

氏 名	森 田 善 方
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 6 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 0 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. (マウス腎臓の近位尿細管において、Legumain/asparaginyl endopeptidase は、fibronectin 分解を介して細胞外基質の代謝を制御する。)
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 岡 田 裕 作 副 査 教 授 岡 村 富 夫

論文内容要旨

※整理番号	568	氏名	森田 善方
学位論文題目	Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. (マウス腎臓の近位尿細管において、Legumain/asparaginyl endopeptidase は、fibronectin 分解を介して細胞外基質の代謝を制御する。)		
【目的】	<p>Legumain / Asparaginyl endopeptidase はライソソームに存在するシステインペプチダーゼである。マウスの各臓器において、特に腎臓で Legumain の mRNA 発現が増強している事が報告され、我々もラットの各臓器で、腎臓の近位尿細管に Legumain が強く発現している事を免疫組織化学染色法にて示した。これより Legumain は腎臓、特に近位尿細管において重要な働きを有していると考えられるが、その詳細は未だ不明である。</p> <p>全ての腎疾患において、腎臓間質の線維化が腎機能低下につながる事が知られている。この線維化は細胞外基質タンパク質(extracellular matrix:ECM)の過剰な蓄積によるものと考えられているが、この異常な ECM 蓄積の機序はいまだ明確ではない。したがって ECM 蓄積の機序の解明は、腎臓線維化の病態解明につながる期待できる。ECM の分解は主に細胞膜上に存在する酵素が司ると考えられているが、近年、ECM が受容体を介したエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、ライソソームで分解される経路が重要であると報告された。そこで我々は、Legumain が ECM の取り込み・分解に関与するという仮説を立て、これを証明する事を実験の目的とした。</p>		
【方法】	<p>1、Legumain が活性を持つ酸性条件下 (pH 5.0) にて、精製した Legumain とフィブロネクチンを incubate し、Legumain によるフィブロネクチンの分解を検討した。</p> <p>2、細胞外のフィブロネクチンの取り込み・分解に対する細胞内の Legumain の関与を検討するために、培養マウス近位尿細管細胞の培養液中に、ビオチン標識したフィブロネクチンを添加し、10 時間後に培養液に残存したビオチン標識フィブロネクチンの量を測定した。この実験を、リポフェクション法による遺伝子導入による Legumain の強発現下と、ライソソームの活性阻害薬(クロロキン)を用いたライソソームの活性阻害下にて行った。</p>		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

3、腎間質の線維化を起こす慢性腎障害モデルとして片側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction: UUO)モデルを用い、野生型マウス(WT群)と Legumain ノックアウトマウス(KO群)を比較検討した。UUOは体重20-25gのマウスに対して、麻酔下に左側尿管を結紮して作製し、術後10日後に左右の腎臓を採取した。コントロールとしては右側の非結紮側を用い、結紮側と比較した。腎組織はAZAN染色により線維化を、免疫組織化学法によってフィブロネクチン沈着を評価した。またフィブロネクチンのタンパク量をウエスタンブロット法にて、mRNA発現量を real-time RT PCR 法にて評価した。

【結果】

- 1、精製 Legumain はフィブロネクチンを直接分解した。この分解は Legumain の阻害物質である Cystatin C により阻害された。
- 2、細胞に Legumain を強発現させると、コントロール群と比較して、培養液中のビオチン標識フィブロネクチンの残存量が減少した。また、ライソソームの活性を阻害すると、ビオチン標識フィブロネクチンの残存量が増加した。
- 3、UUOによりフィブロネクチンの mRNA 発現は増加したが、WT群とKO群に差は認められなかった。しかし、WT群に比し、KO群では、結紮側腎皮質のフィブロネクチン沈着エリアが拡大するとともに、フィブロネクチンのタンパク量も増加していた。またWT群よりも、KO群において、腎間質の線維化が亢進していた。

【考察】

Legumainがフィブロネクチンを直接的に分解する事を示し、フィブロネクチンが Legumain の基質である事を証明した。培養尿管細胞による実験では、細胞内の Legumain を強発現する事で、細胞外に添加したフィブロネクチンの分解が亢進する事、ライソソーム酵素の活性阻害下では細胞外に加えたフィブロネクチンの分解が低下する事が分かった。これより、細胞外に存在するフィブロネクチンの取り込み・分解に、細胞内の Legumain が関与する事が示唆された。

UUOモデルにおいて、フィブロネクチンの mRNA 発現については両群に差を認めなかったにも関わらず、KO群ではWT群よりもフィブロネクチン沈着が亢進し、さらに間質線維化も亢進していたことは、KO群では慢性腎障害モデルにおいて過剰に蓄積したフィブロネクチンの分解が低下している事を示し、つまり Legumain がフィブロネクチン分解を介して腎臓の線維化を制御している可能性を示唆しているものと考えられる。

【結論】

腎臓線維化の際に蓄積するフィブロネクチンの代謝において、細胞内への取り込み、ライソソームによる分解が重要であり、この取り込み・分解にライソソーム酵素 Legumain が重要な役割を果たしている事を明らかにした。これより Legumain が、腎臓線維化の病態において重要な働きをしている可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	568	氏名	森田善方
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>腎臓疾患においては腎臓間質の線維化がおり、腎機能が低下する。線維化は細胞外マトリックスタンパク質の蓄積による。</p> <p>腎臓リソソームにはシステインペプチダーゼであるレグメイン legumain が局在しているが、本研究は、このタンパク質加水分解酵素であるレグメインに着目して、線維の本体である細胞外マトリックスタンパク質の分解代謝を検討したものである。</p> <p>その結果、1) 精製したレグメインによるフィブロネクチンの直接分解、2) レグメインの細胞外フィブロネクチンの分解への関与、3) 慢性腎障害モデル (片側尿管結紮) において、レグメインのノックアウトマウスでのフィブロネクチンの分解低下、を明らかにした。この結果に基づいて申請者は、レグメインが腎臓間質の線維化を制御していることを結論した。</p> <p>この成果は腎疾患の病態解明や治療法開発に寄与することが期待され、よって、本論文は博士 (医学) の学位論文に値する。</p> <p>なお申請者は平成20年1月30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。</p>			
(平成20年2月5日)			