

論文の内容の要旨

論文題目 進行性腎障害の尿中 wt1 検出と isoform 解析の意義

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

久保かなえ

Wilms' tumor suppressor gene (wt1) は腎生殖器系の発達形成に重要な役割を果たしている。wt1 は腎ネフロンの発生段階で高発現した後に徐々に発現量が低下し、成熟腎では podocyte にのみ限局して発現している。10 個の exon をもつ wt1 は、17 アミノ酸からなる exon 5 と exon 9 C 末端にある 3 つのアミノ酸 (KTS) という 2 つの alternative splice site によって 4 つの isoform が存在し、これらは正常腎組織でほぼ一定の割合で発現している。4 つの zinc-fingers と proline-glutamin-rich region を持つ蛋白構成から、transcription factor であることが推測され、細胞増殖や成長、上皮細胞分化、apoptosis に関わる遺伝子などを標的遺伝子としていることが *in vitro* で示唆されているが、その生理的作用は不明な点も多い。成熟腎で podocyte に限局して発現している wt1 が podocyte の発生のみならず機能維持に関与していることはいくつかの報告から推測される。Kreidberg らは wt1 null mice では腎ネフロンの発達形成不全が起こることを示し、Hammes らは + KTS ablation mice と - KTS ablation mice を作成し、+ KTS isoform の発現がない状態では腎ネフロンの発達は行われるが podocyte の形成不全が起こり、- KTS isoform の発現がない状態では糸球体の低形成が起こることを示している。先天性 wt1 異常によって小児期に早期腎不全

に至る Denys-Drash 症候群においては wt1 の点変異による dominant negative mutation が、また Frasier 症候群においては alternative splicing の異常による isoform (+ KTS or - KTS) 不均衡が原因として知られている。私は、成熟腎では podocyte に限局して発現している wt1 が成人の進行性腎障害にも影響を与えている可能性を考え、1)これを非侵襲的に解析するために進行性腎障害患者尿沈渣細胞から RNA を採取し、nested RT-PCR によって wt1 cDNA を増幅することを試み、更に、2) wt1 が成人の腎障害に関与するとしても、DDS や FS で認められるような wt1 の変異でなく、isoform の不均衡などの wt1 の minor abnormality が高血糖や糸球体内高血圧などの状況下で腎障害の進行に影響を与える可能性を考え、この方法を用いて尿中 wt1 の isoform 発現の検討を行った。

365 名の患者と 21 名の腎障害のない健常者を対象に研究を行った。患者は 90 例の蛋白尿を伴わない糖尿病 (DM)、85 例の蛋白尿を伴う糖尿病、70 例の慢性糸球体腎炎 (CGN)、74 例のリウマチ関連疾患 (RD)、17 例のループス腎炎 (LN)、29 例のその他の疾患に分けられた。50-100ml の新鮮尿の沈渣細胞から acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法で RNA を採取し、ヒト wt1 特異的 primer を用いた nested RT-PCR 法にて wt1 cDNA を増幅した。exon 5 splicing による isoform と KTS splicing による isoform の検出は、各々の splice site を増幅するような primer で nested PCR を行い、前者は agarose gel での泳動で、後者は 9 bp の差を検出するため polyacrylamide gel での泳動で分離した。Control として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の PCR を同時に行った。尿中 GAPDH は全検体 386 例中 323 例で検出された (83.7%)。wt1 mRNA は 61 例の尿に発現を認め、GAPDH 陽性例の 18.9%であった。wt1 陽性例は蛋白尿のない DM 群の 4.4% (4/90)、蛋白尿のある DM 群の 29.1% (25/86)、CGN 群の 21.4% (15/70)、RD 群の 9.5% (7/74)、LN 群の 35.3% (6/17)、その他の疾患群の 13.8% (4/29)であった。健常者群に wt1 陽性例はなかった。蛋白尿を伴う DM 群では、wt1 陽性患者の血清クレアチニン値の平均が $2.69 \pm 0.58 \text{mg/dl}$ と、wt1 陰性患者より高値であった ($1.56 \pm 0.26 \text{mg/dl}$)。CGN

群と LN 群では wt1 陽性患者と wt1 陰性患者との間に血清クレアチニン値の有意な差は認めなかった。一方、これら 3 群において、wt1 陽性患者の蛋白尿の程度は wt1 陰性患者に比して有意に高いという結果を得た ($p < 0.05$)。

