

氏 名（本籍）                    なか            やま            けん            じ  
中            山            謙            二

学位の種類                    博            士            （医            学）

学位記番号                    医            第            3010            号

学位授与年月日                平成9年9月10日

学位授与の条件                学位規則第4条第2項該当

最終学歴                      昭和63年3月25日  
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目                腎におけるヘパラン硫酸 N-硫酸転移酵素の遺伝  
子発現と Puromycin aminonucleoside 腎症にお  
けるその変化

（主 査）

論文審査委員                教授 豊田隆謙            教授 佐藤徳太郎

教授 折笠精一

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

糸球体及びその培養細胞を用いて、ヘパラン硫酸の硫酸化の key enzyme であるヘパラン硫酸 N-硫酸転移酵素 (HSNST) の遺伝子発現を観察し、ヒト微少変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) のモデルであるラットの Puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症におけるその変化からネフローゼの発症機序について検討する。

## 【研究結果】

正常ラット腎皮質、腎髄質および皮質より単離調整した糸球体から RNA を抽出した Northern blot 法により解析したところ、Northern blot 上、肝と同じ 8.5Kb の位置にヘパラン硫酸 N-硫酸転移酵素 (HSNST) mRNA の発現が認められた。

ネフローゼ状態におけるその変化について検討するため 5 週齢の Wistar ラットを 5 匹ずつ 2 群に分け、1 群の腹腔内に PAN 150mg/kg を投与し、ネフローゼモデルを作製した (I-P 群)。他の 1 群には生理食塩水を投与し対照群とし (I-C 群)、それぞれ投与 10 日後にラットを屠殺した。さらにネフローゼ回復期の検討を目的として、同様に処理した PAN 投与群及び対照群の 2 群を投与 35 日後に屠殺した (II-P 群、II-C 群)。また PAN 投与前 (day 0) の状態を検討するために 5 週齢のラット 3 匹を屠殺した (day 0 群)。第 10 日、I-P 群の変化は MCNS に合致するものであり I-C 群、II-P 群、II-C 群には有意な変化は認められなかった。各群の単離糸球体より RNA を抽出、Northern blot 法により HSNST mRNA 発現を解析したところ、I-P 群の糸球体 HSNST mRNA の発現は、対照群に比して明らかに減弱しており、第 35 日では II-P 群は II-C 群と同様であった。GAPDH との比を求め比較すると、I-P 群での発現は対照群の 48 % と有意に減少していた。次にこの酵素の産物と考えられるヘパラン硫酸鎖中の N-硫酸化グルコサミンをモノクロナル抗体を用い間接蛍光抗体法にて検討した。day 0 群、I-C 群及び II-C 群では、糸球体ではボウマン嚢及び係蹄に沿って染色が認められ血管と尿細管の一部も染色された。一方、I-P 群では、糸球体係蹄に沿った N-硫酸化グルコサミンの染色性は対照群に比して減弱していた。II-P 群では染色性は対照群と同程度であった。

さらに培養糸球体細胞、特に上皮細胞における HSNST mRNA 発現と、それに対する PAN の影響を *in vitro* で検討した。糸球体上皮細胞 (GEC)、メサンギウム細胞 (GMC) は双方とも糸球体と同様に、8.5Kb の位置に HSNST mRNA を発現しており、GEC での発現は GMC のおよそ 3 倍であった。培地の FCS 濃度を 0.5% に置換し、同時に各種濃度の PAN を添加し 24 時

間培養した後の HSNST mRNA の発現は濃度依存性に低下が認められ、50ng/ml で未添加群の 77% の発現であった。なお各群で 48 時間培養後の細胞数及び細胞生存率に有意差は認められなかった。PAN 50ng/ml を添加し 3 時間および 24 時間後の HSNST mRNA 発現を比較すると PAN 未添加の場合の HSNST の発現は 3 時間培養より 24 時間で増加した。PAN 添加により HSNST の発現は各々の時間で未添加群に比して抑制され 24 時間でより強い抑制が認められた。

