

[250]

氏 名 (本籍)	はぎ わら まさ ひろ 萩 原 正 大 (茨 城 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4082 号		
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	<b>Mitochondrial dysfunction in focal segmental glomerulosclerosis of Puromycin Aminonucleoside Nephrosis</b> (ピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症における、巣状糸球体硬化病変とミトコンドリア異常の関連性について)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	高 橋 智
副 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	川 上 康
副 査	筑波大学助教授	医学博士	小 島 寛

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

ミトコンドリアは細胞のエネルギー代謝にきわめて重要な働きを担っている。この細胞内エネルギー産生系の酵素欠損により発症するミトコンドリア脳筋症の患者の一部には、ネフローゼ症候群を併発する患者が存在し、腎組織において巣状糸球体硬化 (FSGS) 病変を示すことが知られている。筆者らは、7 例の家族性 FSGS 症例中に、ミトコンドリア脳筋症の原因遺伝子異常として知られるミトコンドリア DNA (mtDNA) A3243G 点変異を腎組織において高率に有する症例を 2 例検出した。FSGS 病変の形成においては糸球体上皮細胞 (ポドサイト) の変性、脱落とそれにとまう、糸球体基底膜とボウマン囊の癒着から硬化病変へと進展する機序が想定されている。ピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症 (PAN) は、ポドサイト障害により、病初期には大量の蛋白尿を伴うネフローゼを発症し、その後の繰り返し投与により FSGS 病変を形成する実験腎炎モデルである。PAN における、尿細管のミトコンドリア異常は過去に報告されているが、糸球体病変におけるミトコンドリア異常の検討はこれまでなかった。そこで、本研究では、PAN を発症した腎糸球体におけるミトコンドリア機能異常ならびに mtDNA 異常と FSGS 病変との関連を検討した。

### (方法)

ピューロマイシンアミノヌクレオシド (PA) の単回投与により惹起されるネフローゼ期と、反復投与によって惹起される FSGS 病変期の腎組織において以下の検討を行った。腎組織より、シービング法を用いて糸球体分画を得て、さらに糸球体分画からミトコンドリア分画を精製した。それぞれの糸球体ミトコンドリア分画において、mtDNA にコードされる cytochrome C oxidase のサブユニット I (COX I) 蛋白および核 DNA にコードされる COXIV 蛋白の発現量を、ならびに組織染色にてその局在を検討した。腎皮質組織ならびに糸球体分画から、DNA を抽出し、real-time PCR 法によって酸化刺激により形成される欠失変異型 mtDNA の比率ならびに正常 mtDNA 量の核 DNA 量に対する比率を算出した。また fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

法により mtDNA の糸球体内での経時的变化を観察した。さらに、mtDNA の複製を制御する mitochondrial transcription factor A (mtTFA) と nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) の各 mRNA の発現量を、RT-PCR 法にて検討した。

#### (結果)

COX I の発現量を COX I/COX IV でみると、ネフローゼ期の糸球体からの抽出ミトコンドリア分画内の COX I の発現量はコントロールと差はないが、FSGS 期糸球体では発現量が 45% 減少していた。糸球体からの抽出 DNA 内の欠失変異型 mtDNA は約 20 倍増加していたが、正常 mtDNA の 1% 未満であった。mtDNA コピー数はネフローゼ期に 240% に増加し、FSGS 期に 34% に減少していた。透過電子顕微鏡像においてポドサイト内に形態異常を伴うミトコンドリアの集簇を認め、FISH 法において FSGS 期のポドサイト内の mtDNA の減少を認めた。また、ネフローゼ期には mtTFA と NRF-1 mRNA の発現が増加しており、FSGS 期には mtTFA mRNA の発現が減少していた。

#### (考察)

ポドサイトは糸球体内の細胞中最もミトコンドリアの豊富な細胞として知られており、その機能維持に大量のエネルギー需要があると考えられている。今回の検討では FSGS 期ポドサイト内のミトコンドリアに形態異常を認め、さらに FSGS 期糸球体における COX I/COX IV の減少は、核 DNA ではなく mtDNA そのものの質的もしくは量的異常によると考えられた。従ってこのポドサイトにおける mtDNA 異常によるミトコンドリア機能異常が FSGS 病変の形成に関与しているものと推測された。そこで、PAN におけるポドサイト内の mtDNA 異常の原因を探るため、活性酸素種 (ROS) による mtDNA 障害としてすでに報告のある mtDNA の deletion mutation を調べたところ、糸球体抽出 DNA 中にその割合は明らかに増加していたが、全 mtDNA に対して 1% 未満であり、ミトコンドリア機能異常を惹起するまでの異常の蓄積は確認できなかった。一方、糸球体抽出 DNA 中の mtDNA のコピー数を調べたところ、ネフローゼ期に 240% に増加し、FSGS 期に 34% に減少していた。また、FISH 法にて mtDNA の減少はポドサイト内で強く起こっていることが確認された。mtDNA のコピー数は、その細胞のエネルギー需要に比例することから、ネフローゼ期の糸球体はポドサイトの機能維持のために増大したエネルギー需要に対応するために mtDNA が増加していると考えられた。しかし、FSGS 期には、この対応機構が破綻し mtDNA は減少し、ミトコンドリア機能異常の結果、ポドサイトにおいて十分なエネルギー供給が不能となっていることが推測された。この mtDNA のコピー数の増減は、mtDNA の複製調節の重要な因子である mtTFA や NRF-1 の mRNA 発現と一致していたが、これ以外の mtDNA の複製調節因子の存在が知られており、さらには PAN によるポドサイト障害とこれらの複製調節因子との関係など、今後更なる検討が必要と考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

ミトコンドリアの異常により腎組織において巣状糸球体硬化 (FSGS) 病変が形成されることが知られているが、そのメカニズムの詳細は知られていない。著者らはそのメカニズムを明らかにする目的で、FSGS 病変を形成する PAN を用いて、病変の形成とミトコンドリア障害の関係について解析した。その結果、ミトコンドリアの数の異常が、病変の形成に伴って認められることが示されたが、ミトコンドリアの遺伝子異常は、頻度は上昇するものの、病変形成に関与する程ではないことが明らかとなった。本研究は、ミトコンドリア異常と腎障害のメカニズムについて新たな知見を加えたもので、高く評価できる。

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。