次に wt1 陽性患者のうち 44 例を対象に、尿中の wt1 isoform (+ exon 5) または (- exon 5) の発現についての検討を行った。正常な腎臓では wt1 isoform (+ exon 5) と (- exon 5) がおよそ 9:5 の割合で発現しているとされており、尿中から + exon 5 が検出された 37 例 (+ exon 5 のみ検出された 6 例と + exon 5、- exon 5 の両方が検出された 31 例) と、- exon 5 のみが検出された 7 例の、2 つのグループに分けて臨床所見を検討した結果、+ exon 5 群の血清クレアチニン平均値は $1.66 \pm 0.26 \text{mg/dl}$ で、ほぼ正常範囲を示した - exon 5 群 ($1.04 \pm 0.31 \text{mg/dl}$) に比べ高値であった。+ exon 5 群の 7 例 (18.9%) が isoform study を行った後 1 年以内に末期腎不全 (ESRD) に至っている。- exon 5 群で ESRD に陥った者はいなかった。蛋白尿の程度は + exon 5 群が 2.01 ± 0.22 、- exon 5 のみ検出された群が 1.71 ± 0.64 と、+ exon 5 群で蛋白尿の程度が高い傾向にあった。

尿中の wt1 isoform (+ KTS) および (- KTS) に関する検討は 50 例を対象に行われた。+ KTS と - KTS の両方が検出されたのは 26 例、+ KTS のみが検出されたのは 14 例、- KTS のみが検出されたのは 10 例であった。+ KTS と - KTS の両方が検出された群の血清クレアチニン平均値は $2.55 \pm 0.52 \text{mg/dl}$ であり、+ KTS のみ検出された群の $1.01 \pm 0.18 \text{mg/dl}$ と - KTS のみ検出された群の $1.94 \pm 0.75 \text{mg/dl}$ に比べ高値であった。+ KTS のみが検出された群の血清クレアチニン値は + KTS と - KTS の両方が検出された群より有意に低値を示した。蛋白尿の程度は両方の isoform が検出された群で 2.50 ± 0.27 であり、+ KTS のみの群で 1.11 ± 0.33 、- KTS のみの群で 2.00 ± 0.47 であった。+ KTS のみが検出された群の尿蛋白は他群に比べて少なく、+ KTS と - KTS の両方が検出された群とは有意差をもって少なかった。wt1 isoform 検出のための採尿後 1 年以内に ESRD に至り、透析導入となった患者は + KTS と - KTS の両方が検出された

群で 5 例、-KTS のみ検出された群は 2 例認めましたが、+ KTS のみ検出された群にはみられなかった。

私は尿沈渣細胞から患者自身の mRNA を解析することが可能であることを明らかにした。wt1 は進行性腎障害患者の尿から有意に高率に検出され、進行性腎障害患者群では尿中 wt1 陽性が蛋白尿の程度と関連していた。糖尿病性腎症群では尿中 wt1 が蛋白尿だけでなく腎機能低下の程度とも関連しており、wt1 が腎尿路系で podocyte に限局して発現していることから、尿中 wt1 検出は糸球体から剥離した podocyte の存在を表し、進行性腎障害の程度や予後と関連している可能性が示唆された。更に isoform の検討から、exon5 を含まない isoform のみが検出された群で腎機能低下が軽度であることが確認され、各々の isoform が異なる意味を持ち、腎機能障害の程度に影響を与える可能性が示唆された。正常腎組織では+ exon5 isoform と- exon5 isoform の割合は 9:5 であり、本研究で示されたように- exon5 が優位に発現するという特異な状況が存在する可能性が考えられた。Frasier 症候群は+ KTS と- KTS の isoform ratio の異常が巣状糸球体硬化症様の病態と早期腎不全を惹き起こすが、exon 5 splicing による isoform ratio の異常も、ある状況下においては腎障害に影響を与えている可能性が考えられた。私は、wt1 の 4 つの isoform が各々異なった働きを持ち、その割合のバランスが崩れることが腎症の病態や進行に関連している可能性を考えている。先天的に+ KTS/- KTS isoform バランスが変化することが巣状糸球体硬化症様変化を惹起するという Frasier 症候群の病態以外にも、糸球体がダメージを受けた時に後天的に+ KTS/- KTS isoform バランスが崩れたり、exon 5 splicing による isoform バランスの変化が糸球体病変の進行を修飾する可能性がある。直接的な証明は為されていないが、これらの結果は wt1 というひとつの遺伝子産物の機能的異常が進行性糸球体病変のメカニズムに関与している可能性を示唆すると考えた。