターには、CArG-box や E-box などの転写制御部位が存在している。近年、平滑筋細胞における $\alpha$ SMA の発現制御に E-box に結合する E12 の重要性が報告された。E12 はメサンギウム細胞にも発現が認められることから、メサンギウム細胞において E12 と結合し $\alpha$ SMA の発現を制御する分子を同定するため、yeast-two-hybrid 法を用いたクローニングを行った。その結果、新規 E12 結合分子として Protein inhibitor of activated STAT y (PIASy)を同定した。 まず、COS 細胞において PIASy と E12 を過剰発現させ、免疫沈降法にて両者の結合を確認し、メサンギウム細胞において内因性 PIASy と E12 の結合を確認した。次に、メサンギウム細胞において E12 の過剰発現により $\alpha$ SMA の発現増強が用量依存的に認められ、PIASy の過剰発現により E12 による $\alpha$ SMA の発現増強が用量依存的に抑制されることが確認された。この抑制効果は PIASy の SUMO E3-ligase 活性を消失させた mutant PIASy では認められず、SUMO 化の関与が疑われた。そこで、SUMO 化アッセイを行い、PIASy がその E3-ligase 活性により E12 を SUMO 化することを明らかにした。一方、メサンギウム細胞において PIASy を knockdown すると $\alpha$ SMA の発現増強を認めたが、同時に E12 も knockdown するとこの増強作用は認められなかった。以上の結果より、PIASy は E12 を介して $\alpha$ SMA の発現を抑制すること、さらにその発現抑制には E12 の SUMO 化が関与していることが示唆された。 次に形質変化の誘導因子 TGF- $\beta$ が PIASy にどのような影響を与えるかを検討した。メサンギウム細胞に対する TGF- $\beta$ 刺激により $\alpha$ SMA と共に PIASy、E12 の発現が共に時間・用量依存的に増加した。一方、PIASy を knockdown した上で TGF- $\beta$ 刺激を行うとさらに $\alpha$ SMA の発現が増強した。また、これらの一連の結果を in vivo において検証するため、増殖性腎炎モデルである Thy1 腎炎ラットで検討を行ったところ、糸球体の $\alpha$ SMA 発現に相関して PIASy だけでなく E12、TGF- $\beta$ も経時的に変化することが明らかとなり、in vivo においても PIASy が $\alpha$ SMA の発現に関与することが示唆された。 最後に、PIASy と E12 がメサンギウム細胞増殖に関わるか否かを細胞増殖アッセイにて調べたところ、PIASy knockdown にてメサンギウム細胞増殖が亢進し、さらに E12 を knockdown するとその増強効果が抑制され、PIASy は E12 と共役してメサンギウム細胞増殖にも関与することが分かった。 本研究により、メサンギウム細胞において TGF- $\beta$ 刺激により PIASy は誘導され、E12 と共役し $\alpha$ SMA の転写活性を抑制的に制御することが示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

メサンギウム細胞の形質変化は種々の糸球体疾患の病変形成に重要な位置をしめる。 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)はその代表的分子マーカーでありその発現の解明が重要である。本研究では培養マウスメサンギウム細胞を用いて、Class I bHLHであるE12タンパクが $\alpha$ SMAの発現を制御していることを示した。さらにyeast-two-hybrid法にてメサンギウム細胞における新規E12結合分子としてProtein inhibitor of activated STAT, PIASyを同定した。さらに $\alpha$ SMAプロモーターレポータープラスミドを用いた検討にてPIASyはE12と共役してE12による $\alpha$ SMA転写活性増強作用をRING domainを介して抑制していた。in vivo sumoylation assayにてPIASyはE12のSUMO-E3-ligaseであった。PIASyをknockdownした上でTGF- $\beta$ 刺激を行うことによりPIASyはTGF- $\beta$ により誘導され $\alpha$ SMAの発現を抑制的に制御していることが分かった。細胞増殖アッセイにてPIASyはE12と共役してメサンギウム細胞増殖を制御していた。ラットメサンギウム増殖糸球体腎炎モデルである抗Thy1腎炎においてもその増殖期にE12、 $\alpha$ SMA、PIASyの発現が相関して増加しておりE12とPIASyの相互作用も確認された。

以上の研究はメサンギウム細胞における $\alpha$ SMAの発現機構解明に貢献し、メサンギウム細胞形質転換機構の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成25年3月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降