

氏 名	辻 博 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2048 号
学位授与の日付	平 成 10 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Ribozyme targeting of receptor for advanced glycation end products in mouse mesangial cells (マウスメサンギウム細胞におけるリボザイムを用いた糖化終末産物受容体のターゲッティング)
	(主査)
論文調査委員	教 授 月 田 承 一 郎 教 授 中 尾 一 和 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

糖尿病性腎症は、欧米をはじめ我が国においても、末期腎不全に至る主要な原因疾患である。その主たる病変は、糸球体硬化症であり、IV型コラーゲンを中心とする細胞外基質の増生を特徴としている。糖尿病状態では、糖化終末産物が産生、蓄積され血管合併症の主要な原因であるとされている。また、糖化終末産物はその受容体を介して生物学的作用を及ぼすと考えられている。本研究においては、糖化終末産物の受容体の一つであるRAGE (receptor for advanced glycation end products) と、メサンギウム細胞における糖化終末産物による細胞外基質産生の亢進との関係について検討した。その方法として、受容体と生物学的効果の関連を明瞭にするため、RAGE特異的ハンマーヘッド型リボザイムを用いてRAGE発現の抑制を行った。

本研究において用いたリボザイムは、自己切断能を持つリボザイムとRAGE特異的リボザイムをタンデムに結合させた構造を有している。in vitroにおける検討では、リボザイムが自己切断能、及びリボザイムの基質であるRAGEのRNAの切断能を有していることを確認した。このリボザイムをSR α プロモーター、Hygromycin B耐性遺伝子を有する発現ベクターに組みかえて、リボフェクトアミンを用いてマウスメサンギウム細胞に導入し、stable cell lineを作製した。細胞内で転写されてきたリボザイムは、特異的切断をおこし、RAGEのメッセンジャーRNAレベルを低下させた。このことは、RNaseプロテクションアッセイ及び、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) を用いて確認した。この培養メサンギウム細胞におけるリボザイムによるRAGE発現抑制効果は、リボザイム導入後12継代まで保持され、抑制効果がアンチセンスのように一過性ではないことが示された。

次に、RAGEに対する単クローン抗体を用いて、免疫組織染色を行い、蛋白レベルでもRAGEが抑制されていることを確認した。

上述のRAGEに対する特異的リボザイムを導入した細胞に対し、糖化終末産物を負荷してIV型コラーゲンの産生の挙動を検討した。対照のメサンギウム細胞において糖化終末産物の負荷によって、IV型コラーゲンの上昇が見られるのに対し、RAGE特異的リボザイム導入細胞ではIV型コラーゲンの上昇の抑制がみられた。

以上より、培養メサンギウム細胞での糖化終末産物による、IV型コラーゲン産生の上昇には、RAGEが関与していることが示された。このことから、RAGEは糖尿病性糸球体病変の形成にも関与していることが示唆され、また、RAGEを抑制することは、病変進行の抑制につながる可能性を有すると考えられる。ハンマーヘッド型リボザイムについては、実験的手段として、すなはち本研究におけるような発現抑制系モデル作製的手段として有効であること、さらに治療法としての応用への可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖尿病性腎症は、欧米をはじめ我が国においても、末期腎不全に至る主要な原因疾患である。その主病変は、糸球体硬化症であり、IV型コラーゲンを中心とする細胞外基質の増生を特徴としている。糖尿病状態では、糖化終末産物（AGE）が産生、蓄積され腎症を含む合併症の重要な原因物質の一つであるとされている。また、AGEはその受容体を介して生物学的作用を及ぼすと考えられている。本研究においては、糸球体硬化症の発症進展に関与する機序の解明の一端として、AGE受容体の一つであるRAGE（receptor for advanced glycation end products）と、メサンギウム細胞におけるAGEによる細胞外基質産生の上昇との関係について検討した。その方法として、受容体と生物学的効果の関連を明瞭にするため、RAGE特異的ハンマーヘッド型リボザイムを用いてRAGE発現の抑制を行った。

本研究において用いたリボザイムは、自己切断能を持つリボザイムとRAGE特異的リボザイムをタンデムに結合させた構造を有している。このリボザイムについては、まず自己切断能、及びリボザイムの基質であるRAGEのRNAの切断能をin vitroで確認した。このリボザイムをマウスメサンギウム細胞に導入し、stable cell lineを作製した。細胞内で転写されてきたリボザイムは、特異的切断をおこし、RAGEのメッセンジャーRNAレベルを低下させた。このことは、RNaseプロテクションアッセイ及び、RT-PCR（reverse transcription-polymerase chain reaction）を用いて確認した。この培養メサンギウム細胞におけるリボザイムによるRAGE発現抑制効果は、継代を重ねても保持され、抑制効果がアンチセンスのように一過性ではないことが示された。RAGE特異的リボザイム導入細胞に、RAGEに対する単クローン抗体を用いた免疫組織染色を行い、蛋白レベルでもRAGEが抑制されていることを確認した。

RAGE特異的リボザイム導入細胞に対し、AGEを負荷してIV型コラーゲンの産生の挙動を検討した。対照のメサンギウム細胞においてAGEの負荷によって、IV型コラーゲンの上昇が見られるのに対し、RAGE特異的リボザイム導入細胞ではIV型コラーゲンの上昇の抑制が見られた。培養メサンギウム細胞でのAGEによる、IV型コラーゲン産生の上昇には、RAGEが関与していることが示された。このことから、RAGEは糖尿病性糸球体病変の形成に関与していることが示唆され、また、RAGEを抑制することは、病変進行の抑制につながる可能性を有すると考えられた。ハンマーヘッド型リボザイムについては、実験的手段として、すなわち本研究におけるような発現抑制系モデル作製的手段として有効であること、さらに治療法としての応用への可能性が示唆された。

以上の研究は、糖尿病性腎症の発症、進展機序の解明に貢献し、糖尿病性合併症の治療に寄与することが期待される。

従って、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10年7月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受けて合格と認められたものである。