

氏 名	榎 栄 里 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3146 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 月 23 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	SOX9 regulates the expression of Col4a2 through transactivating its enhancer element in mesangial cells (メサンギウム細胞において SOX9 は Col4a2 の発現をそのエンハンサーに作用して制御している)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 小 川 修 教 授 横 出 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

糸球体硬化症は末期腎不全に陥る最も重要な病変であり、細胞外基質の増生が特徴的である。増生した細胞外基質の主たる成分は $\alpha 1/\alpha 2$ 鎖 IV 型コラーゲンであり（遺伝子は各々 Col4a1 と Col4a2）、糸球体内では TGF- β などの増殖因子、アンギオテンシン II などのペプチドや糸球体内高血圧などの機械的因子に応じて増生される。今回、Col4a2 発現におけるエンハンサーの制御機構を培養メサンギウム細胞において初めて明らかにした。

Col4a2 遺伝子には GAACAAT 配列をもつ約 300bp のエンハンサーが存在する。培養メサンギウム細胞においてこのエンハンサーの活性をリポーターアッセイにより調べたところ、このエンハンサーを挿入したプラスミドではプロモーターのみのプラスミドに比べて活性が 6 倍に増加し、その活性は GAACAAT 配列に依存的であった。一方、TGF- β はメサンギウム細胞において Col4a2 の発現を増加させる最も強力な因子である。そこでメサンギウム細胞を TGF- β にて刺激し、AACAAA/T 配列に特異的に結合する転写因子である SOX 蛋白の発現量を検討したところ、Col4a2 の増加に先立って SOX9 の発現の増加が認められた。そこで TGF- β 刺激により増加した SOX9 がエンハンサー内の GAACAAT 配列に結合し、Col4a2 の発現を増加させるとの仮説をたててさらに実験をおこなった。

まず、*in vitro* で合成した SOX9 が GAACAAT 配列に結合することをゲルシフトアッセイにて示した。さらに、メサンギウム細胞において内因性の SOX9 が TGF- β 刺激下でこのエンハンサーに結合することを Chromatin Immunoprecipitation assay において示した。またリポーターアッセイにおいて Col4a2 のエンハンサーを挿入したリポーターベクターとともに SOX9 の発現ベクターを導入すると対照ベクターを導入した場合と比べて 3 倍に活性が増加した。この活性増加は GAACAAT 配列に依存的であった。SOX9 が Col4a2 の発現に関与することを示すため、SOX9 に対する siRNA を作成し、メサンギウム細胞に導入した。すると、SOX9 をノックダウンした細胞において、無刺激時および TGF- β 刺激時の Col4a2 の発現が抑制された。これらの結果から SOX9 はメサンギウム細胞において、Col4a2 のエンハンサー領域に作用し Col4a2 の発現調節に関与していることが示された。

さらにマウスの糸球体腎炎モデル（馬杉腎炎）を用いて生体における SOX9 の発現を検討した。腎組織における SOX9 の mRNA の発現を定量的 RT-PCR により検討したところ、SOX9 は腎炎発症前に比べ発症後 7 日目および 14 日目にそれぞれ発現が 18 倍、8 倍に亢進していた。免疫染色においても腎炎発症前では SOX9 の糸球体内の発現はほとんど認められなかったが、腎炎発症後 7 日目には発現が亢進していた。同時期に TGF- β と Col4a2 の発現も亢進していた。これらより SOX9 は糸球体腎炎後の Col4a2 の蓄積に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、SOX9 は Col4a2 のエンハンサーを標的としてその発現を制御しており、TGF- β による糸球体硬化症に関わる主要な因子と考えられた。

論文審査の結果の要旨

糸球体硬化症は末期腎不全に陥る最も重要な病変であり、細胞外基質の増生が特徴的である。増生した細胞外基質の主たる成分は $\alpha 1/\alpha 2$ 鎖IV型コラーゲンであり（遺伝子は各々*Col4a1*と*Col4a2*）、糸球体内ではTGF- β などの増殖因子や糸球体内高血圧などの機械的因子に応じて増生される。*Col4a2*遺伝子にはGAACAAT配列をもつ約300bpのエンハンサーが存在するが、どの転写因子がこの配列を制御するかは不明であった。

今回、TGF- β 刺激にてSOX9の発現が増加することに着目し、SOX9がこのエンハンサーに結合し、*Col4a2*の活性をGAACAAT配列に依存的に増加させることを示した。さらに、メサングウム細胞においてSOX9をノックダウンすると*Col4a2*の発現が抑制されることを見出した。これらの結果からSOX9は*Col4a2*のエンハンサー領域に結合し、*Col4a2*の発現調節に関与することが示された。マウスの糸球体腎炎モデルでは、腎臓でのSOX9の発現は腎炎発症前に比べ発症後に亢進し、その局在は糸球体内であることを示した。同時期にTGF- β と*Col4a2*の発現も亢進しており、SOX9は糸球体腎炎後のIV型コラーゲンの蓄積に関与していると考えられた。

本研究においてはSOX9が*Col4a2*のエンハンサーを標的としてその発現を制御し、TGF- β による糸球体硬化症に関わる主要な因子であることを初めて明らかにした。

以上の研究は*Col4a2*の転写制御機構の解明に貢献し、糸球体硬化症の病態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19年6月27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。