以上の研究により正常ラット腎皮質、髄質および単離糸球体において、ヘパラン硫酸 N-硫酸転移酵素 (HSNST) mRNA の発現が確認された。PAN 投与によるネフローゼ極期の糸球体における本酵素 mRNA の発現は、対照群の 48% に低下し、糸球体係蹄壁のヘパラン硫酸側鎖中の N-硫酸化グルコサミンは減少した。ネフローゼの回復期においては糸球体 HSNST mRNA の発現および係蹄壁の N-硫酸化グルコサミンは対照群と同様であった。培養 GEC は GMC に比して多くの HSNST mRNA を発現しており、その発現は培地への細胞毒性を示さない低濃度の PAN 添加により濃度依存性に低下した。これらの結果から PAN 腎症におけるネフローゼにおいては、GEC の HSNST 活性の低下によるヘパラン硫酸側鎖の硫酸化傷害がネフローゼの発症機序に関与していると考えられた。

#### 【研究の意義・独創的な点】

ヘパラン硫酸プロテオグリカンはそのヘパラン硫酸側鎖の硫酸基を主体とする陰性荷電により、糸球体基底膜の陰性荷電物質の主要成分であると考えられている。ヘパラン硫酸の硫酸化の key enzyme はヘパラン硫酸 N-硫酸転移酵素 (HSNST) であり、この酵素は腎においてもヘパラン硫酸の産生制御を司り Charge-barrier の形成や蛋白尿の病態生理に深く関わっていると考えられるが、腎におけるこの酵素の変動に関する研究は現在の所ほとんど認められない。本研究は始めて腎における HSNST の遺伝子発現を観察し、ラット PAN 腎症におけるその変化を *in vivo* および *in vitro* で検討し、ネフローゼの発症機序について新しい知見を得た。

## 審査結果の要旨

重要な腎疾患の一つであるネフローゼ症候群の診断及び治療を考える上では、糸球体から大量の蛋白が尿中へ漏出する機序を解明することが大切である。最近、尿蛋白の漏出には、糸球体係蹄における charge barrier の破綻が大きな役割を担っていると考えられている。すなわち、糸球体基底膜の両側に局在し、血清蛋白の主成分であるアルブミンの陰性荷電と反発し、基底膜におけるアルブミンの透過を抑制する陰性荷電物質が減少することが蛋白の漏出に関与していると考えられている。このような物質として最も有力なものの一つは、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan ; HSPG) である。この物質はコア蛋白とヘパラン硫酸側鎖からなっている。このうち、後者が強力な陰性荷電を有し係蹄壁の charge barrier に深く関わっているが、その生合成には硫酸化を司るヘパラン硫酸 N-硫酸転移酵素 (heparan sulfate N-sulfo transferase ; HSNST) が重要な役割を担っていると考えられる。すなわち、HSNST の異常は糸球体基底膜における陰性荷電の減少を招くとともに、アルブミンの透過性をきたすこととなる。したがって、様々な条件下でのこの酵素の変動を検討することは、蛋白尿の病態生理を解明する上で極めて有用と考えられるが、現在までのところその種の研究は認められない。

本研究は、実際に HSNST の腎における遺伝子発現とその異常がネフローゼ症候群の病因となる可能性を初めて示した研究である。まず、糸球体及びその培養細胞において HSNST の遺伝子発現を検討し、次に微小変化型ネフローゼ症候群の実験モデルであるラット puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症の極期と回復期に、遺伝子発現の変動を検討した。さらに、HSPG が糸球体上皮細胞 (glomerular epithelial cell ; GEC) で産生されると考えられること、及びネフローゼ症候群において GEC の変性が報告されていることから、培養 GEC に上記 in vivo 実験の血中濃度と同程度の微量濃度の PAN を添加し、HSNST 遺伝子発現の変動を直接 in vitro でも検討し、以下の結果が得られている。

(1) 糸球体及び培養糸球体上皮細胞、メサンギウム細胞で、HSNST の遺伝子発現が確認された。(2) PAN 腎症糸球体における HSNST 遺伝子発現は、ネフローゼ極期に低下し、回復期には対照群と同程度まで回復した。(3) 培養 GEC における HSNST 遺伝子発現は PAN 添加により濃度依存性に低下した。

これらの成績は、ネフローゼ症候群の発症機序や病態生理に関する全く新しい知見であり、従来異なった手法で研究されていた糸球体係蹄壁の charge barrier に関する様々な問題を解明する上でも極めて独創的で意義深い研究であり、学位論文として推薦できる。