

氏名(本籍)	とまり 泊	しん すけ 真 介	(大阪府)
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 3180 号		
学位授与年月日	平成15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	糸球体および糸球体上皮細胞 (Podocyte) の分化に関する研究 —機能糸球体の再生にむけて—		
主 査	筑波大学教授	医学博士	小 山 哲 夫
副 査	筑波大学助教授	医学博士	鴨 田 知 博
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	豊 島 秀 男

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

糸球体上皮細胞 (Podocyte) は終末分化した細胞であり、ヒトでは在胎32週にその数が限定し、以降はほとんど増殖しないと考えられている。この細胞生物学的特徴により、糸球体はその機能に大変重要な、安定した濾過障壁を維持することができると考えられている。腎障害進行の阻止や硬化した糸球体の機能再生の試みは、現在の腎臓病学の最も重要な課題である。

### (方法)

1. 糸球体の前駆体である S-shaped body を単離・培養し、派生増殖してくる細胞の形質を蛍光免疫染色法を用いて解析し、このステージでの podocyte の分化の方向性および細胞生存に対する bFGF の成長因子の影響について検討した。
2. podocyte に特異的に発現し、その局在と発現時期から podocyte の分化に重要な因子と考えられる cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) の p27 および p57 のダブルノックアウトマウスを作成し、これら因子が相互代償的に機能し、糸球体発生への必須な働きについて解析、検討した。
3. podocyte および糸球体の分化に関する新規遺伝子の探索のため、糸球体形成が盛んな新生仔腎の nephrogenic zone および成熟糸球体との間で suppression subtractive hybridization (SSH) 法を用い、検討した。

### (結果および考察)

1. 単離 S-shaped body からは cobble stone 型や arborized 型の細胞が派生増殖した。その中には分化した podocyte のマーカーである synaptopodin を発現する細胞が含まれていた。しかし、そのような細胞は非常に数が少なかった。また、bFGF は派生増殖細胞のアポトーシスを抑制する傾向があったが、synaptopodin の発現は刺激しなかった。これらより、podocyte は S-shaped body stage 以降にさらに何らかの分化誘導刺激を受けて分化マーカーを発現し、成熟することが示唆された。その刺激は、bFGF や HGF, LIF (leukemia inhibitory factor) ではなかった。
2. ダブルノックアウトマウスでは、野生型や単独のノックアウトマウスと比べて、非常に大きな糸球体が形成された。その中に含まれる podocyte の数も通常より多く確認された。また podocyte の特徴である足突起やスリッ

ト膜の形成もみられた。これらより、p27およびp57は、当初期待されたpodocyteの終末分化への関わりについては余り重要ではないが、糸球体の大きさやpodocyteの数の制御を介して、糸球体形成に関わっていることが示唆された。

3. 糸球体形成時に発現する遺伝子として、既知遺伝子15種、未知遺伝子5種を得た。そのうちの1つubiquilin 1は、さらにin situ hybridization法でその局在を解析し、nephrogenic zoneにおいて強く発現していることを確認した。

#### (結論)

糸球体上皮細胞の終末細胞への分化は、S-shaped body stage以降にも何らかの誘導因子が働いている可能性があり、この時期に発現が亢進するp27とp57の共役的機能は、細胞の分化よりも細胞数の制御に関わっていると考えられる。

また、SSH法を用いて糸球体形成に関わる遺伝子を探索し、これまで知られていなかった幾つかの遺伝子を候補として確認した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

糸球体上皮細胞は終末分化した細胞であり、ヒトでは出生前にその数が限定され、以降はほとんど増殖しないと考えられている。それゆえ、一旦糸球体上皮細胞傷害を生ずるとその再生は望めない。著者らは腎再生医療の端緒を開くべく、糸球体上皮細胞の分化誘導に関する諸因子を免疫染色、遺伝子改変マウス、さらにsuppression subtractive hybridization法を用い検討した。分化誘導には既知の因子以外の因子が関与している可能性を指摘し、さらに腎糸球体形成に関わる因子として、幾つかの候補遺伝子を検出した。

現在最も遅れている腎の再生医学領域の研究において、発生学を基礎として、分子生物学的手法を駆使し、各種の因子の関与を明らかにした点は高く評価出来る。今後、分化誘導機序に関与する詳細な遺伝子の固定解明が期待される。

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。