

氏 名（本籍） さ 佐 とう 藤 かず 和 のり 則

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 9 5 7 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 5 年 3 月 2 4 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
（ 博 士 課 程 ） 医 科 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 核 受 容 体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 各アイソフォーム特異的抗体作成およびラット腎臓における PPAR タンパク発現の検討

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 伊 藤 貞 嘉 教 授 上 月 正 博

教 授 根 東 義 明

論文内容要旨

核受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は, retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成して DNA 上の PPAR 応答領域 (PPRE) に結合することにより, リガンド依存性の転写調節を行っている。PPAR には PPAR- α , PPAR- δ (β), PPAR- γ という 3 種類のアイソフォームが存在する。PPAR- α は肝臓における脂質代謝に, また PPAR- γ 1 およびその splicing variant である PPAR- γ 2 は脂肪細胞における細胞分化に重要な役割を担っている。さらに, フィブラート系抗高脂血症薬は PPAR- α の, トログリタゾン, ロシグリタゾンやピオグリタゾンをはじめとするチアゾリジン系インスリン抵抗性改善薬は PPAR- γ の, それぞれ外因性リガンドとして作用することが知られている。

近年, PPAR- α や PPAR- γ が腎臓において水電解質代謝に関わっている可能性があるという報告や, PPAR- γ が糖尿病や高血圧などによる糸球体障害に対し, 腎保護的に作用することが報告されるなど, 腎臓における PPAR の作用が注目されてきている。しかし, 腎臓における PPAR 各アイソフォームの発現およびネフロン局在に関してはいまだ不明の点が多い。そのため今回, 各アイソフォーム特異的な抗 PPAR 抗体を作成し, それらを用いて免疫組織化学法にて正常ラット腎臓における PPAR- α および- γ タンパクの発現およびネフロン局在を検討した。

ウサギに免疫し, 抗 PPAR- α 抗体 (PPAR- α タンパクを特異的に認識), 抗 PPAR- γ 1 γ 2 抗体 (PPAR- γ 1 および γ 2 タンパクを認識), PPAR- γ 2 抗体 (PPAR- γ 2 タンパクを特異的に認識) を作成した。ウエスタンブロット法, 免疫沈降法, ゲルシフト・スーパーシフト法による解析の結果, これらの抗体の特異性は非常に高いものであると判明した。正常ラット腎臓のウエスタンブロット解析および免疫染色では, PPAR- α は, 糸球体や近位尿細管, ヘンレのループ, 遠位尿細管, 集合管での発現が認められた。PPAR- γ 1 も, 糸球体や近位尿細管, ヘンレのループ, 遠位尿細管, 集合管における発現が認められた。PPAR- γ 2 は腎皮質, 腎髄質ともに発現が認められなかった。以上の結果より, 腎臓において広範囲に PPAR- α および- γ 1 タンパクが発現していることが明らかとなった。

今回我々は, PPAR- α , PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 に対するアイソフォーム特異的な抗体を作成した。ウエスタンブロット法, 免疫沈降法, ゲルシフト・スーパーシフト法の結果から, これらの抗体が非常に特異性が高いことが確認された。また PPAR- γ に関しては, これまでに PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 の両者を認識する抗体は報告されているが, 今回得られたような PPAR- γ 2 特異的な抗体に関しては殆ど報告されていないことから, 今回作成した抗体は種々の解析に非常に有用であると考えられた。今後, 腎臓における PPAR タンパクの機能解明が期待されるが, 本抗体はそれに対し非常に有用なものと考えられた。

審査結果の要旨

核受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は、retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成して DNA 上の PPAR 応答領域 (PPRE) に結合することにより、リガンド依存性の転写調節を行っている。PPAR には PPAR- α 、PPAR- δ (β)、PPAR- γ という 3 種類のアイソフォームが存在する。PPAR- α は肝臓における脂質代謝に、また PPAR- γ 1 およびその splicing variant である PPAR- γ 2 は脂肪細胞における細胞分化に重要な役割を担っている。さらに、フィブラート系抗高脂血症薬は PPAR- α の、トログリタゾン、ロシグリタゾンやピオグリタゾンをはじめとするチアゾリジン系インスリン抵抗性改善薬は PPAR- γ の、それぞれ外因性リガンドとして作用することが知られている。

近年、PPAR- α や PPAR- γ が腎臓において水電解質代謝に関わっている可能性があるという報告や、PPAR- γ が糖尿病や高血圧などによる糸球体障害に対し、腎保護的に作用することが報告されるなど、腎臓における PPAR の作用が注目されてきている。しかし、腎臓における PPAR 各アイソフォームの発現およびネフロン局在に関しては未だ不明の点が多い。そのため今回、各アイソフォーム特異的な抗 PPAR 抗体を作成し、それらを用いて免疫組織化学法にて正常ラット腎臓における PPAR- α および- γ タンパクの発現およびネフロン局在を検討した。ウサギに免疫し、抗 PPAR- α 抗体 (PPAR- α タンパクを特異的に認識)、抗 PPAR- γ 1 γ 2 抗体 (PPAR- γ 1 および γ 2 タンパクを認識)、PPAR- γ 2 抗体 (PPAR- γ 2 タンパクを特異的に認識) を作成した。ウエスタンブロット法、免疫沈降法、ゲルシフト・スーパーシフト法による解析の結果、これらの抗体の特異性は非常に高いものであると判明した。正常ラット腎臓のウエスタンブロット解析および免疫染色では、PPAR- α は、糸球体や近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管、集合管での発現が認められた。PPAR- γ 1 も、糸球体や近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管、集合管における発現が認められた。PPAR- γ 2 は腎皮質、腎髄質ともに発現が認められなかった。以上の結果より、腎臓において広範囲に PPAR- α および- γ 1 タンパクが発現していることが明らかとなった。

今回、PPAR- α 、PPAR- γ 1、PPAR- γ 2 に対するアイソフォーム特異的な抗体を作成した。ウエスタンブロット法、免疫沈降法、ゲルシフト・スーパーシフト法の結果から、これらの抗体が非常に特異性が高いことが確認された。また PPAR- γ に関しては、これまでに PPAR- γ 1、PPAR- γ 2 の両者を認識する抗体は報告されているが、今回得られたような PPAR- γ 2 特異的な抗体に関しては殆ど報告されていないことから、今回作成した抗体は種々の解析に非常に有用であると考えられた。今後、腎臓における PPAR タンパクの機能解明が期待されるが、本抗体はそれに対し非常に有用なものであると考えられた。最終審査の結果、学位に値するものと判定された。