

氏 名	いま ばやし たけ し 今 林 丈 士
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2367 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 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	Expression of basic helix-loop-helix proteins in the glomeruli (ベーシックヘリックス-ループ-ヘリックス 蛋白の糸球体内発現について)
論文調査委員	(主 査) 教 授 小 川 修 教 授 篠 山 重 威 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

メサンギウム細胞は数個の糸球体係蹄壁を束ねる中心部位に局在し、平滑筋細胞が特殊に分化したものと考えられている。その機能のひとつとして収縮能を有し、糸球体血行動態の調節に関与している。このメサンギウム細胞がいかに平滑筋細胞形質を有するか、その制御は不明である。培養メサンギウム細胞では筋分化の制御因子である basic helix-loop-helix (bHLH) 蛋白である MyoD と Myogenin が存在し、機能を果たしていると報告されている。本論文ではメサンギウム細胞における bHLH の存在を *in vitro* および *in vivo* で検討した。平滑筋細胞の形質を維持している培養メサンギウム細胞を樹立し、その細胞における bHLH 遺伝子の存在を検討した。bHLH の遺伝子に共通の塩基配列より polymerase chain reaction (PCR) のいくつかのプライマーを設定した。メサンギウム細胞より RNA を抽出し、cDNA を作成し、このプライマーで PCR を行い、ベクターに導入し、塩基配列を決定した。その結果、メサンギウム細胞では myf5 と herculin の遺伝子が認められたが、myoD や myogenin は認められなかった。腎臓の組織でも同様であった。*in vivo* 腎における MyoD family の局在を特異的抗体を用いて蛍光抗体法で検討した。6 週令雄のマウス腎では、MyoD や Myogenin は全く存在しなかったが、Myf5 と Herculin は糸球体内に強陽性を示した。その局在はメサンギウムが主体で、核および核周囲に存在していた。また、傍糸球体装置の平滑筋細胞でも陽性を示した。Herculin はメサンギウム細胞が主体であり、Myf5 同様核および核周囲に認めた。その局在を詳細に検討するため、vascular endothelial growth factor の受容体 (flk-1) に対する抗体を用いて二重染色法で検討した。この抗体は血管内皮細胞とくに糸球体内皮細胞に特異的であった。その結果、Myf5 および Herculin の局在は内皮細胞とは異なる部位であり、微分干渉画像との合成画像でもメサンギウム細胞であることが明らかとなった。またこれらの MyoD family の制御因子である Id の局在を 6 週令マウス腎で検討したが、全く陰性であった。これら bHLH 蛋白の経時変化を検討した。MyoD および Myogenin は出生直後より 6 週令まですべて陰性であった。Myf5 は新生仔より陽性であり、その存在は 6 週令まで持続した。そのパターンはメサンギウムパターンであった。Herculin は新生仔では陰性であったが、1 週後より陽性となり、6 週令まで持続した。その局在は、1 週令では細胞質に染まり、3 週令以降は核パターンに変化した。Id は新生仔では陽性であったが、1 週以降は陰性となった。

Myf5 および Herculin の特異性は腎皮質部分より抽出した蛋白を用いウエスタンブロット法で検討した。Herculin は新生仔では陰性であったが、1 - 6 週令の組織では 33kDa の特異バンドを認めた。Myf5 は 1 - 6 週令の組織では 33kDa の特異バンドを認めた。新生仔では 33kDa のバンドは存在しなかったが、45kDa および 100kDa のバンドを認めた。これらの結果は *in vivo* メサンギウム細胞において筋細胞分化の制御因子である Myf5 および Herculin の存在を証明したものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

メサンギウム細胞は平滑筋細胞が特殊に分化したものと考えられている。しかし、このメサンギウム細胞の形質転換を制御する機構は不明である。本論文ではそのメカニズムを解明するため、メサンギウム細胞における basic helix-loop-helix

(bHLH) の存在を *in vitro* および *in vivo* で検討した。まず、申請者は平滑筋細胞の形質を維持している培養メサンギウム細胞を樹立し、その細胞における bHLH 遺伝子の存在を検討した。bHLH の遺伝子に共通の塩基配列より作成したプライマーを用いて、メサンギウム細胞より抽出した RNA から作成した cDNA で、RT-PCR を行い、得られたクローンの塩基配列を決定した。その結果、myf5 と herculin の遺伝子を得たが、myoD や myogenin は認められなかった。次に *in vivo* 腎における MyoD family の局在を蛍光抗体法で検討した。6 週令雄のマウス腎では、MyoD や Myogenin は全く存在しなかったが、Myf5 と Herculin は糸球体内に強陽性を示した。その局在はメサンギウムが主体であった。その局在を詳細に検討するため、VEGF 受容体 (flk-1) (内皮細胞特異マーカー) に対する抗体を用い、微分干渉画像で検討を加え、これら bHLH のメサンギウム細胞における局在が明らかとなった。Myf5 は新生仔より 6 週令まで陽性であった。Herculin は新生仔では陰性であったが、1 週後より陽性となり、6 週令まで持続した。Id は新生仔では陽性であったが、1 週以降は陰性となった。さらに Myf5 および Herculin の特異性は腎皮質部分より抽出した蛋白を用いウエスタンブロット法で検討し、免疫組織学的検討と一致した所見を得た。

以上の研究は、メサンギウム細胞の発生過程における bHLH 群の転写因子の役割を示唆し、腎の発生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13年2月27日実施の論文内容とそれに関する諮問を受け、合格と認められた者である。