

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 吉田 成孝

本研究は腎糸球体障害時の主な漏出蛋白であるアルブミンが蛋白尿成立のために重要な役割を果たす糸球体足細胞（以下ポドサイト）に対し障害的に働くかを調べるため、マウス由来不死化培養ポドサイトを用いた *in vitro* の系とラットによる *in vivo* の系にて、それぞれ培養液中へのアルブミン添加と腹腔内アルブミン投与モデルを用いてポドサイトの障害の有無とその関連分子の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 培養液中へのアルブミン添加によりポドサイトに障害が惹起されることが、アクチン線維の再構成とアポトーシスによって示された。アポトーシスが生じていることは複数のアッセイ系で確認され、TUNEL アッセイによる定量的な評価では、アルブミンに対し濃度・時間依存性にアポトーシスが惹起されることが示された。
2. 添加したアルブミンに対する特異的な抗体に免疫染色により培養液に添加されたアルブミンがポドサイトに取り込まれることが示された。FITC によってラベルされたアルブミンの添加をしたポドサイトの蛍光測定によって、ポドサイトへのアルブミン取り込みが定量的に評価され、上記障害出現より充分早い時間で取り込みの飽和が見られることが示された。
3. アルブミンによるポドサイト障害に関与する分子の探索が行われた。アルブミン添加により濃度・時間依存的に TGF- β の発現が上昇することが Real Time RT-PCR による mRNA レベルと Western blotting による蛋白レベルで示された。TGF- β により活性化される代表的で特異的な蛋白である Smad 2/3 のリン酸化亢進が Western blotting により示され、TGF- β のシグナル亢進が確かめられた。さらに p38 MAPK のリン酸化亢進も同様に Western blotting により示された。
4. これら分子が実際にアルブミンによるポドサイト障害に関与していることを確かめるため、TGF- β の中和抗体と p38 MAPK の阻害剤によるシグナル抑制が試みられた。アルブミンによるアクチン線維の再構成とアポトーシスはこれら阻害剤により抑制されたことから、TGF- β と p38 MAPK が実際にアルブミンによるポドサイト障害に関与す

5. アルブミンを腹腔内投与したラットは著明な蛋白尿を来とし、投与アルブミンに特異的な抗体により、投与したアルブミンが糸球体に沈着していることが示された。一方で体重・血圧・尿量等には影響を与えないことが示された。
6. この系におけるポドサイトの障害が有無の探索が行われた。ネフリン染色の低下・糸球体内アポトーシスの増加・電子顕微鏡によるポドサイトの形態変化によりポドサイトの障害が示され、前二者に関してはスコアリングと計数により、有意な差が生じていることが示された。
7. 糸球体分画 mRNA による Real Time RT-PCR と Western blotting により TGF- β と p38 MAPK の亢進が起きていることが示され、in vivo の系においても in vitro と同様にこれら分子がアルブミンによるポドサイト障害に関与している可能性が示された。

以上、本論文はアルブミンがポドサイトを障害することと、その過程で TGF- β と p38 MAPK が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究からは蛋白漏出がポドサイトの障害を介して更なる蛋白尿を惹起する悪循環の存在が推定され、腎障害の進展の理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。