

[ 別 紙 1 ]

論文内容の要旨

論文題目

**The tubulointerstitial injury due to hypoxia was ameliorated by cobalt: involving renoprotective gene induction associated with HIF stabilization**

腎間質領域で生じる虚血に起因する尿細管間質障害は、コバルト投与によって誘導される腎保護的遺伝子の働きにより改善される。

氏名 松本 真規子

近年、臨床的ならびに実験的に腎機能障害の程度は糸球体障害の程度よりむしろ、尿細管間質障害の程度に相関することが報告されており、尿細管間質障害の腎機能低下に果たす重要性が示唆されている。蛋白尿は、尿細管間質障害を惹き起こす最も重要な mediator の1つであるが、ある種の腎疾患では高度蛋白量が認められないにもかかわらず間質障害を伴って腎機能が低下することが報告されており、蛋白尿以外にも病態進行を規定している重要な因子があると考えられる。その機序の1つとして近年、尿細管間質領域の慢性的な虚血が尿細管間質障害進行に関与するという仮説が提唱されている。慢性虚血は何らかの原因で尿細管間質領域への血流が障害された場合に起こりうる。実際、傍尿細管毛細血管数の減少と組織障害もしくは腎機能低下が相関することが実験的に報告されており、血管障害による血流低下が病態悪化と関連することが示唆されている。しかしながら、尿細管領域が本当に虚血状態に陥っているのか、また、虚血が障害の原因となりうるのか、それとも障害の結果出現しているにすぎないのか、については明らかになっていない。そこで

我々は、まず片腎摘出 Thy-1 腎炎ラットを用いた実験において、尿細管領域での虚血の有無と病態進行との関係を明らかにした。

片腎摘出後、1, 2 週目に Thy-1 抗体を投与し、進行性の腎障害が認められる片腎 Thy-1 腎炎モデルを作製した。抗体投与終了後 2 週目には有意な糸球体硬化病変が認められ、硬化病変の程度は病態惹起 11 週においても同様に重度認められた。一方、尿細管間質障害の程度は 2 週目に軽度認められ、その後 11 週にかけてより進行していることが明らかとなった。また、細胞内低酸素マーカー pimonidazole とその抗体を用いた免疫組織化学的解析により、1 週目から皮質尿細管領域の酸素分圧が片腎コントロールと比して低下していることが明らかになった。皮質尿細管の低酸素が、尿細管間質障害進行に先立って病態早期から出現していることから、低酸素が尿細管間質障害進行の原因となりうると思われる。

この虚血状態がどのようにして出現するか、その機序を明らかにするため、傍尿細管毛細血管網の密度を調べたところ、尿細管間質障害と同様に、2 週目では軽度の減少、11 週目には著しい毛細血管の減少が認められた。しかしながら、低酸素に陥った尿細管は皮質に幅広く分布していたのに対し、傍尿細管毛細血管の減少は組織障害に強い部位に局限されていたことから、尿細管の酸素分圧を低下させる機序として、解剖学的な傍尿細管毛細血管の減少の以外の機序の存在が考えられた。そこで、生理的条件下で毛細血管内皮細胞に結合しうるビオチン化レクチンを尾静注し、傍尿細管毛細血管内のレクチン滲流の程度を比較したところ、コントロールに比し病態群では有意にレクチン滲流が減少しており、この領域の血流量低下が示差された。さらに、傍尿細管毛細血管内の赤血球流速を直接測定する *intra vital microscopy* 法によっても、病態群での傍尿細管毛細血管内の血流低下が明らかとなった。これらの結果は、毛細血管数の減少だけではなく、血流量の低下も病態早期の慢性虚血の原因になっていることを示差している。

一方、細胞が低酸素に晒された場合、転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) が活性化され多くの遺伝子発現を変化させることにより、低酸素に対する適応反応が誘導されることが分かってきている。我々は、HIF を介した低酸素に対する適応反応を誘導することにより、虚血に起因する障害を改善させようと仮定した。HIF のサブユニットの 1 つ HIF- $\alpha$  は、通常酸素分圧では速やかにユビキチン分解されるが、この酸素依存的反応はコバルトによって阻害される。よってコバルトは、正常酸素濃度であっても HIF の下流に位置する遺伝子発現を活性化することができる。そこで、虚血障害に対する塩化コバルトの効果をラット虚血再還流腎不全モデルで調べた。Day-10 から 2mM 塩化コバルトを自由飲水させ、day 0 で片腎摘、day 1 で 45 分間の虚血を行い、day 3 で腎障害の解析を行った。コバルト非投与群では虚血再還流により著しい腎機能低下と尿細管間質障害、マクロファージ浸潤が認められたが、コバルト投与群ではこれらが有意に抑制された。また、半定量的 RT-PCR を用いた実験により、コバルト投与群の腎臓では heme oxygenase-1, erythropoietin, glucose transporter-1, vascular endothelial growth factor などの転写レベルが上昇していることが明らかとなった。さらに、免疫組織化学的手法により、

HIF-1alpha タンパクが安定化されていることが示され、HIF シグナルがコバルト投与によって活性化されていることが示された。これらの結果から、コバルトにより HIF シグナルの下流に位置する種々の遺伝子発現が上昇し、低酸素に対する適応反応が誘導された結果、虚血再還流障害が抑制されたと考えられる。

我々は腎疾患の病態早期から皮質尿細管領域が慢性的に虚血状態に陥ること、そしてこれが、尿細管間質障害進行に原因として関与しうることを示した。このような虚血に起因する障害を抑制することは、尿細管間質障害を抑制する上で有効であると考えられる。HIF シグナルを活性化し、低酸素に対する適応反応を誘導することは、そのような治療的手段の1つとなりうることを実験的に示した。