

論文内容要旨

論文題目

Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte

Ephrin-B1 は腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）のスリット膜に存在する

責任分野： 小児医科学 分野

氏 名： 橋本 多恵子

【内容要旨】 (1,200 字以内)

【緒言】腎糸球体における蛋白透過を防ぐバリアーに関して、今まで多くの議論がなされてきたが、1998年、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子が同定され、その遺伝子産物は腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の足突起が形成するスリット膜構成蛋白のネフリンであると報告されて以降、ネフローゼ症候群／糸球体硬化症の原因遺伝子産物の多くがスリット膜に局在することが判明している。

Eph は、そのリガンドである ephrin とともにチロシンキナーゼ受容体の中で最大のグループを形成しており、発生期における神経回路網や血管網の形成、成獣では記憶学習や免疫応答などにも関わることが知られていたが、近年消化管や尿細管などの各種上皮細胞における発現が報告され、その形態維持や、透過性の制御機能を持つことが報告されている。

以上により、我々は、ポドサイトにおける Eph-ephrinB ファミリーの発現を検討し、その局在、機能に関する検討を行うこととした。

【方法と結果】ラット糸球体と培養ポドサイトから採取した mRNA における Eph-ephrinB ファミリーの発現を rt-PCR 法で検討し、EphB1, EphB2, ephrin-B1, ephrin-B2 の発現を確認した。抗ネフリン抗体誘導性蛋白尿モデルラットを作製し、発現を確認した4分子に関して蛋白尿発症直後の糸球体 mRNA を定量したところ、ephrin-B1 が著減していたため、蛋白尿発症に関与している可能性を最も疑い、ephrin-B1 の局在、機能に関する詳細な検討を行った。

Western blot 法と免疫蛍光抗体法による解析では、ephrin-B1 は腎糸球体に発現しており、免疫蛍光二重染色ではスリット膜構成分子のネフリンと CD2-associated protein (CD2AP) と共存していた。発達過程の糸球体においては、capillary-loop stage の後期からネフリンと共存した。免疫電子顕微鏡での解析では ephrin-B1 は足突起に発現していた。免疫沈降法では、ephrin-B1 はネフリンと共沈していた。培養ポドサイトにおいて、ephrin-B1 の mRNA をノックダウンすると、免疫蛍光抗体法で ephrin-B1 と放射線状に共存していた CD2AP が、核周囲へと分布の変化を示した。

【考察】ephrin-B1 はポドサイトの足突起に発現していた。また、ephrin-B1 は蛋白尿発症時に発現が低下すること、スリット膜分子であるネフリンや CD2AP と機能的に関係していることより、スリット膜の濾過障壁機能の維持、蛋白透過性の制御に関わっている可能性が示唆された。新たなスリット膜関連分子の発見は蛋白尿発症機序の解明に新たな一歩を踏み出すものとなると考えられるため、今後更なる機能の解析が必要と思われる。




山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 橋本 多恵子

論文 題目： Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte
(Ephrin-B1 は腎糸球体上皮細胞 (ポドサイト) のスリット膜に存在する)

審査 委員：

主査 後藤 薫 
副査 山川 光徳 
副査 富田 善寿 

審査終了日：平成20年1月15日

論文審査結果要旨

現在、腎糸球体における蛋白透過を防ぐバリアーに関して、ネフリンを始めとしたネフローゼ症候群／糸球体硬化症の原因遺伝子産物の多くがスリット膜に局在することが判明している。Eph は、そのリガンドである ephrin とともにチロシンキナーゼ受容体の中で最大のグループを形成しており、発生期における神経回路網や血管網の形成、成獣では記憶学習や免疫応答などにも関わることが知られている。近年さらに、消化管や尿細管などの各種上皮細胞における発現も報告されたが腎糸球体における局在や機能は未だ不明である。

本研究において橋本氏は、ポドサイトにおける Eph-ephrinB ファミリーの局在、機能に関する解析を行い、以下の知見を得た。

- (1) 抗ネフリン抗体誘導性蛋白尿モデルラットを作製し EphB1, EphB2, ephrin-B1, ephrin-B2 の mRNA 発現を検討したところ、蛋白尿発症直後の糸球体において ephrin-B1 が著減していた。
- (2) Western blot 法と免疫蛍光抗体法により、ephrin-B1 は腎糸球体においてスリット膜構成分子のネフリンと CD2-associated protein (CD2AP) と共存を示した。
- (3) 免疫電子顕微鏡解析により、ephrin-B1 は足突起に局在が認められた。
- (4) 免疫沈降法により、ephrin-B1 はネフリンと共沈した。
- (5) 培養ポドサイトにおいて ephrin-B1 の mRNA をノックダウンすると、ephrin-B1 と放射線状に共存していた CD2AP の細胞内局在が変化した。

以上の結果より橋本氏は、ephrin-B1 がポドサイトの足突起に発現する新規スリット膜関連分子であることを明らかにし、その発現減少が蛋白尿発症と関連する可能性を示唆した。

本研究は、ephrin-B1 が新しい腎糸球体スリット膜関連分子であることを明らかにし、腎糸球体における蛋白透過を防ぐバリアー機構の解明に大きく貢献していると考えられるので、学位審査委員会は本研究が博士 (医学) の授与に値するものと判定した。