

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 田中 哲洋

本研究は、慢性進行性腎障害の進展において重要な役割を果たすと考えられている尿細管間質の慢性低酸素に注目し、その実在を確かめるための新たなトランスジェニックラットを開発した。本モデル動物を利用して種々の慢性腎障害を惹起し、その尿細管低酸素を可視化・定量化したものであり、下記の結果を得ている。

1. 低酸素反応ベクターを作製するため、ルシフェラーゼ発現ベクターにラット血管内皮増殖因子由来の低酸素応答配列 (hypoxia-responsive element: HRE) を組み込み、プロモーターおよびエンハンサーの最適化を行った。培養近位尿細管細胞に一過性遺伝子導入を行い、プロモーターアッセイを行ったところ、その最適化に伴い最大 16.5 倍の低酸素応答が得られた。また、本ベクターの組織内での検出を促進する目的で、ルシフェラーゼ遺伝子の N 末端に FLAG の tag を付加した。
2. 本ベクターを個体ラットに導入することで、低酸素感知トランスジェニックラットを開発した。ラットにコバルトを投与することで化学的に転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) を安定化したところ、脳、心臓、筋肉、肝臓、腎臓、肺の 6 臓器においてトランスジーンが発現が条件的に上昇することが確認された。
3. 腎臓内での本ベクターの挙動を、1) コバルト投与による化学的な低酸素刺激、2) 虚血再灌流障害モデル、の 2 法にて確認した。全身コバルト投与にて尿細管の全分画にトランスジーンが発現が亢進し、また、虚血再灌流障害後 2 時間の組織染色にて、拡張し障害を受けた近位尿細管に強い低酸素シグナルを発することが確認された。この低酸素シグナルは再灌流後 4 時間まで持続して認められた。
4. 上記の低酸素感知トランスジェニックラットを利用して、慢性腎障害モ

デルにおける尿細管低酸素の検出を試みた。モデルとして、大量のタンパク尿に特徴付けられる puromycin 腎症モデル(第 1, 2 週)と、糸球体高血圧に特徴付けられる 5/6 腎摘モデル(第 1, 4 週)を採用した。免疫組織染色上、前者モデルでは尿細管全体にわたる diffuse な低酸素シグナルが、後者では拡張し、障害を受けた近位尿細管に強い低酸素シグナルがそれぞれ確認された。低酸素マーカーとしてのトランスジェン発現を real-time PCR にて定量化したところ、前者モデルの第 2 週において 2.2 倍、後者第 4 週において 2.6 倍の発現上昇を認めた。また、これらモデルの低酸素はレクチン灌流試験の結果、皮質傍尿細管毛細血管の狭小化、脱落を伴うものであることが判明した。

5. 慢性腎障害モデルの個々のラットに対して、低酸素のレベルと尿細管間質障害、BUN レベルとの相関関係を調べたところ、5/6 腎摘モデルにおいて強い相関関係を認めることが判明した。組織の免疫二重染色、または連続切片による解析を行ったところ、本モデルではその初期の PCNA 陽性増殖尿細管細胞が大部分低酸素に陥っていること、また、進行期において TUNEL 陽性アポトーシス細胞が低酸素尿細管に多く認められることが確認された。さらに、ED-1 陽性マクロファージが低酸素尿細管領域に多く浸潤していることも明らかとなり。本病態モデルにおける低酸素の果たす役割がより一層明らかとなった。

以上、本論文は組織低酸素を感知する新規トランスジェニックラットを開発し、慢性腎障害モデルにおいて尿細管間質の低酸素を実証することに成功した。尿細管低酸素は慢性進行性腎障害の進展において重要な役割を果たす可能性が提唱されており、本研究は、今後低酸素が腎疾患進行をもたらすメカニズムの更なる解明、および低酸素を標的とした新規治療戦略を開発する上で重要な役割を果たす研究と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。