

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 上田 浩平

アルドステロンは、本邦において患者数が増加傾向にある蛋白尿を伴う慢性腎臓病と塩分感受性高血圧の発症機序に関与する事が明らかにされつつある。本研究ではそのアルドステロンをリガンドとする核内受容体ミネラルコルチコイドレセプター (MR) に焦点をあて、その網羅的な DNA 結合プロファイルと標的遺伝子を明らかにすべく、蛋白尿発症に重要な糸球体足細胞と高血圧発症に重要な遠位尿細管細胞において全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) とマイクロアレイ解析を行ったものである。その結果を下記に示す。

1. 単離マウス糸球体における MR mRNA の発現が示された。
2. ヒト・マウス由来培養糸球体足細胞における MR の発現が mRNA・蛋白レベルで示された。同時にそのような MR がアルドステロンの投与により核内集積を来す事が示された。
3. ヒト由来培養糸球体足細胞 (HPC) とマウス由来培養遠位尿細管細胞 (mDCT) において強制発現された 3xFLAG-MR がアルドステロンの投与により核内集積を来し、かつ 3xFLAG-MR が 1%ホルムアルデヒドで固定された細胞サンプルからも抗 FLAG 抗体によって免疫沈降されることが示された。
4. ChIP-seq 解析により、3xFLAG-MR を強制発現した HPC と mDCT における MR 結合領域をそれぞれ 1150 箇所、4709 箇所同定した。それら MR 結合領域の近傍にある遺伝子はそれぞれ 1433 遺伝子、4451 遺伝子であった。
5. マイクロアレイ解析により、アルドステロンの投与によって MR 活性化を

介して mRNA 発現が上昇したと考えられる遺伝子を HPC と mDCT においてそれぞれ 186 遺伝子、385 遺伝子同定した。

6. ChIP-seq 解析とマイクロアレイ解析の双方において MR 標的遺伝子候補として、HPC と mDCT のそれぞれで 25 遺伝子、102 遺伝子が同定された。
7. HPC と mDCT における MR 標的遺伝子候補に対し逆転写定量的 PCR (RT-qPCR) 解析とクロマチン免疫沈降定量的 PCR (ChIP-qPCR) による検証を行い、mDCT において 5 種類 (Sgk1, Fkbp5, Tns1, Rasl12, Tsc22d3)、HPC において 3 種類 (Fgd4, Lipg, Rassf4) の遺伝子が MR 標的遺伝子として同定された。前者には高血圧発症に関わるナトリウム調節遺伝子、後者には蛋白尿発症に関わりうる GTPase 活性調節遺伝子が含まれていた。
8. HPC と mDCT の MR 結合領域に対し、HOMER を用いた転写因子結合モチーフ解析を行ったところ、両者においてグルココルチコイド結合配列 (GRE)、AP-1 結合配列の存在が示唆され、さらに AP-1 結合配列は GRE の近傍に存在する傾向が観察された。
9. HPC と mDCT それぞれの MR 結合領域近傍の遺伝子に関する gene ontology 解析を行ったところ、前者は炎症関連遺伝子、後者は細胞骨格関連遺伝子の近傍に MR 結合領域が比較的多く存在することが示唆され、動物・細胞種による MR 結合領域の調節が行われていることが示された。
10. MR と同じ DNA 配列に結合することができる他のステロイド受容体 (glucocorticoid receptor; GR, androgen receptor; AR, progesterone receptor) に関する ChIP-seq 解析の既報から得られた各ステロイド受容体の DNA 結合領域と、本研究で明らかとなった MR 結合領域を比較したところ、その領域の一致は各受容体結合領域の高々 4.2 %に留まり、MR が結合するゲノム領域の特異性が示唆されるとともに未知の DNA 結合調節因子の存在が示唆された。

以上、本論文は MR の網羅的な DNA 結合プロファイルと MR 標的遺伝子が 2 種類の腎上皮系細胞においてそれぞれ異なる事を明らかにし、本結果は腎臓の MR 活性化に伴う塩分感受性高血圧と蛋白尿という異なる病態の発症機序を説明するものであると考えられる。病態形成における MR の機能解析を今後進展させる基礎となることが期待される内容であり、学位の授与に値するものと考えられる。