

## 機関リポジトリ登録用論文の要約

成田 育代	病態制御科学領域腎臓病態内科学教育研究分野 氏名 成田 育代
<p>(論文題目) <b>NF-<math>\kappa</math>B-dependent increase in tissue factor expression is responsible for hypoxic podocyte injury</b> (NF-<math>\kappa</math>B 活性化に伴う組織因子の発現増強は低酸素状態におけるポドサイト傷害に関与する)</p>	
<p>(内容の要約)</p> <p>背景：組織因子（Ⅲ因子：TF）は外因系凝固カスケードの起点であり凝固のみならず細胞増殖、炎症の惹起など様々な生理活性があることが知られている。また、<b>tissue factor pathway inhibitor (TFPI)</b> は TF の阻害因子であり、TF の作用は TFPI とのバランスによって調整されている。腎糸球体におけるフィブリンの沈着は、腎炎など様々の腎障害においてしばしば見られ腎障害に寄与すると考えられている。我々は、これまでメサンギウムや尿細管細胞など腎臓の固有細胞において TF や TFPI の発現がみられることは報告してきた。</p> <p>低酸素障害は、動脈硬化の進行に伴う種々の臓器障害に共通してみられる現象である。また、腎臓は多臓器に比べて血流量が多いが、酸素供給は糸球体毛細血管と尿細管周囲毛細血管という 2 つの血管床に由来し、伴走する動静脈にシャント経路が数多く存在するため特に尿細管間質では低酸素に陥りやすい。これまでに尿細管間質障害と低酸素の関与については、数多く研究されてきた。一方、腎臓上皮細胞（ポドサイト）傷害と低酸素の関わりについては、最近いくつか報告が見られる程度である。</p> <p>低酸素障害における TF の役割については、主にガン細胞において研究が進んでおり、低酸素刺激により TF の発現の増加が見られ、炎症惹起や細胞増殖などに関与することが知られている。</p> <p>今回我々は、ポドサイトにおいて低酸素下に TF の発現が誘導され、ポドサイト傷害に関与するという仮説のもとヒト培養ポドサイトを用いた検討を行った。</p>	
<p>方法：33 度で増殖、37 度で分化するヒト培養ポドサイトを使用し、それぞれ定常酸素状態、低酸素状態（1%）にて刺激をした。低酸素状態を模倣する実験系として塩化コバルト刺激も行った。TF および TFPI の mRNA の発現は定量 RT-PCR 法を用い、細胞における TF、上清の TFPI の蛋白質については ELISA 法を用いた。また、EGR-1 や HIF-1<math>\alpha</math>、NF-<math>\kappa</math>B などの転写因子が関与しているかを調べるために small interfering RNA (siRNA) を使用し EGR-1、HIF-1<math>\alpha</math> を一時的に knockdown した。NF-<math>\kappa</math>B においてはその阻害薬である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) を用いてそれぞれ TF および TFPI の発現を測定した。TF、HIF-1<math>\alpha</math>、NF-<math>\kappa</math>B p65 の局在については蛍光免疫染色でも確認した。NF<math>\kappa</math>B p65 の活性化については核と細胞質を分離するキットを用いて分離し、それぞれウエスタンブロット法で確認した。また、低酸素によるポドサイト傷</p>	

害と TF の関連についてはポドサイトのスリット膜関連蛋白である CD2-associated protein (CD2AP) の mRNA の発現とファロイジン染色にて確認した。

結果：低酸素刺激により TF mRNA の発現は 6 時間では  $2.3 \pm 0.05$  倍 ( $p < 0.001$ ) 24 時間では  $5.6 \pm 2.4$  倍 ( $p < 0.05$ ) と有意に増加し、TFPI mRNA は 6 時間で  $0.54 \pm 0.04$  倍 ( $p < 0.05$ )、24 時間で  $0.24 \pm 0.06$  倍 ( $p < 0.001$ ) と有意に抑制された。蛋白質の発現についても同様の結果であった。TF の免疫染色では低酸素刺激により核周囲に発現が亢進した。また低酸素ストレス応答に中心的な役割を果たす HIF-1 $\alpha$  は低酸素刺激時には核内に移行が認められ活性化を示しており、HIF-1 $\alpha$  siRNA では低酸素における TF mRNA の発現をさらに増加させた。これは通常状態では HIF-1 は TF に対して抑制的に作用している可能性を示唆する結果であった。一方、リン酸化 NF- $\kappa$ B p65 も低酸素刺激時には核内に発現が増強し活性化を示した。NF- $\kappa$ B 阻害薬である PDTC を用いると低酸素による TF の発現を有意に抑制したため、ポドサイトにおける低酸素による TF の発現は NF- $\kappa$ B 経路を介していることが確認できた。EGR-1 siRNA は TF の発現を変化させなかった。また低酸素刺激はポドサイト傷害を示唆する CD2AP の発現減少とアクチン再構成をきたした。それらの変化は TF siRNA にて TF の遺伝子を knockdown すると改善したことから、低酸素におけるポドサイト障害には TF が関与していると思われる。

結論：低酸素により、アクチンの再構成、ポドサイトのスリット膜関連蛋白の減少といったポドサイト傷害が確認された。同時にポドサイトでの TF の発現が増加しこれらの変化は NF- $\kappa$ B 経路依存的であった。また、siRNA による TF の knockdown が低酸素によるポドサイト傷害を改善したことから、TF は低酸素によるポドサイト傷害に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。