

Title	Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis
Sub Title	可逆性および不可逆性抗Thy-1腎炎モデルのマイクロアレイ解析
Author	辻, 美保子
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.15-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0015">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0015</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis

(可逆性および不可逆性抗Thy-1腎炎モデルのマイクロアレイ解析)

辻 美保子

## 内容の要旨

末期腎不全から血液透析などの腎代替療法を必要とする患者は年々増加し続けている。その主要な原疾患である糖尿病性腎症や慢性糸球体腎炎では進行性の腎機能低下を認め最終的に末期腎不全にいたる。しかしながら進行性腎障害の共通像である糸球体硬化や尿細管間質線維化の機序は充分には解明されていない。我々は進行性腎障害の進展に関わる分子機構を解明することを目的とした。

抗Thy-1モノクローナル抗体1-22-3 (mAb 1-22-3) を静脈内投与すると可逆性のメサンギウム増殖性糸球体腎炎(可逆性抗Thy-1腎炎)が惹起される。これに対して片腎摘出後に抗体を投与すると腎障害は遷延し、進行性の糸球体硬化、尿細管間質変化が不可逆性に進行する。近年、遺伝子発現差異の検討を目的とした技術開発が盛んであるが、特にcDNA/オリゴヌクレオチドマイクロアレイは一度に何千もの遺伝子発現プロファイルの作成を可能にし、生物学的パスウェイに重要な遺伝子の同定および新規遺伝子の機能的解析を行う上で有用である。不可逆性に進展する進行性腎障害において重要な役割を果たす遺伝子を同定するために、これら2つのモデル間での遺伝子発現差異をマイクロアレイ解析により検討した。

6週齢のWistarラットに片腎摘出、もしくは偽手術をおこない1週間後にmAb 1-22-3を投与して不可逆性および可逆性Thy-1腎炎モデルを各々を作製し、抗体投与後4、7、14、42、56日後に屠殺した。腎臓より抽出したmRNAを用いてcDNAプローブを作製し4854種類の遺伝子がプリントされたオリゴヌクレオチドマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。その結果、両モデル間での遺伝子発現に2倍以上差のあった遺伝子数は189個であり、これらは各遺伝子の発現パターンにより5つのクラスターに分類された。この中で、不可逆性モデルにおいて強く発現した遺伝子で構成されるクラスターにはosteopontin、kidney injury molecule-1、thymosin  $\beta$ 10が含まれていた。定量的PCRの結果から、これらの遺伝子は正常腎臓においてほとんど発現を認めないが、不可逆性モデルにおいては可逆性モデルと比べてより強い発現を認めた。また免疫組織染色の結果からthymosin  $\beta$ 10は主に線維化した尿細管間質のマクロファージに強く発現していた。

可逆性および不可逆性Thy-1腎炎モデル間での遺伝子発現差異をマイクロアレイ解析で検討し、腎疾患の進行に関わる分子機構を検討した。マクロファージの遊走因子であるosteopontinやthymosin  $\beta$ 10の発現上昇からマクロファージの浸潤や活性化が腎疾患の進展に重要な役割を担うことが推察された。さらなる解析により腎障害進展機序の本質に迫ることが出来ると思われる。

## 論文審査の要旨

進行性腎障害の共通像である糸球体硬化や尿細管間質線維化の機序は充分には解明されていない。そこで進行性腎障害の進展に関わる分子機構を解明することを目的として本研究は行われた。抗Thy-1モノクローナル抗体1-22-3 (mAb 1-22-3) の静脈内投与により可逆性の糸球体腎炎が惹起されるが、片腎摘出後に抗体を投与すると進行性の糸球体硬化、尿細管間質変化をとともう不可逆性腎炎モデルが作製される。進行性腎障害において重要な役割を果たす遺伝子を同定するために、この2つのモデル間での遺伝子発現差異をマイクロアレイ解析で検討した。その結果、2群間の遺伝子発現に2倍以上差のあった遺伝子は189個あり、各遺伝子の時間的経過に伴う発現パターンにより5つのクラスターに分類された。この中で、不可逆性モデルにおいて強く発現した遺伝子で構成されるクラスターにはosteopontin、KIM-1、thymosin  $\beta$ 10などが含まれていた。Thymosin  $\beta$ 10は主に線維化した尿細管間質のマクロファージに強く発現し、片側尿管結紮モデルにおいても発現上昇を認めた。Thymosin  $\beta$ 10は活性化したマクロファージを介し腎線維化に関与し腎疾患の進展に重要な役割を担うことが示唆された。

審査ではまず、遺伝子発現差を検討する手法として選択したマイクロアレイ解析について、個体により誤差範囲が大きくなりうること、ラットマイクロアレイはスライドに掲載される遺伝子数が総ゲノム数と比較して少ないことなど、スクリーニングを行う上でのマイクロアレイの問題点について指摘がなされた。またマイクロアレイ解析の実験デザインとして本研究ではThy-1抗体投与直後の遺伝子発現差を解析していないが、この時期すでに発現差が生じている可能性があり、検討することが望ましかったとの助言がなされた。

次に解析の結果に関連して、発現差のある遺伝子数が尿蛋白や組織所見にほとんど差を認めない初期において多く、これらに著明な変化が現れる後期において少ないことへの意味づけについて質問がなされた。これに対して初期の遺伝子発現差が疾患の不可逆性を決定づけている可能性があると考えられ、このことは不可逆性Thy-1腎炎モデルにおいて病初期に治療した場合においては、その後の硬化性病変が有意に抑制されたとする報告からも支持されるとの回答がなされた。続いて免疫組織染色を用いた検討で、Day4、Day7など初期での、可逆性モデルにおけるThymosin  $\beta$ 10の発現パターンについて質問がなされた。不可逆性モデルにおいては尿細管間質のマクロファージに発現を認めたが、可逆性モデルにおいてはほとんど発現を認めなかったと回答がなされた。これに対しThymosin  $\beta$ 10の進行性腎障害における臨床的な意義付けをするために、不可逆性モデルを用いてThymosin  $\beta$ 10の機能抑制を行うなど、in vivoにおける検討を行うことが望ましいとの助言がなされた。

以上のように、本研究はin vivoにおける機能解析など、今後検討されるべき課題を残しているものの、進行性腎疾患の進展に関わる遺伝子としてThymosin  $\beta$ 10を同定し、その局在性を明らかにしており、進行性腎障害進展のメカニズム解明に有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫  
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典  
分子生物学 清水 信義  
学力確認担当者：  
審査委員長：村井 勝

試問日：平成18年 1月12日