学位授与番号：甲 1113 号

氏　　名：亀島　佐保子

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：　令和 1 年 9 月 11 日

学位論文名：
Gcm1 is involved in cell proliferation and fibrosis during kidney regeneration after ischemia–reperfusion injury.
（Gcm1 は腎臓虚血再灌流障害後の細胞増殖と線維化に関与する）

学位論文審査委員長：教授　松浦知和

学位論文審査委員：教授　鷹橋浩幸　　教授　岡本愛光

論　文　要　旨

氏　名	亀島　佐保子	指導教授名	横尾　隆

主論文

Gcm1 is involved in cell proliferation and fibrosis during kidney regeneration after ischemia–reperfusion injury

（Gcm1 は腎虚血再灌流障害後の細胞増殖と線維化に関与する）

Sahoko Kamejima, Norifumi Tatsumi, Akane Anraku, Hideaki Suzuki,
Ichiro Ohkido, Takashi Yokoo, Masataka Okabe

Scientific reports. accepted May 10, 2019

要旨

【背景・目的】

AKI において特に傷害を受ける部位は近位尿細管の S3 セグメントであり、腎虚血に最も脆弱である一方、尿細管再生に関与する領域と考えられている。今回の実験において、AKI における虚血障害後の修復過程のメカニズムの理解を深めるため、S3 セグメントで発現する遺伝子の 1 つの *Glial cells missing 1*(*Gcm1*)に注目した。胎盤では発生に必須であり、*Gcm1* knockout マウスは胎生致死となる。このため腎臓における *Gcm1* の機能についてはこれまで解析がされていない。そこで本実験では腎臓領域特異的に *Gcm1* をノックアウト(KO)することにより、*Gcm1* の腎臓における機能を解析した。

【方法】

Gcm1 遺伝子に loxP を組み込んだ Flox マウスを作成し、腎発生において後腎間葉に Cre を発現する WT1-Cre マウスと交配する事で、腎臓特異的な *Gcm1* conditional KO (cKO)マウスを作製し、両腎動静脈を 30 分間虚血したのちに再灌流を行う IRI (ischemia reperfusion injury)モデルを作製した。Flox マウスをコントロールとして cKO マウスとそれぞれ比較を行った。HE 染色、PAS 染色、Masson Trichrome 染色、Sirius Red 染色を行い、IRI 前、後で形態観察を行った。IRI 後の細胞増殖、細胞死の標識として、抗 Ki-67 抗体染色法、EdU アッセイ、TUNEL アッセイを行い評価した。線維化の評価として各種線維化マーカの real time RT-PCR、免疫染色を行った。Vitro 実験として、*Gcm1* を HEK293 に強制発現させる事で、*Gcm1* 過剰発現の状況での細胞増殖アッセイ、線維化関連遺伝子の発現を確認した。

【結果】

IRI 後の腎機能障害回復期に *Gcm1* の発現が一過性に上昇する事を発見した。また、*Gcm1* conditional KO マウスでは IRI 後の腎機能障害回復期において、尿細管細胞の増殖が軽度になり、線維芽細胞増殖因子の *TGF-β1* の発現が減少する事、線維化関連遺伝子の発現が減弱し、線維化が軽度になる事が分かった。In vitro の実験においては，*Gcm1* の過剰発現は細胞増殖を促進し，*TGF-β1*，*α-SMA* の発現を上昇させる事が分かった.

【結論】

腎臓の虚血傷害後の細胞増殖と線維化のメカニズムに *Gcm1* 遺伝子が関与している事を明らかにした。

学位論文審査結果の要旨

審査委員長　松浦知和
審査委員　鷹橋浩幸
審査委員　岡本愛光

主論文題名
Gcm1 is involved in cell proliferation and fibrosis during kidney regeneration after ischemia–reperfusion injury
（Gcm1 は腎虚血再灌流障害後の細胞増殖と線維化に関与する）
Scientific reports. accepted May 10, 2019、9：7883
https://doi.org/10.1038/s41598-019-44161-y

論文提出者氏名　亀島佐保子　（カメシマ　サホコ）
指導教官　横尾 隆（腎臓高血圧内科学講座担当教授)、岡部正隆（解剖学講座担当教授）

口頭試問　2019 年 8 月 30 日
質問１．Gcm1 は修復起点の線維化を抑制するという解釈でよいのか？
－そのように考えてよいが、線維化は修復過程でもあるので、完全に止めてしまうのは、生体にとって良いこととも言えない。
－腎臓虚血モデルでは尿素窒素の上昇で腎障害を確認している。しかし、本実験では炎症マーカーの検証は不十分である。試行錯誤し、線維化にフォーカスを当てて研究を遂行した。

質問２．マッソン・トリクロム染色で虚血後の腎臓線維化を病理学的に評価しているが、尿細管の脱落はなさそうである。敗血症に伴う腎障害でも同じような線維化は起こるのか？
－まだ、腎虚血（低酸素）での変化しか観ていない。LPS 等による影響に関しては今後の課題である。

質問３．Gcm1 を抑制すれば、虚血による腎障害、線維化を抑制できるのか？
－腎障害の治療ターゲットになる可能性はある。

質問４．腎臓の S3segment に発現する Gcm1 をなぜ研究の課題にしたのか？
－S3 segment の尿細管上皮に発現する特異な遺伝子は少ない。特に、虚血が引

き起こされやすい部位であり、“虚血”と関連のある分子でないかと考えた。そして、超高感度 in situ hybridization で同部位での Gcm1 の発現を証明することができた。

質問５. Gcm1 は TGF-β の発現を調節する、上流の転写因子と考えてよいのか？
－今のところ、TGF-β 遺伝子のプロモーター領域には Gcm1 が結合する部位は見つかっていない。

質問６．TGF-β 以外の線維化関連の分子と Gcm1 の関連を示す知見はないか？
- wnt などの発現も観たが、今のところ関連する他の分子はない

質問７．Gcm1 の発現を調節する上流の遺伝子は何か？
- CD9 などがある。癌細胞の増殖などに関連する分子である。

質問８．本研究では in situ hybridization で Gcm1、TGF-β の発現を観察しているが、蛋白レベルの検討はどうか？
-発現量が少ないのと、良い抗体がなく、今回は高感度 in situ hybridization での検討のみ行った。

質問９．TGF-β の活性化反応に Gcm1 が関わっている可能性はないか？
-in situ hybridization では Gcm1 が TGF-β 発現を抑制しているので、転写レベルの調節と考える。しかし、TGF-β の活性化反応は興味深く、今後検討してみたい。

コメント：胎盤の発生に重要な役割を果たしている *Glial cells missing 1*(*Gcm1*) が腎臓の S3 セグメントにも微弱ながら発現していること、この部位が虚血の影響を受けやすいことから、腎虚血における Gcm1 の役割を初めて明らかにした研究である。亀島氏は特に、線維化との関連を明らかにし、Gcm1 が TGF-β の発現を介して線維化を促進することを動物モデル、細胞モデルを駆使して明らかにした。以上から、本論文は、腎虚血、腎線維化過程での Gcm1 の役割を初めて明らかにした論文であり、今後の腎障害の新規治療法の開発にも結び付く可能性がある価値ある論文である。

以上