

[ 別 紙 2 ]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 田村 幸太朗

---

近年マイクロアレイ法などの遺伝子発現解析技術が飛躍的に進歩して mRNA 総体の解析（トランスクリプトーム解析）が可能となり、疾患の予防や治療のための医薬品開発などへの活用が期待されている。トランスクリプトーム解析は、構造が比較的均質な臓器では実用レベルにいたっているが、腎のように生理学的機能が部位間で異なることに対応して構造が大きく異なる臓器に適用するには改善すべき点が未だ多い。申請者は、本研究で健常動物と病態モデル動物の腎を対象としてトランスクリプトーム解析法の開発をすすめ、その有用性を評価した。

はじめに、臓器の構造が比較的均質で先行知見が多いラットの肝 (*in vivo*) および初代培養肝細胞 (*in vitro*) を用いてトランスクリプトーム解析の信頼性と再現性を高くする採材法の改善をすすめた。この手法で3種類の peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  アゴニスト（高脂血症治療薬のクロフィブラート、ゲムフィブロジル、WY-14643）を処置すると脂肪酸  $\beta$  酸化に関連する acetyl-coenzyme A acyltransferase などの遺伝子が *in vivo* でも *in vitro* でも共に誘導されること、さらに32種類の市販薬について同様に調べたところ副作用として肝毒性があげられている尿酸排泄促進薬ベンズブロマロンや非ステロイド性抗炎症薬アスピリンなどの薬剤でも同様に脂肪酸  $\beta$  酸化に関連する遺伝子が誘導されることなどを明らかにし、トランスクリプトーム解析が医薬品の毒性や副作用予測に有用であることを示した。

ついで、健常動物を用いて臓器の構造が部位間で大きく異なる腎における信頼性の高いトランスクリプトーム解析法の開発をすすめた。すなわち、mRNA の変性が最小となるように腎スライス作製法を改善し、全腎および皮質、髄質と乳頭の各部位のトランスクリプトームデータを比較した。まず、臓器構造が均質な肝のトランスクリプトームデータは mRNA 総発現量が標本間で均一であるという前提で全遺伝子発現レベルの中央値を標本間でそろえて補正する global normalization 法にて解析されてきたが、この方法は腎のように mRNA の総発現量が部位間で大

大きく異なる臓器には不適切であることを示した。つぎに、標本中の細胞数を代表するものとして DNA 量を測定後、これを基準にして外部標準 mRNA（スパイク mRNA）を標本に添加してからトランスクリプトーム解析を行う percellome normalization (PN) 法の最適化をおこなった。これによって 1 細胞あたりの mRNA コピー数が算出できることとなったので、部位間で発現する遺伝子量の詳細な解析が可能となり、腎の最も重要な機能である内因性や外因性の様々な物質の輸送を担うトランスポーター群遺伝子や物質代謝を担う酵素群遺伝子の部位間での特徴的発現プロファイルを示すことができた。

最後に、PN 法によるトランスクリプトーム解析の有用性を遺伝性ネフローゼモデル (ICR-derived glomerulonephritis: ICGN) マウスを用いて評価した。ICR マウスの突然変異体である ICGN マウスでは加齢にともなってネフローゼが進行する。この病因のひとつとして tensin2 遺伝子の変異があげられているが、他の要因については未解明である。健常 ICR マウスと病態 ICGN マウスの腎の部位別に遺伝子発現レベルを比較したところ、ICGN マウスでは糸球体が豊富な皮質部位に補体系因子 complement component 1, s subcomponent の遺伝子の発現の異常が見いだされた。この補体系因子は糸球体病変を主徴とするヒトループス腎炎の発症に関連するとの臨床報告があり、ICGN マウスがループス腎炎モデルとして有用であることを示唆する知見である。このように腎におけるトランスクリプトーム解析に PN 法が有用であることを示した。

以上のように本研究で申請者が開発をすすめた PN 法によって、これまで困難であった部位間で構造が異なる腎におけるトランスクリプトーム解析が可能となり、疾患の病因解明や医薬品の研究開発に有効に利用され得ることがわかった。申請者が開発したトランスクリプトーム解析の信頼性と再現性を高めた採材法、臓器構造が部位間で異なる腎のトランスクリプトーム解析法および病態モデル動物を用いたその有用性の実証をまとめた本論文の研究成果は、学術上、応用上寄与するところが少なくないので、審査委員一同が本論文について、博士（農学）を授与するにふさわしいと判断した。