

氏名・(本籍)	仲川孝彦(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第284号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学位論文題目	Distribution of heparin-binding EGF-like growth factor protein and mRNA in the normal rat kidneys (ラット正常腎臓におけるheparin-binding EGF-like growth factor蛋白およびmRNAの局在)

審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
	副査 教授	岡田 裕 作
	副査 教授	吉川 隆 一

論文内容の要旨

【目的】

Epidermal growth factor (EGF) は、広範な種類の細胞に対し種々の作用を示す強力な生理活性物質である。腎臓におけるEGFの役割については数多くの報告がなされているが、いまだ十分な機能解明はされていない。正常腎臓において、EGFはヘンレループ上行脚、遠位尿細管の尿細管管腔側に存在し、そのレセプターであるEGFレセプターは近位尿細管、遠位尿細管および集合管の基底膜側に存在するとされている。すなわちEGFとEGFレセプターはネフロンにおけるそれらの局在が異なる。特に、近位尿細管上皮細胞にはEGFレセプターが存在するにもかかわらず、EGFは存在しないため、どのような経路でEGFが近位尿細管に到達するのかということが疑問とされていた。

近年、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) がEGFファミリーのメンバーの一つをして同定された。HB-EGFは、その構造内にヘパリン結合ドメインとEGF様ドメインを持ち、EGFレセプターに結合する。また正常腎臓でHB-EGF mRNAが発現することも報告されている。したがって、HB-EGFが腎尿細管に発現するEGFレセプターの重要なリガンドである可能性が考えられるが、HB-EGFの機能や局在については未だ解明されていない。そこで本研究では、正常腎臓におけるHB-EGFの局在を、蛋白およびmRNAレベルで明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. Male Wistar rats (Kyoto strain: 300-350 g) の両側の腎臓をmethy 1 Camoy液に浸透固定し、パラフィン切片を作製した。
2. HB-EGF蛋白の局在を免疫組織化学を用いて検討した。方法はABC法を用い、DABにて発色した。抗体はpro HB-EGFを認識するpolyclonal抗体を用い、また、抗体の特異性を調べるため吸収試験を施行した。
3. *in situ* hybridization法を用いてHB-EGF mRNAの局在を検討した。ジゴキシゲニンで標識したriboprobes (sense probe, anti-sense probe) を用い、hybridizationの条件を48°C、一晚とした。また、probの特異性を調べるため、競合試験を施行した。
4. HB-EGFの尿細管における局在を明確にするため、Tamm-Horsfall蛋白 (THP) および Peanut agglutinin (PNA) に対する免疫組織化学を用い、尿細管の部位を同定した。

【結果】

免疫組織化学

1. 近位尿細管の上皮細胞に免疫反応陽性物質が認められたが、糸球体、遠位尿細管、集合管には認められなかった。
2. 遠位尿細管および集合管のマーカーであるTHPと、近位尿細管曲部、遠位尿細管および集合

管のマーカーであるPNAについての免疫組織化学を行うことにより、HB-EGFの発現が近位尿細管全域の上皮細胞に認められることを確認した。

3. 強拡大像では、免疫反応物質は近位尿細管上皮細胞刷子縁に認められた。近位尿細管S 3部では一部の上皮細胞の細胞質にも陽性所見が認められた。
4. 小動脈の一部の平滑筋細胞や内皮細胞にも陽性所見を認めた。

In situ hybridization

1. 弱拡大像にて主として髄質外層外帯にmRNAの発現を認め、皮質および髄質外層内帯や髄質内層には認めなかった。
2. 強拡大像では、近位尿細管(S 3)上皮細胞の細胞質に陽性所見を認めたが、集合管は陰性であった。

【考 察】

本研究で、正常腎臓では主として近位尿細管上皮細胞にHB-EGFの蛋白およびmRNAが発現していることを明らかにした。HB-EGF蛋白の発現が近位尿細管全域(S 1～S 3部)に認められるのに対し、mRNAはS 3部のみに認められた。この違いは、用いた2つの方法の感度の違いが原因であると思われる。あるいは、腎臓内の小動脈で産生された蛋白が近位尿細管S 1～S 2部上皮細胞に取り込まれた可能性も考えられた。EGFが培養近位尿細管細胞の増殖促進因子として作用すること、およびEGFペプチドを急性腎不全モデルラットに投与すると障害尿細管上皮細胞の再生が促されることが報告されている。これらの細胞ではEGFレセプターの発現も示されているが、EGFの産生は認められていない。以上の事実を考慮すると、今回の研究で示された近位尿細管上皮細胞に発現するHB-EGFがこれらの細胞のEGFレセプターの重要なリガンドであるという可能性が示唆された。現在、HB-EGFの生理学的な機能は不明であるが、EGFが培養線維芽細胞においてNa⁺/H⁺交換を刺激することが報告されていることより、HB-EGFが近位尿細管のイオン交換に関与していると考えられる。

【結 論】

腎臓において、HB-EGFは主に近位尿細管上皮細胞や小動脈平滑筋細胞および内皮細胞で発現していた。HB-EGFが近位尿細管でのEGFレセプターの重要なリガンドとして機能する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ラット正常腎臓におけるHeparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) の局在を明らかにするため、HB-EGF蛋白およびmRNAの局在を検討し、以下の結果が得られた。

- 1) HB-EGF蛋白は近位尿細管上皮細胞に認められた。
- 2) 小動物の平滑筋細胞や内皮細胞にもHB-EGF蛋白が認められた。
- 3) HB-EGFmRNAの発現は近位尿細管上皮細胞S 3部に認められた。

以上の研究は、正常腎臓の機能を明らかにする上で重要な意味を持つものであると考えられる。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。