

論文の内容の要旨

Hypoxia in Renal Disease with Proteinuria and/or Glomerular Hypertension

タンパク尿および糸球体高血圧を伴う腎疾患における 低酸素

指導教官 藤田 敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

田中 哲洋

[背景]

各種進行性腎障害に共通する病態修飾因子として、タンパク尿の存在とともに尿細管間質領域における慢性低酸素の存在が推定されている。この仮説はヒトや実験動物での腎障害の程度が、傍尿細管微小血管の脱落と相関するという所見や血管保護・新生を標的とした実験的治療が腎障害を改善するといった実験的試みによって幅広く支持されている。しかしながら、実際に尿細管間質での酸素化を評価した報告は少なく、その結論も一定の見解を得るに至っていない。以上の観点から、個体の低酸素状態を細胞レベルで検出する遺伝子改変ラットを作製し、puromycin 腎症と 5/6 腎摘モデルにて尿細管間質の低酸素を検出した。

哺乳類細胞には低酸素環境に順応するための機構が数多く存在し、分子レベルでは遺伝子転写レベルでの erythropoietin(Epo)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、解糖系酵素の発現誘導が知られている。

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は、上記遺伝子発現を低酸素環境下で正に調節する最も重要な転写因子の一つである。HIF-1 は α および β 鎖からなるヘテロ二量

体で、basic helix-loop-helix (bHLH) スーパーファミリーに属する。全身にて ubiquitous に発現しており、その α 鎖は通常酸素濃度下では速やかにユビキチン分解をうけているが、一旦低酸素にさらされると、HIF-1 α は分解を逃れ、恒常的に発現している β 鎖と結合し、当該遺伝子のエンハンサーに存在する *cis*- コンセンサス HIF-1-結合部位(hypoxia-responsive element (HRE))と結合することで遺伝子転写を正に制御する。近年の分子生物学研究において、HIF-1の低酸素依存性発現調節のメカニズムがより明らかとなった。通常酸素濃度下では、HIF-1 α はその oxygen-dependent degradation domain に存在する prolyl 残基において hydroxylation を受け、von Hippel-Lindau protein (pVHL)との会合を誘導し、ユビキチン分解に至ることが解明され、HIFによって行われる転写調節が極めて低酸素依存性であり、特異的なメカニズムであることも分かってきた。

さらには、より重要なことに、この低酸素遺伝子応答をつかさどる HRE が、腫瘍学領域を中心として治療分子の低酸素選択的発現目的に利用された報告例が散見されつつある。同様の理論的背景を基に我々は、レポーター遺伝子のエンハンサー領域に HRE を組み込み、最適化することで、新たな低酸素検出マーカーベクターを作製、細胞レベルでの低酸素局在が検出可能となるのではないかと考えた。

[方法, 結果]

低酸素応答ベクターとして、タグ付き改変レポーター遺伝子のプロモーター領域に、HIF-1と結合し、転写活性をつかさどる低酸素応答配列(hypoxia-responsive element, HRE)を組み込むことで最適化した。ルシフェラーゼアッセイにて反応ベクターの低酸素応答を調べたところ、その反応はHREの配列コピー数に比例して高くなり、7個の繰り返し配列を持つベクターが至適活性を示した。このベクターは経時的、酸素濃度依存的な低酸素応答を示し、培養尿細管細胞にて最大16.5倍の低酸素活性上昇が認められた(1%酸素濃度, 24時間)。プロモーターにはhmCMV promoterを使用した。

次に、このベクターを各種臓器に発現するトランスジェニックラットを作成し、各臓器内での transgene 発現、および低酸素依存性発現上昇を RT-PCR 法お

よび免疫組織染色の2法で確認した。全身低酸素刺激にて、今回調べた脳、心臓、筋肉、肝臓、腎臓、肺の6臓器において当該遺伝子の発現上昇が確認できた。

さらにラット虚血腎における transgene(低酸素マーカー)の発現を、全身コバルト投与による HIF 安定化、および虚血再灌流障害の2法にて確認した。免疫組織染色上、全身コバルト投与にて低酸素シグナルは全尿細管分画に認められ、また虚血再灌流障害では、45分の虚血に引き続く再灌流2時間において、障害を受け、拡張した近位尿細管の刷子縁側に低酸素シグナルの上昇が確認された。以上により、組み込んだ transgene の発現が理論どおり低酸素依存性に上昇することを確立した。

最後に、本モデルラットを用いて、慢性腎障害における尿細管間質領域の低酸素を評価した。腎障害モデルとして、大量のタンパク尿を伴う puromycin 腎症と、全身/糸球体高血圧に特徴付けられる 5/6 腎摘モデルを採用した。尿細管の低酸素およびその局在を免疫染色にて確認したところ、前者ではびまん性の皮質低酸素が、後者では障害を受け、拡張した尿細管に限局する巣状の低酸素シグナルが検出された。両モデルの尿細管低酸素は傍尿細管毛細血管の狭小化と脱落を伴い、低酸素による transgene 発現上昇は、前者で 2.2 倍 (2 週)、後者で 2.6 倍 (4 週) に達した。また、その低酸素シグナルの発現レベルは腎機能障害や尿細管組織障害の程度と相関性を認めた。さらには 5/6 腎摘モデルにおいて、PCNA 陽性細胞や ED-1 陽性細胞、TUNEL 陽性尿細管が低酸素領域に偏在する傾向があることを確認した。

[結論]

このトランスジェニック動物の樹立により、腎臓の酸素化モニタリングが細胞レベルで可能となった。本結果は、上記の慢性低酸素仮説を検証し、これに対する新規治療法の開発を支持するものである。