

氏 名	久間 昭寛
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
Role of WNT10A-Expressing Kidney Fibroblasts in Acute Interstitial Nephritis (急性間質性腎炎における WNT10A 発現腎線維芽細胞の役割)	
論文要旨	
<p>【目的】急性間質性腎炎は、炎症により惹起された酸化ストレスや、炎症後の組織修復過程における間質線維化が腎機能低下に関与していることが指摘されている。一方、WNT10A は皮膚の α-SMA 陽性線維芽細胞に発現して創傷治癒・ケロイド形成等の間質新生に関与していることが既に報告されている。そこで、急性間質性腎炎後の腎機能低下の原因を明らかにするために、WNT10A 陽性腎線維芽細胞の酸化ストレスに対する影響と線維化の機序について研究を行った。</p> <p>【方法】まず、ヒト腎組織における WNT 蛋白の発現と腎機能・腎線維化との関係を調べた。当院腎臓内科で施行した腎生検症例で、60 歳以上かつ男性の急性間質性腎炎所見を認めた 20 例を抽出した。20 例の腎組織を WNT1、WNT3、WNT4、WNT10A の抗体を用いて免疫組織化学染色を施行し、各 WNT 蛋白発現の有無と糸球体濾過率 (estimated Glomerular Filtration Rate; eGFR) との関連を解析した。また、WNT10A 発現と Fibronectin 発現・α-SMA 発現・線維化範囲との関連について免疫組織化学染色と Masson-Trichrome 染色を用いて検討した。次に、WNT10A による線維化の機序を培養細胞を用いて検討した。細胞株 COS1 (kidney fibroblasts of African green monkey) に WNT10A 発現プラスミドを導入して WNT10A 発現細胞を作製した。培養細胞での蛋白の発現を Western blotting にて解析した。また、酸化ストレスに対する影響を調べるために、過酸化水素刺激による生存細胞数を WST-8 法で測定した。</p> <p>【結果】腎組織 20 例のうち WNT1、WNT3、WNT4、WNT10A の陽性例はそれぞれ 11 例、8 例、5 例、10 例であった。WNT10A 陰性例の eGFR (median [interquartile range]) は、46.81 [35.45-84.91] mL/分/1.73m² であったのに対し、WNT10A 陽性例の eGFR は 11.12 [7.93-22.74] mL/分/1.73m² と有意に低かった (p=0.0002)。しかし、WNT1、WNT3、WNT4 は、陽性・陰性症例と eGFR 値との間に有意差は見られなかった。また、WNT10A 陽性例は WNT10A 陰性例に比べて α-SMA 陽性例が多く (p=0.0005)、さらに、線維化は広範囲に及んでいた (p=0.0191)。次に、WNT10A 発現細胞は細胞外マトリックス構成要素のひとつである Fibronectin の発現が親細胞に比べ 3~5 倍上昇した。ヒト腎組織でも同様に、WNT10A 陽性例は Fibronectin 陽性例が有意に多かった (p=0.0062)。WNT10A 発現細胞は抗酸化因子である peroxiredoxin (PRDX) 5 の発現が親細胞に比べて約 2 倍に上昇していた。過酸化水素を用いた細胞毒性試験では、過酸化水素処理 (15.6~62.5 μM) による WNT10A 発現細胞の生存細胞数は親細胞と比較して上昇していたが、逆に WNT10A 発現細胞の PRDX5 発現を siRNA で knockdown すると、siRNA コントロールに比べて過酸化水素存在下での生存細胞数が低下した。さらに、過酸化水素刺激時には細胞死マーカーである cleaved Caspase-3 と cleaved PARP の発現が親細胞では見られたが、WNT10A 発現細胞ではそれらの発現は低下していた。</p> <p>【考察】急性間質性腎炎においては、炎症後の治癒過程における組織修復と間質新生のバランスの乱れが腎線維化に関与しているとされている。WNT10A は Fibronectin の発現を亢進させ、腎線維化に作用することが分かった。WNT10A による腎線維化亢進の末、腎機能低下に影響を与えていると考えられる。また、WNT10A が抗酸化因子の PRDX5 発現誘導を介して、酸化ストレスによる apoptosis を免れていた。酸化ストレス下での線維芽細胞が、持続的に Fibronectin 産生を行えるものと考えられる。WNT シグナルの限定的阻害が急性間質性腎炎後の抗線維化療法になる可能性を示唆している。</p> <p>【結論】急性間質性腎炎において WNT10A が線維化亢進を招き、腎機能低下に関与していることを明らかにした。さらに、炎症による酸化ストレス下でも細胞生存能力を獲得していることが分かった。WNT10A 陽性腎線維芽細胞が Fibronectin 発現を正に制御し、急性間質性腎炎の治癒過程において持続的に間質新生を誘導していると考えられた。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	久間 昭寛						
論文審査委員	主査 所属	生体適応 系	生体機構 部門	中山 敏幸	◎		
	副査 所属	環境・産業生態 系	環境適応医学 部門	上野 晋	◎		
		障害機構 系	病態機構 部門	田中 良哉	◎		
		系	部門		◎		
		系	部門		◎		

