

論文の内容の要旨

論文題目 定量的 RT-PCR 法の開発と、それを用いた、腎における EP3 型プロスタグランジン受容体 mRNA のネフロン内分布、および、片腎摘後の AT1A 型アンジオテンシン受容体 mRNA 発現の解析

氏 名 谷 口 茂 夫

遺伝子発現の検討は、今日の医学、生命科学の研究の根幹的な分野をになっている。しかし、mRNA 発現の検討に一般によく用いられる Northern blot 法などの組織の homogenate の mRNA を抽出後検討する方法は、腎の様な heterogeneous な細胞の集合体である組織への適応には限界がある。組織内の mRNA 発現の topology を検討するためには、in situ hybridization 法がよく用いられるが、定量的な検討には適していない。一方、近年、ネフロンセグメントの microdissection 法と RT-PCR 法を組み合わせる事により、腎の組織を構成するそれぞれの細胞での特定遺伝子の発現の解析が可能になった。しかし、この方法でも、定量的な検討は難しく、遺伝子発現の調節の検討への適応には限界があった。

定量的な RT-PCR として広く用いられている方法に competitive RT-PCR がある。これは、検体に対照となる核酸を一定量混じり、検出すべき核酸と対照を同一チューブ内で同じプライマーで増幅し、それぞれの産物の量を比較する事により、検体の核酸量を知るという方法である。しかし、この方法は手技的に煩雑であり、また、あらかじめ採取した検体量をの正確に測定する事が必要であるので、microdissectionn によって得たネフロンセグメントの様な極めて微量な検体への適応は容易ではなかった。そこで、我々は、簡便に用いられる新たな定量的な RT-PCR 法を開発した。

この方法では、competitive RT-PCR と同様、対照となる核酸を目的とする核酸と同一チューブ内で同じプライマーを用いて増幅し比較するという原理を用いた。しかし我々の方法では、細胞内のゲノム DNA をそのまま量的対照として用いる事とした。具体的には、まず組織を処理する際に、RNA と DNA を分離する過程を入れずに、両者をそのまま回収するようにする。逆転写の段階では、特殊なプライマーを用いる事により cDNA に変異を導入する。PCR は同一エクソン上のプライマーを用いて行い、cDNA と平行してゲノム DNA の対応する部分も増幅する。mRNA の量は、変異の入った cDNA からの産物と変異の入っていないゲノム DNA からの産物の量を比較し、その比として表す。

しかし、cDNA をゲノム DNA と比較して検討が可能なのは、それら両者の量が同程度（細胞あたり数コピー）である場合に限定されており、mRNA 量が微量であったり、多量である場合には、この方法の適応は困難であった。

この問題を解決するために、次のような方法を導入した。mRNA 量が微量である場合には、cDNA とゲノム DNA を平行して増幅する前に、特別なプライマーを用いた少数サイクルの PCR により、cDNA だけを選択的に増幅し、ゲノム DNA と比較できる量とした。その後両者を同時に PCR で増幅し、比較検討した。cDNA のみを増幅する際に、検体を複数のチューブに分注し、それぞれについて異なったサイクル数の PCR を行い、そのサイクルごとの増加率から、増幅する前の cDNA 量を推定した。逆に多量に発現

している mRNA に関しては、PCR の前にゲノム DNA だけを増幅して検討した。これにより、微量なものから多量なものまで、広い範囲の mRNA に関してこの方法が適応可能となった。

この新しい定量的 RT-PCR 法は competitive PCR に比して、RNA のみを抽出する過程を要せず、対照の核酸を別途に合成する必要が無く、また mRNA の量が直接細胞あたりの量として表せるので、採取した検体の量を測定する必要が無い。これらの特徴により、この方法は、特に微量な検体での mRNA の発現の検討に適していると考えられる。

プロスタグランジン E2 は腎で paracrine、または autocrine factor として、腎機能の調節に重要な役割を果たしている。プロスタグランジン E2 の受容体には、現在では、EP1 から EP4 の 4 つのタイプが知られているが、このうち Gi 蛋白に結合して働く型 (EP3 型) は腎に多量に存在する事が知られていた。そこで我々は、新たに開発した定量的 RT-PCR 法を用い、マウス EP3 型プロスタグランジン E2 受容体 mRNA のネフロン内分布を検討した。EP3 型受容体 mRNA は、ヘンレの太い上行脚を中心とする遠位尿細管に分布していた。この結果は、プロスタグランジン E2 が腎遠位尿細管での物質輸送の調節に重要な働きをしている事を裏付ける結果であった。

アンジオテンシン II はプロスタグランジン E2 と同様、腎機能の調節に重要な働きをしており、その受容体は、血管系、糸球体、尿細管に分布している事が示されている。アンジオテンシン II は慢性腎不全の際の腎障害の進行に重要な役割を果たしている事が、数々の基礎的な実験や、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、受容体拮抗剤を用いた臨床的検討により示されている。腎障害時のアンジオテンシン II の作用に関しては、糸球体での血行動態を介するものとする考えが一般的であるが、腎障害進行は、糸球体障害よりも間質尿細管での障害により強く関連するとされており、最近では、尿細管へのアンジオテンシン II の直接作用が進行性腎障害に関与しているという知見も得られている。慢性腎不全では、機能するネフロン数の減少し、残存ネフロンへ過度な負荷がかかる事が、障害が進行する要因であると考えられており、残存腎でのその機能の生理学的検討が、慢性腎不全進行の機序の理解につながると考えられる。そこで我々は片腎摘後の残存腎で AT1A 型アンジオテンシン II 受容体 mRNA の発現を、我々が開発した定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、残存腎では、近位尿細管においては AT1A 型受容体 mRNA が増加していたが、糸球体では変化は見られなかった。これは、アンジオテンシン II の作用が残存腎の近位尿細管で増強している事を示唆する。この結果は、アンジオテンシン II による腎障害の進行に、その尿細管に対する直接作用が関与している可能性を支持するものであると考えられた。