

論文の内容の要旨

氏名：大 月 伯 恭

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：補体 C3 による高血圧病態形成および腎線維化における転写因子 TWIST1 の関与の解明

高血圧自然発症ラット（Spontaneously hypertensive rats：SHR）や片側尿管結紮術（Unilateral ureteral

obstruction：UUO）モデルマウスにおいて、補体 C3（C3）の発現亢進は転写因子 Krüppel-like zinc finger factor 5 と Transforming growth factor- β 1（TGF- β 1）を介して、間葉系細胞は脱分化、上皮系細胞は上皮間葉化現象（Epithelial mesenchymal transition：EMT）を起こし、いずれも脱分化性を保つことにより高血圧と腎線維化を起こしている。また、転写因子 Twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1（TWIST1）が腎線維化に大きな役割を果たしていることが報告された。そこで SHR の高血圧病態や UUO の腎線維化における C3 の高発現に対する TWIST1 の関与について検討することを本研究の目的とした。

まず正常血圧である Wistar-Kyoto rats（WKY）および SHR 由来メサンギウム細胞での TWIST1 の発現を検討したところ、SHR 由来メサンギウム細胞では有意に亢進していることが確認された。C3 プロモーター領域に対する TWIST1 結合も WKY 由来メサンギウム細胞に比べ SHR 由来メサンギウム細胞で多いことが確認された。さらに SHR 由来メサンギウム細胞に対し siRNA を用いて *Twist1* mRNA を抑制したところ、*C3* mRNA は抑制され、また、WKY 由来メサンギウム細胞に *Twist1* 遺伝子を導入することで *C3* mRNA の発現は亢進した。これらの結果から SHR 由来メサンギウム細胞を含む間葉系細胞では、発現が亢進した TWIST1 が転写因子として *C3* プロモーター領域に結合し、C3 の発現を高めていると考えられた。

また、腎線維化に対する C3 と TWIST1 の検討として、まず、Interferon（IFN）- γ 刺激下のマウス尿管上皮（TCMK-1）細胞の *C3* および *Twist1* mRNA の発現を検討した。TCMK-1 細胞への IFN- γ 刺激では *C3* mRNA の発現が有意に亢進し、同時に *Twist1* mRNA の発現が亢進することを確認した。そこで、*C3* プロモーター領域に対する TWIST1 の結合を阻害した場合の C3 発現を検討するため、今回 2 種類の Pyrrole Imidazole（PI）ポリアミド（TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2）を設計・合成した。TCMK-1 細胞に対する IFN- γ 刺激のもと、TWIST1 PIP-1 と TWIST1 PIP-2 を用い TWIST1 の *C3* プロモーターに対する結合を阻害した場合、IFN- γ 刺激に対する *C3* mRNA の増加は有意に抑制された。また UUO モデルにおいて、UUO 側では正常腎である非結紮（Contralateral unobstructed kidney：CUK）側に比べて、TWIST1、C3 の発現が亢進することを確認した。更に UUO 側では、TGF- β 1、 α -smooth muscle actin（ α -SMA）、レニンの発現が亢進していた。そこで、TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2 を用い *C3* プロモーターに対する TWIST1 結合の阻害を試みたところ、PI ポリアミドを投与していない Control 群の UUO 側に比し C3 と TGF- β 1 が抑制された。したがって、UUO モデルにおいても TWIST1 が *C3* のプロモーター領域に結合することで *C3* の発現を亢進させていると考えられた。また組織所見では、今回使用した TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2 による明確な腎線維化の抑制は確認できなかったが、TWIST1 PIP-1 の投与により TGF- β 1 の抑制がみられたため、TWIST1 を起因とする *C3* を介した腎線維化のカスケードの一部には効果的であると考えられた。以上より腎線維化においても *C3* の発現亢進は、TWIST1 の高発現による可能性があると考えられた。

今後は、TWIST1 の発現亢進のメカニズムを検討していく必要がある。また、TWIST1 をターゲットとした PI ポリアミドの創薬開発を進めていく。