

審査の結果の要旨

氏名 西 裕志

本研究は進行性腎障害における慢性低酸素仮説に基づいて、低酸素腎において病的意義をもつ可能性のある分子を同定するために網羅的発現検索を行い、グロビン分子について腎における発現・分布、生理機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 片側の腎動脈を7日間部分狭窄させるという腎臓低酸素モデルラットを確立、利用して低酸素腎組織のマイクロアレイ・プロテオミクス解析を施行し、ヘモグロビンのサブユニットの遺伝子・蛋白の発現が本モデルにおいて増強していた。
2. 十分量の生理食塩水で灌流後にラット腎糸球体を単離し reverse transcriptase PCR, ウェスタンブロッティングでは、糸球体にヘモグロビン $\alpha$ および $\beta$ サブユニットがそれぞれ発現していた。In situ hybridization, 蛍光免疫染色でも糸球体メサンギウム領域にヘモグロビンが発現・分布していた。さらに、初代培養メサンギウム細胞でもヘモグロビンサブユニットが発現していた。
3. リボゾーム内部侵入部位 internal ribosome entry site (IRES) 配列を含むプラスミドベクターを用いて、ヘモグロビン $\alpha$ および $\beta$ サブユニット両者を同時に発現させた腎メサンギウム細胞では、培地添加された過酸化水素誘導性の細胞内ラジカル産生が抑制されており、さらにこの強制発現は酸化ストレス負荷時の細胞生存細胞数を増加させた。
4. 新規グロビンとして注目されるサイトグロビンについて、ラットサイトグロビンのポリクローナル抗体を複数作成、この2種類の抗体を用いたラット腎に対する免疫組織化学染色では、正常ラット腎の間質細胞にサイトグロビンが分布していた。
5. 腎虚血再灌流障害によりラット腎間質におけるサイトグロビン陽性細胞数が系時的に増加し、定量 reverse transcriptase PCR, Western blot では腎皮質における同分子の発現が亢進していた
6. CAG ベクターにラットサイトグロビン cDNA を挿入したコンストラクトを作成、受精卵導入し、サイトグロビン高発現ラットを確立した。サイトグロビン高発現ラットは、外見、成長、各臓器組織学的所見において野生型と差異を認めず、また、血圧、腎機能を含む主たる血液・尿検査結果についても同様の結果であった。

7. 虚血再灌流によってラットの腎臓に強烈な低酸素・酸化ストレス刺激を与えた場合、サイトグロビン高発現ラットでは野生型ラットに比して、腎臓の組織障害は軽度で、血清学的にも腎障害マーカーが低値だった。
8. 合成 2 本鎖 siRNA によりサイトグロビン遺伝子発現を抑制した培養ラット腎線維芽細胞株では、培地添加された過酸化水素誘導性の細胞内酸化ストレスが上昇し、その後の生存細胞数が有意に減少した。

以上、本論文は、古典的なグロビン分子であるヘモグロビンが腎糸球体のメサンギウム細胞に発現すること、および、新規グロビン分子であるサイトグロビンが腎間質の線維芽細胞に発現することをまず確認した。さらに、前者は培養細胞系の強制発現実験にて、後者は遺伝子改変動物を用いた生体系の強制発現実験および培養細胞系の発現抑制実験にて、グロビン分子が腎局所において果たす重要な生理作用の一つとして抗酸化ストレス作用が有力であることを示した。本研究はこれまで未知に等しかった腎におけるグロビン蛋白の発現・機能解析を系統的に行っており、腎臓病学およびグロビン生物学の進展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。