

論文の内容の要旨

論文題目 腎障害に対する PAF-アセチル
ヒドロラーゼ過剰発現の効果の検討

指導教官 木村 哲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程 内科学専攻

磯尾 直之

(はじめに)

糸球体腎炎の発症と進展に酸化ストレスの関与が考えられている。
我々は生体内で抗酸化作用をもつ物質の一つとして、過酸化リン脂質を
水解する血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) に注目し、
糸球体腎炎のモデル動物である SHC-ラットにアデノウイルスベクター

を用いて PAF-AH 蛋白を過剰発現させ、腎病変に対する影響を検討した。

(方法)

ヒト分泌型 PAF-AH(sPAF-AH) cDNA を、アデノウイルス作成用組換えシャトルベクターにサブクローニングした後、これを第二世代アデノウイルス DNA とともに HEK293 細胞に co-transfect し、相同組換え法にてウイルスを作成した。これを大量培養し、超遠心法にて sPAF-AH cDNA を含むアデノウイルス(AdPAF-AH)を精製した。

12 週齢雄 SHC-ラットに AdPAF-AH を、 1.6×10^{12} 粒子/個体で尾静脈より投与した。 β ガラクトシダーゼ cDNA を同様に組み込んだアデノウイルス(Ad LacZ) を等量投与したもの、および vehicle である PBS を投与したものをコントロールとした。3 日、1 週、2 週、3 週および 4 週後に血液と 24 時間尿のサンプリングを行い、また各々一部の個体を屠殺し、肝臓および腎臓を摘出した。

血漿検体で sPAF-AH 活性を測定し、ウェスタンブロット法による sPAF-AH 蛋白量の検討も行った。AdPAF-AH 投与後 3 日の血漿を FPLC により分画し、各分画のコレステロール値と sPAF-AH 活性を測定した。尿検体で総蛋白濃度を測定し、24 時間尿量とから 24 時間尿蛋白を求めた。腎臓は一部をホルマリン固定後 PAS 染色して組織像を観

察し、糸球体病変のスコアリングを行った。腎臓の残りで凍結組織切片を作成し、免疫組織染色法により sPAF-AH の存在を検討した。肝臓に対しても同様に免疫組織染色を施行した。

(結果)

AdPAF-AH 投与後 3 日で、血中 sPAF-AH 活性は投与前の約 500 倍となり、その後減少した。ウェスタンブロット法でも、活性と比例して sPAF-AH 蛋白が検出された。FPLC による解析では、sPAF-AH 活性は HDL 画分に一致して認められ、他の画分には認められなかった。24 時間尿蛋白は AdPAF-AH 投与群で減少し、逆に増加したコントロール群との間に明らかな有意差を認めた (図 1)。腎組織像は、コントロール群では糸球体の硝子化を認めたが、AdPAF-AH 投与群では硝子化は軽度であった。免疫組織染色法により、AdPAF-AH 投与群の肝臓および腎臓で sPAF-AH 蛋白が検出されたが、sPAF-AH 蛋白量が最大になるのは、肝臓では血漿と同様 AdPAF-AH 投与後 3 日であるのに対し、腎臓では投与後 1 週であった。腎臓で sPAF-AH が検出されたのは糸球体の血管係蹄に沿った部位であり、組織学的な観察により、主に内皮細胞であるとみられた。

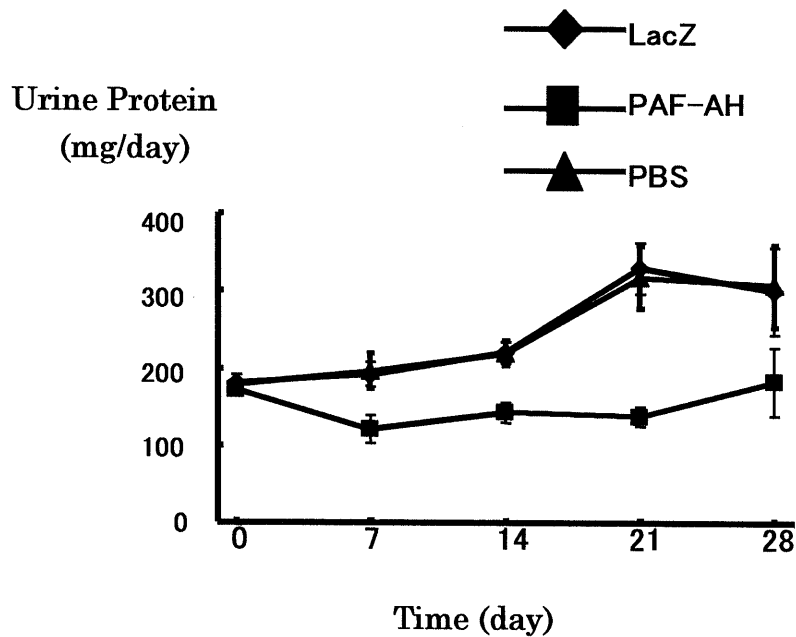


図1 24時間尿蛋白の変化。n=9（ウイルス投与前、3日、7日、14日後）、n=6（ウイルス投与21日、28日後）。同一日のLacZ群と比較し、. : p<0.01、. . : p<0.001、28日後ではp=0.14

（ 考察 ）

SHC-ラットに sPAF-AH を過剰発現させたところ、明らかな腎障害の改善が認められた。糸球体腎炎の発症と進展に酸化ストレス・過酸化リン脂質が関与していることが示唆された。

アデノウイルスベクターを経静脈投与で用いた遺伝子導入法では、目的遺伝子は主に肝臓で発現し、腎臓その他の臓器での発現はわずかである。本実験では腎糸球体で明瞭に sPAF-AH 蛋白を検出しており、その蛋白量が最大となるのが肝臓より数日遅れることから、主に肝臓で発

現した sPAF-AH 蛋白が腎臓に輸送され、局所的に蓄積され、糸球体に対する効果を発揮したものと考えられる。sPAF-AH は血中では殆どが HDL と結合して存在しており、HDL が輸送担体となっている可能性が示唆される。

本研究は、糸球体腎炎の発症と進展の機序の解明、また将来的な治療の開発に寄与するのみならず、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療が ‘gene transfer and protein delivery’ method として、その応用範囲がさらに広がる可能性があることを示唆している。