

氏 名 小野 真也

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第769号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成29年 3月10日

学 位 論 文 題 目 Protein O-GlcNAcylation is essential for foot process maturation and survival in podocytes

(タンパク質のO-GlcNAc修飾は糸球体上皮細胞(ポドサイト)足突起の発達及び生存に重要な役割を担う)

審 査 委 員 主査 教授 堀江 稔

副査 教授 古荘 義雄

副査 教授 河内 明宏

論文内容要旨

※整理番号	776	(ふりがな) 氏名	おの しんや 小野 真也
学位論文題目	Protein O-GlcNAcylation is essential for foot process maturation and survival in podocytes (タンパク質の O-GlcNAc 修飾は糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 足突起の発達及び生存に重要な役割を担う)		
【目的】 糸球体上皮細胞 (以下ポドサイト) は、その特徴的な足突起構造によって高分子物質の尿中喪失を阻止し糸球体ろ過バリアの維持に重要な役割を担っており、その機能障害は尿タンパク出現の原因となる。また、タンパク質の翻訳後修飾は細胞機能制御に不可欠な機構であり、ポドサイトにおいても、リン酸化などの翻訳後修飾の変化が高度尿タンパクの出現や足突起構造の異常に関わることが知られている。細胞内及び核内のタンパク質に N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を付加する O-GlcNAc 修飾は翻訳後修飾の一つであるが、ポドサイトにおける役割は知られていない。そこで本研究では、ポドサイトにおける O-GlcNAc 修飾の役割の解明が、新たなポドサイト機能制御機構の解明につながるとの仮説を立て、GlcNAc 修飾酵素である O-GlcNAc transferase (OGT) タンパクをコードする <i>Ogt</i> 遺伝子を、先天的及び後天的にポドサイト特異的に欠損させた二つのマウスモデル作製し、それらの腎表現系解析を行った。			
【方法】 Cre-loxP システムを用いてポドサイト特異的 <i>Ogt</i> 遺伝子欠損マウスを作製し以下を検討した。 ① 先天的ポドサイト特異的 <i>Ogt</i> 遺伝子欠損マウス (<i>Pod-Ogt^{fl/fl}</i>) における腎障害の検討: 対照マウス (<i>Ogt^{fl/fl}</i>) と <i>Pod-Ogt^{fl/fl}</i> マウスを 32 週間飼育し、経時的に尿中アルブミン排泄の定量を行った。腎組織学的評価として、光学顕微鏡による硬化糸球体・炎症細胞浸潤の評価、電子顕微鏡による足突起構造の観察を行った。蛍光免疫染色を用いたポドサイト障害の評価として、ポドサイトスリット膜タンパクであるポドシンの発現量及び染色パターンの確認、ポドサイト特異的核タンパクである WT1 陽性細胞数の計測を行った。 ② タモキシフェン (TM) 誘導性ポドサイト特異的 <i>Ogt</i> 遺伝子欠損マウス (<i>TM-Pod-Ogt^{fl/fl}</i>) における腎障害の検討: 後天的に <i>Ogt</i> 遺伝子欠損を誘導するために、8 週齢の <i>Ogt^{fl/fl}</i> と <i>TM-Pod-Ogt^{fl/fl}</i> マウスに対して、TM の腹腔内投与 (150mg/kg/day) を 5 日間行った。一部のマウスは TM 投与後 2 週時点で腎臓を摘出し、O-GlcNAc 特異抗体 (RL2) と WT1 の二重免疫染色を用いて遺伝子欠損効率を評価した。TM 投与後 32 週間飼育し、①と同様の腎表現系を解析した。 ③ <i>Pod-Ogt^{fl/fl}</i> マウスにおける Bis-T-23 の足突起障害抑制の検討: ダイナミンのアクチン依存性オリゴマー形成とアクチン重合を促進させ、足突起進展に働く小分子 Bis-T-23 を <i>Pod-Ogt^{fl/fl}</i> マウスに投与し、尿中アルブミン排泄量の増加抑制、及び足突起構造異常の抑制が得られるかを検討した。対照群 (<i>Ogt^{fl/fl}</i> , Bis-T-23 非投与)、非治療群 (<i>Pod-Ogt^{fl/fl}</i> , Bis-T-23 非投与)、治療群 (<i>Pod-Ogt^{fl/fl}</i> , Bis-T-23 投与) の 3 群において、生後 3 週齢から 6 週齢まで、			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

非治療群には Bis-T-23 の溶解に用いたジメチルスルホキシド (DMSO) を、治療群には Bis-T-23 (20mg/kg) を腹腔内に投与し、16 週齢で尿中アルブミン排泄の定量及びポドサイト障害を評価した。

