【170】

氏　名（国籍）	金本勝義（韓　国）（かね もと かつ よし）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　甲　第　3430　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	**The role of connective tissue growth factor in the scar formation of the glomerular crescent** （糸球体半月体の瘢痕化における結合組織増殖因子:CTGFの役割についての研究）

主　査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之
副　査	筑波大学教授	医学博士	戸村成男
副　査	筑波大学助教授	医学博士	堤　明人
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	長谷川雄一

論文の内容の要旨

（目的）

糸球体半月体における瘢痕化現象の分子機構は不明である。本研究は，近年線維化作用に特異的な分子として注目されている，connective tissue growth factor（CTGF）に着目し，CTGFが半月体瘢痕化の進展に如何に関与しているのかを解明するため，ラット半月体形成性腎炎モデルおよびヒト半月体形成性腎炎標本を用いて，病理組織学的な検討を行った。さらに半月体の主要な構成細胞の一つであるBowman囊上皮細胞のラット培養系を用いて，CTGFの線維化作用，糸球体腎炎進行に関与すると考えられている他の増殖因子（TGF-β，PDGF-BB，FGF2）との相互作用，CTGF阻害による線維化作用の変動などの細胞生理機能を，分子生物学的手法を用いて検討した。

（対象と方法）

1）雄WKYラットに抗ラット糸球体基底膜抗体を静注いて半月体形成性腎炎モデルを作製し，腎炎の進行におけるCTGFの発現と線維化の程度を経時的に観察するため，4，7，14病日に腎を摘出した。CTGFは*in situ* hybridizationで検討した。半月体細胞の形質確認にはED1，synaptopodin，pancadherin，PGP9.5を，細胞外基質はI型コラーゲン，IV型コラーゲン，fibronectinを酵素抗体法あるいは蛍光抗体法で検討した。2）ヒト半月体形成性腎炎標本18例を用いて，CTGFをin situ hybridizationで，半月体細胞の形質確認にはcytokeratin，CD68，synaptopodinを酵素抗体法で検討した。CTGFとTGF-β，基質沈着の半月体における関係を連続切片で検討した。また発達腎におけるCTGFの発現を，正常剖検胎児腎2例を用いて検討した。3）培養ラットBowman囊上皮細胞系（Rat PEC）を用いて，（1）細胞形質を各種マーカーによる蛍光抗体法で確認した。（2）FGF2，PDGF-BB刺激による細胞増殖の評価を［^{3}H］thymidine取り込みによるDNA合成能で確認した。（3）本細胞の非増殖活発状態，増殖活発状態，増殖飽和（停止）状態における細胞外基質産生（I型・IV型コラーゲン，fibronectin，laminin）とCTGF，細胞周期因子CDK2，細胞周期抑制因子p27の発現動態をRT-PCR，Western blot解析で検討した。（4）FGF2，PDGF-BB，TGF-β刺激による細胞外基

質産生とCTGF発現の変動をWestern blot解析，半定量的RT-OCRで比較検討した。(5) CTGFアンチセンスオリゴを用いてCTGF発現を阻害した状態でPDGF-BB，TGF-βｌ刺激を行い，本細胞の組織外基質産生におけるCTGFの役割を検討した。

(結果)

1) WKYラットは著明な半月体形成を呈し，4病日ではマクロファージ優位の細胞性半月体であった。7病日では細胞性半月体は上皮細胞マーカーであるpan-cadherinを発現し，マクロファージ陽性細胞は減少した。さらに14病日では，マクロファージはほぼ消失し，線維細胞性半月体が増加した。細胞外基質は4病日には殆どみられなかったが，7・14病日で著明な増加を認めた。CTGF mRNAはマクロファージ優位の4病日では半月体における発現は認めなかったが，上皮細胞優位である7・14病日で発現が増加した。連続切片ではCTGF mRNAを発現する半月体の構成細胞は，Bowman嚢上皮細胞のマーカーであるPGP9. 5を強く発現したことから，Bowman嚢上皮細胞がCTGFの主な産生源であることが確認された。2) ヒト半月体において，CTGF mRNAは細胞性～線維細胞性半月体間に強い発現を認めた。CTGF mRNA発現細胞は上皮細胞のマーカーであるcytokeratinを強く発現したことから，ラットと同様に，Bowman嚢上皮細胞が半月体の主要な構成細胞であり，かつCTGFの産生源であることが確認された。連続切片での検討では，半月体のCTGF mRNA発現部位と一致して，TGF-β1，TGF-βレセプターⅠ，細胞外基質の発現がみられた。さらに，糸球体障害からの再生像である偽尿細管様構造物にCTGF mRNAが強く発現した。胎児腎ではCTGFはpodocyte，Bowman嚢上皮細胞に発現したが，尿管系細胞には発現しなかった。以上から，CTGFは線維作用のみならず，糸球体上皮細胞の極性の維持や障害からの再構築にも関与している可能性が推察された。3) 培養Rat PECはBowman嚢上皮細胞のマーカーを発現したが，podocyte，尿細管細胞，内皮細胞のマーカーは陰性であった。[^{3}H] thymidine取り込みによる細胞増殖には，FGF2が優位に関与し，CTGF発現の亢進に伴う細胞外基質の産生にはPDGF-BB，TGF-βが優位に関与した。TGF-βは本細胞に強力にCTGF発現を亢進させた。本細胞は細胞増殖飽和（停止）状態で，細胞周期停止と時期を同じくしてCTGF発現を亢進して基質産生が増加した。さらに，アンチセンスオリゴ添加によるCTGF阻害下にてTGF-β，PDGF-BB刺激をしても基質産生が著明に抑制されたことから，本細胞の細胞外基質産生には内因性CTGFの増加が重要な役割を担うことが示唆された。

(結論)

糸球体半月体における瘢痕化現象・修復機転に，Bowman嚢上皮細胞から産生されるCTGFが重要な役割を持つことを，in vivo，in vitro両面から確認した。以上のことがヒト・実験動物モデル共通の現象であることを本研究で明らかにした。

審査の結果の要旨

本研究では，糸球体半月体における瘢痕化現象の分子機構を明らかにすることを目的として，主にconnective tissue growth factor（CTGF）の発現をラット，ヒト，剖検胎児，培養ラット細胞において検討した。結果として，糸球体半月体における瘢痕化現象，修復機転にBowman嚢上皮細胞から産生されるCTGFが重要な役割を果たしていることが判明した。研究成果は国際誌にも受理され世界でも高く評価されている。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。