

論文の内容の要旨

論文題目 ヒストン脱アセチル化酵素阻害による腎線維化抑制

指導教員 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 吉川 真弘

背景および目的

腎における尿細管の萎縮と間質の線維化は、慢性的な腎機能低下の原因となる。epithelial-mesenchymal-transition (EMT) は、上皮細胞が間葉系細胞に形質転化する現象であるが、成体腎においては尿細管の萎縮や線維化の増大により、慢性的な腎機能低下を招く。慢性的な腎機能低下に対しては、様々な治療法が試みられているが、未だ確立されたものは無い。

近年、遺伝子発現の制御に chromatin remodeling が関与していることが明らかになってきている。histone acetylation は histone acetyltransferase (HAT) と histone deacetylase (HDAC) の相互作用によって調節されている。histone acetylation の増加により、chromatin 構造は弛緩した euchromatin の状態となって、転写調節因子が種々の遺伝子の promoter 領域に作用することが可能となり、遺伝子発現が調節される。Tricostatin A (TSA) を始めとする種々の HDAC-inhibitor は、発生や発癌を制御し得る薬剤として大きく注目されているが、抗線維化作用も有することが肝、皮膚、肺などの臓器で報告されている。しかしその機序については大部分が未解明であり、腎線維化に対しては過去に全く検討がなされていない。

我々は、chromatin remodeling を介した遺伝子制御機構による腎臓再生を目指している。その一環として今回、培養ヒト近位尿細管細胞を用いて、EMT 誘導因子であ

る TGF- β 1 誘導性の線維化が、TSA によって抑制され得るかを検討するとともに、その機序の解明を試みた。

方法と結果

培養ヒト近位尿細管細胞に対し TGF- β 1 および TSA を作用させ、細胞形態変化や、上皮 marker 遺伝子 E-cadherin および線維化 marker 遺伝子 Collagen type I の発現変化を調べた。TGF- β 1 誘導性の線維化に伴う紡錘状の細胞形態変化、E-cadherin の減少、Collagen type I の増加は、すべて TSA によって抑制された。TSA は上皮細胞の phenotype を維持する方向に働き、また TGF- β 1 が有する線維化作用に拮抗することが示唆された。

次に TSA が、TGF- β 1 の signal 経路のどの段階で拮抗しているかを検討するために、Smad2 および Smad3 のリン酸化の変化を Western-Blot によって調べた。TGF- β 1 による Smad2 および Smad3 のリン酸化は、TSA では抑制されなかった。TSA は Smad2 および Smad3 のリン酸化よりも下流の段階で、TGF- β 1 の線維化作用に拮抗することが推察された。TSA が有する遺伝子制御機構によって、何らかの抗線維化因子が誘導されている可能性が考えられた。

過去の報告から、TGF- β 1 誘導性の線維化に拮抗し得る因子を調べ、その遺伝子発現の変化を real-time RT-PCR によって調べた。検討した BMP-7, HGF, Ski, SnoN, TGIF, Id1, 2, 3 の中で、Id2, BMP-7, TGIF の遺伝子発現が TSA の作用によって増加していた。TSA は、これらの遺伝子発現の誘導を介して、TGF- β 1 の線維化作用に拮抗している可能性が考えられた。

これまでに認められた遺伝子発現の増加が、TSA による chromatin remodeling の結果であるかを検討した。まず Western-Blot によって、acetylated histone の総量の変化を調べた。その結果、TSA の作用により acetylated histone の総量が増加していた。更に、個々の遺伝子が chromatin remodeling の影響を受けているかを検討するため、上皮 marker である E-cadherin と、抗線維化因子である Id2 および BMP-7 遺伝子について、chromatin immunoprecipitation assay によって、promoter 領域の acetylated histone が増加しているかを調べた。その結果、TSA の作用により、E-cadherin 遺伝子の promoter 領域では acetylated histone H3 と H4 が、Id2 遺伝子の promoter 領域では acetylated histone H3 が、BMP-7 遺伝子の promoter 領域では acetylated histone H4 が、有意に増加していた。以上より、TSA による E-cadherin, Id2, BMP-7 の遺伝子発現増加は、chromatin remodeling を介していることが示された。

考察

HDAC-inhibitor は肝、皮膚、肺において、線維化抑制の報告があるが、

その機序は未解明である。TSA は MPL-lpr/lpr mouse における腎炎に対して改善効果を認めているが、腎線維化に対する改善効果は未検討である。今回我々は、TSA が TGF- β 1 に拮抗し得る因子を誘導し、ヒト近位尿細管上皮細胞における TGF- β 1 誘導性の線維化を抑制することを示した。

TGF- β 1 の signal は、リン酸化された Smad2 および 3 が Smad4 と複合体を形成し、核内に伝達される。我々の検討では、TSA は TGF- β 1 による Smad2 および Smad3 のリン酸化には影響を与えなかった。このことは、TSA が Smad のリン酸化よりも下流において TGF- β 1 の signal を抑制していることを示唆している。

BMP-7 は腎保護因子として報告されている。noggin や chordin など BMP-7 を抑制する因子は多く知られており、また Lin らは、kielin/chordin-like protein が BMP-7 signal を増強することを報告したが、BMP-7 の発現を増加する因子は未だ報告されていない。今回の結果は、TSA が BMP-7 の発現を誘導することを初めて示唆するものである。

今回、TSA によって、BMP-7 の他に、抗線維化因子として報告のある、Id2, TGIF の発現が誘導された。線維化抑制の機序に関して、TSA によって TGIF の mRNA 発現が誘導された報告は少なくとも過去に 1 例あるが、BMP-7 と Id2 に関しては今回が初めての報告である。以上の結果より、TSA は TGF- β 1 の signal 伝達を Smad リン酸化より上流で遮断するのではなく、Id2, BMP-7, TGIF の拮抗因子を誘導することにより、それより下流で阻害するものと考えられる。

今回検討した遺伝子の発現増加は、TSA による chromatin remodeling の直接の結果であることが示唆された。一般に HDAC-inhibitor によって発現が誘導される遺伝子は全遺伝子の 10%未満と言われているが、TGF- β 1 誘導性線維化の抑制に関わる全遺伝子を決定するには、microarray などの包括的な解析が必要と思われる。しかし、HDAC-inhibitor は複数の遺伝子発現を同時に調節することで、BMP-7 や HGF などの薬剤を単独で用いた場合よりも大きな治療効果が得られる可能性もあり、過去の報告や今回の結果から、TSA の抗線維化作用は一層明確となったと考えられる。

今回我々は、培養ヒト近位尿細管細胞において、TSA が TGF- β 1 が有する線維化作用に拮抗することを示した。その機序の一端として、Id2, BMP-7, TGIF の遺伝子発現増加の関与が示唆された。これらの結果は、今後 TSA や他の HDAC-inhibitor が、chromatin remodeling を介した腎線維化抑制作用による、新しい腎不全治療薬として臨床応用される可能性を示唆している。