

論文の内容の要旨

論文題目 Protective role of hypoxia-inducible factor(HIF)-2 α against ischemic damage and oxidative stress in the kidney

腎虚血再灌流障害における HIF-2 α の保護的作用

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 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小島 一郎

【背景】

細胞が低酸素状態に適応するための因子としてhypoxia-inducible factor (HIF)が重要な役目を果たし、注目が集まっている。HIFは α と β のheterodimerからなり、通常酸素化ではHIF- α は分解されてしまうが、低酸素化ではHIF- α はHIF- β と結合し、核内に移行し、低酸素に適応する下流遺伝子のhypoxia responsive element(HRE)に結合し、それらの遺伝子の発現を増加させる。HIFのサブユニットであるHIF- α には -1 α , -2 α , -3 α のサブタイプが知られており、HIF-1 α は低酸素適応の中心的な役割を果たすことが分かっており精力的に研究されているが、HIF-2 α については主に内皮細胞に発現しているという以外、機能解析などについてはあまり進んでいない。現在までにHIF-2 α ノックアウトマウスはいくつかのグループによって報告されているが、血管形成異常、徐脈、肺形成異常などにて何れも胎性致死である。一方HIF-2 α の発現量のみ低下させたHIF-2 α ノックダウンマウスは胎性致死を免れ、正常に成長し繁殖も可能である。一方、腎臓において、急性

腎障害のみならず、慢性腎不全の進行においても低酸素は重要な役割を果たしており、HIF-1 α の活性化が、各種腎不全モデルにおいて腎障害を軽減したことは数多く報告されている。本研究では、このHIF-2 α ノックダウンマウスに腎虚血再灌流を行い、*in vivo*におけるHIF-2 α の機能・役割について明らかにすることを目的とした。

【方法】

C57BL/6J背景のオス6-8週齢のwild type(WT)マウス、HIF-2 α ノックダウンマウスともに、腎虚血再灌流障害を加え、24時間後の腎障害を、BUN、組織学的に評価することで、HIF-2 α が腎保護的に働くか、否か検討した。次にWTマウスに20%の瀉血を行い、貧血と腎虚血再灌流障害との関連について検討した。また、抗酸化酵素に注目し、腎臓でのこれらのmRNA発現量をreal-time PCRにて定量した。次に培養内皮細胞でHIF-2 α 特異的siRNAによりHIF-2 α 発現量を低下させ、これらの抗酸化酵素の発現量が変化するか検討した。WTマウスに骨髄移植実験を施行し、WTマウスまたはHIF-2 α ノックダウンマウスの骨髄で置換する実験を行い、炎症細胞中におけるHIF-2 α の発現の違いが、腎虚血再灌流障害に影響するかを検討した。さらに、Tie1-Creトランスジェニックマウスを交配させることで、HIF-2 α ノックダウンマウスのHIF-2 α を内皮細胞特異的にレスキューし、内皮細胞におけるHIF-2 α の発現の違いが、腎虚血再灌流障害に影響するかを検討した。

【結果】

HIF-2 α ノックダウンマウスでの腎臓でのHIF-2 α の発現はWTマウスに比べ、約50%に低下しているがHIF-1 α 発現量は差がなかった。虚血にてHIF-1 α およびHIF-2 α が誘導されるがタンパクレベルではやはり、HIF-1 α で差がなくHIF-2 α ではHIF-2 α ノックダウンマウスで低い結果を得た。腎虚血再灌流障害24時間後のHIF-2 α ノックダウンマウスの腎障害はWTマウスに比し、BUNレベルでより強く、組織学的にも尿細管障害がより顕著であり、この2つの指標は、強い相関を示した。HIF-2 α は内皮に主に発現するとされるが、内皮マーカーであるCD31染色による免疫染色を行うと、HIF-2 α ノックダウンマウスでは内皮細胞の脱落もより顕著であった。酸化修飾の程度をnitrotyrosineと4-HNEの免疫染色にて評価したところ、HIF-2 α ノックダウンマウスでやはり酸化修飾をより強く受けていることが分かった。

HIF-2 α がerythropoietin(EPO)をコントロールしているという報告がある。HIF-2 α ノックダウンマウスは、成長、交配能力には問題がないが、WTマウスに比しヘマトクリットにして約80%程度の貧血が認められた。貧血自身が虚血再灌流障害を悪化させたことを除外するため、WTマウスに20%の瀉血を行い、腎

虚血再灌流障害を加えたが、コントロール群に比し、腎障害の増強は認められなかった。血清EPO自体が虚血再灌流障害に影響を与える可能性もあるが、WTマウスとHIF-2 α ノックダウンマウスでは血清EPOの有意差は認められなかった。以上の事から、本研究結果において、1. 貧血の関与、2. 血清EPOの関与、による影響は少ないものと考えられた。

虚血再灌流では、酸化ストレスが増大するため、抗酸化酵素に注目し、ベースラインでの腎臓の抗酸化酵素(SOD-1, SOD-2など)のmRNA発現量をreal-time PCRにて定量を行ったところ、HIF-2 α ノックダウンマウスの腎ではWTに比べ抗酸化酵素の発現量が低下しており、これがHIF-2 α ノックダウンマウスでの腎虚血再灌流障害増強に関与したと考えられた。また、ヒト内皮細胞HUVECにて、HIF-2 α 特異的なsiRNAにより、HIF-2 α mRNA発現量を低下させると、抗酸化酵素のmRNA発現量は低下し、HIF-2 α は内皮細胞においても抗酸化酵素の発現の発現をコントロールしているものと考えられた。

HIF-2 α ノックダウンの腎虚血再灌流障害の脆弱さに、どの細胞のHIF-2 α の関与が重要であるかを検討した。1) 炎症細胞の関与：WTマウスに、HIF-2 α ノックダウンマウスの骨髄を移植し、血球系のみHIF-2 α ノックダウンマウス由来のものに置換させると腎虚血再灌流障害の脆弱性は認められなかった。2) 内皮細胞の関与：HIF-2 α ノックダウンマウスのHIF-2 α を内皮特異的にレスキューすると、腎虚血再灌流障害の脆弱性は認められなくなった。以上の事から、本研究結果において、腎虚血再灌流障害におけるHIF-2 α ノックダウンマウスの脆弱さは、内皮細胞におけるHIF-2 α の減少によりもたらされた、と考えられた。

【結論】

1. 生体における HIF-2 α の役割は不明であったが、HIF-2 α ノックダウンマウスは、腎虚血再灌流障害に弱いことが示され、HIF-2 α が腎保護的に働くことが示された。
2. HIF-2 α ノックダウンマウスは貧血を呈するが、貧血による腎虚血再灌流の脆弱さへの関与は認められなかった。
3. HIF-2 α は、内皮細胞において抗酸化酵素の発現をコントロールしていることが示された。
4. HIF-2 α ノックダウンマウスにおける、虚血再灌流障害の脆弱さは、内皮細胞における HIF-2 α の減少によりもたらされることが示された。

以上より、HIF-2 α は抗酸化作用を有し、内皮保護的に働くことで腎保護的に作用することが示された。