【結果】

- ① Pod-Ogt^{+/+}マウスでは生後 8 週齢から尿中アルブミン排泄量が増加し (107±8.4µg/mg vs Ogt^{+/+}マウス 37±10µg/mg)、32 週齢で著明な尿中アルブミン排泄量の増加 (642±74µg/mg vs Ogt^{+/+}マウス 12±3.7µg/mg) を認めた。Pod-Ogt^{+/+}マウスの腎組織では硬化糸球体・炎症細胞浸潤、ポドシンの発現量低下及び顆粒状染色パターン、WT1 陽性細胞数の減少 (ポドサイトロス)、ポドサイト二次突起の消失、ポドサイト足突起の平坦化が確認され、著しい足突起構造の破綻が確認された。
- ② TM 投与後 2 週時点での腎組織における RL2 及び WT1 共陽性細胞数測定から、TM-Pod-Ogt^{+/+}マウスの遺伝子欠損効率は 92.8±0.6%であった。TM-Pod-Ogt^{+/+}マウスは TM 投与後 32 週まで尿中アルブミン排泄量の増加を認めなかった。腎組織では Pod-Ogt^{+/+}マウスと比べ、軽微な足突起構造の変化を認めたが、先天的モデルのような顕著なポドサイト障害は認めなかった。
- ③ Bis-T-23 非治療群の Pod-Ogt^{+/+}マウスは著明な尿中アルブミン排泄量の増加 (256±56µg/mg vs Ogt^{+/+}マウス 15±3.5µg/mg) 及びポドシン発現量の低下、足突起構造の破綻を認めたが、Bis-T-23 治療により Pod-Ogt^{+/+}マウスの尿中アルブミン排泄量は有意に減少し (76±21µg/mg vs Ogt^{+/+}マウス 15±3.5µg/mg)、ポドシン発現量の低下及び足突起構造異常も認めなかった。

【考察】

先天的ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスでは、著明な尿中アルブミン排泄量の増加、足突起構造の破綻、ポドサイト数減少が認められたが、後天的 Ogt 遺伝子欠損マウスでは、尿中アルブミン排泄量の増加が認められず、足突起構造異常が軽微であった。これらの結果より、翻訳後修飾の一つ O-GlcNAc 修飾が、ポドサイトの機能制御に不可欠なものであり、特に出生後のポドサイト足突起の発達過程に重要である可能性が示された。また、出生から成体に至るまでのポドサイト足突起の発達過程において、Bis-T-23 治療を行った Pod-Ogt^{+/+}マウスが高度アルブミン尿及び足突起構造異常に至らなかったことから、O-GlcNAc 修飾のポドサイト細胞骨格タンパクへの関与が示唆された。本研究では、ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損から足突起構造異常に至る具体的機序や、ポドサイトにおける OGT 標的タンパクの同定には至らなかった。腎臓においては、1000 以上のタンパクが OGT による O-GlcNAc 修飾を受けると報告されており、今後、細胞骨格タンパクを含むポドサイト機能制御に関わる OGT 標的タンパクの探索が必要である。

【結論】

タンパク質の O-GlcNAc 修飾は、出生後のポドサイト足突起の発達過程において重要な役割を担っており、正常糸球体ろ過バリアの形成に不可欠である。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	776	氏名	小野 真也
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、糸球体上皮細胞 (以下、ポドサイト) における OGT によるタンパク質の O-GlcNAc 修飾の生理的役割を明らかにするために、先天的及び後天的ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスとポドサイト足突起の伸展効果を持つ Bis-T-23 を用いて、尿中アルブミン排泄量やポドサイト障害の有無について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 先天的ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスは、尿中アルブミン排泄量の増加、ポドサイト足突起構造の著しい破綻及びポドサイト数減少を認め、高度ポドサイト障害を呈した。2) タモキシフェン投与により 8 週齢時点で Ogt 遺伝子欠損を誘導させた、後天的ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスは、尿中アルブミン排泄量は増加せずポドサイト足突起構造の変化は軽度であり、明らかなポドサイト障害を認めなかった。3) 先天的ポドサイト特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスは、ポドサイト足突起の発達過程における Bis-T-23 の投与により、尿中アルブミン排泄量の増加が抑制されポドサイト障害を認めなかった。 <p>本論文は、出生後のポドサイト足突起の発達過程において、OGT による O-GlcNAc 修飾が重要な役割を担っていることを明らかにし、ポドサイト機能に関わる細胞制御機構について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 572 文字) (平成 29 年 1 月 23 日)</p>			