論文題目

Role of WNT10A-Expressing Kidney Fibroblasts in Acute Interstitial Nephritis
(急性間質性腎炎における WNT10A 発現腎線維芽細胞の役割)

学位論文審査結果要旨

急性間質性腎炎の発症機序はいまだ明らかではないが、炎症により惹起された酸化ストレスや炎症後の組織修復過程における間質線維化が腎機能低下に関与していることが指摘されている。一方、WNT10A は皮膚線維芽細胞に発現し、創傷治癒等の間質新生に関与している。本研究では、急性間質性腎炎後の腎機能低下の原因を明らかにするため、WNT10A 陽性腎線維芽細胞の酸化ストレスに対する影響と線維化の機序について研究を行った。

ヒト腎組織における WNT 蛋白の発現と腎機能・腎線維化との関係を調べるため、当院腎臓内科で施行した腎生検症例のうち、急性間質性腎炎所見を認めた 20 例の腎組織にて WNT1、WNT3、WNT4、WNT10A について免疫組織化学染色を施行し、各 WNT 蛋白発現と糸球体濾過率 (eGFR) との関連を検討した。また、WNT10A 発現と Fibronectin、 α -SMA の発現・線維化範囲との関連について免疫組織化学染色と Masson-Trichrome 染色を用いて検討した。次に、WNT10A による線維化の機序を培養細胞を用いて検討した。腎線維芽細胞株 COS1 に WNT10A 発現プラスミドを導入し WNT10A 発現細胞を作製し、蛋白の発現を Western blotting にて解析した。また、酸化ストレスに対する影響を調べるため、過酸化水素刺激による生存細胞数を WST-8 法にて測定した。

腎組織 20 例のうち WNT1、WNT3、WNT4、WNT10A の陽性例はそれぞれ 11 例、8 例、5 例、10 例であった。WNT10A 陰性例の eGFR は、46.81 mL/分/1.73m² であったのに対し、WNT10A 陽性例の eGFR は 11.12 mL/分/1.73m² と有意に低かった (p=0.0002)。しかし、WNT1、WNT3、WNT4 は、陽性・陰性症例と eGFR 値との間に有意差は見られなかった。また、WNT10A 陽性例は WNT10A 陰性例に比べて α -SMA 陽性例が多く (p=0.0005)、線維化は広範囲に及んでいた (p=0.0191)。次に、WNT10A 発現細胞は Fibronectin 発現が親細胞に比べ 3~5 倍上昇した。ヒト腎組織でも同様に、WNT10A 陽性例は Fibronectin 陽性例が有意に多かった (p=0.0062)。WNT10A 発現細胞は peroxiredoxin (PRDX) 5 の発現が親細胞に比べて約 2 倍に上昇していた。過酸化水素処理による WNT10A 発現細胞の生存数は増加していたが、WNT10A 発現細胞の PRDX5 発現の siRNA による knockdown では、コントロールに比べて過酸化水素存在下での生存細胞数が減少した。さらに、過酸化水素刺激時には cleaved Caspase-3 と cleaved PARP の発現が親細胞では見られたが、WNT10A 発現細胞では発現は低下していた。

以上より WNT10A は Fibronectin の発現を亢進し、腎線維化促進に作用することが明らかになり、腎線維化亢進の末、腎機能低下に影響を与えていると考えられた。また、WNT10A が PRDX5 発現誘導を介して、酸化ストレスによる apoptosis を免れており、酸化ストレス下での線維芽細胞が、持続的に Fibronectin 産生を行えるものと考えられる。WNT シグナルの限定的阻害が急性間質性腎炎後の抗線維化療法となる可能性を示唆している。

本研究は、ヒト腎組織標本を用い免疫組織化学染色法による蛋白発現解析、さらに高度な分子細胞学的手法を使用し、詳細な検討を行っている。また得られた結果は、間質性腎炎の病態解明に非常に有用と考えられ、将来、患者の新たな治療法開発の可能性が強く示唆されることから、本学学位論文として適格であると判断した。

平成 27 年 2 月 25 日