

論文の内容の要旨

論文題目 急性腎不全モデルにおけるBasic Helix-Loop-Helix型転写因子MyoRによる再生制御機構の検討

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18年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 上浦 望

MyoR は新規に発見された basic helix-loop-helix 型転写因子で、筋発生を抑制する機能阻害因子である。MyoR の mRNA は胎生 9.8 日のマウス胎芽で発現を認め、胎生 14-15 日にピークを迎えた後に減少する。以前は MyoR が筋組織に限定した発現であると考えられていたが、Liming Yu らは成体のマウスでは MyoR は筋以外にも様々な組織に発現していると報告した。Lu らはホモの MyoR 欠失マウスが、メンデルの法則に従って生まれ、MyoR 単独の欠損では肉眼でわかる範囲で特に異常を認めないが、Capsulin とのダブルノックアウトマウスで顔面の咀嚼筋が欠損することを報告した。しかしながら、成体での MyoR の機能はまだ明らかにされていない。

1996 年に Goodell らは Hoechst 33342 色素とフローサイトメトリーを使用して幹細胞集団を分取する新たな手法を報告した。採取された細胞は Side population (SP) 細胞と呼ばれ、SP 解析は各臓器の組織幹細胞を得る手段として利用されてきた。腎臓の SP 細胞は自己複製能や多分化能という組織幹細胞としての性質をもつことが報告されている。腎臓の SP 細胞では HGF (Hepatocyte Growth Factor)、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)、BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7) などの腎保護因子の発現が高いことが知られており、Challen らは腎臓再生において腎 SP 細胞が重要であることを示している。興味深いことに、MyoR はその腎 SP 細胞に強く発現しており、腎 SP 細胞の機能を制御している可能性がある。

急性腎不全では障害の後に再生過程が働くという特徴があり、BMP-7 などの腎保護因子が重要な役割を担っている。また腎 SP 細胞を投与することにより急性腎障害の再生過程を増強させることができ、SP 細胞が腎臓再生に重要である

ことが報告されている。

本研究では、**basic helix-loop-helix** 型の転写因子である **MyoR** の腎再生における新規の機能を明らかにするため、**MyoR** 遺伝子のホモ欠失マウスを使用した。また腎臓の再生過程をみるために急性腎不全モデルを用いて、**MyoR** 欠失マウスと野生型マウスでの腎保護・腎再生因子について解析した。急性腎不全モデルとしてはシスプラチン腎症モデルを使用した。シスプラチンは複雑なシグナル伝達経路を活性化して尿細管細胞障害あるいはアポトーシスやネクロトーシスをきたすが、最近では特にシスプラチンによるアポトーシスとその分子機構が注目されている。ミトコンドリア障害は、シスプラチンによるアポトーシス誘導の主要なメカニズムとして、その分子機構が明らかにされてきた。シスプラチンによる DNA 傷害は、**ATM** (*ataxia telangiectasia mutated*)、**ATR** (*ataxia telangiectasia and Rad-3-related*) を介して **p53** を誘導・活性化させる。**p53** の活性化により、**p21**、**PUMA** (*Bcl-2 binding component 3*) などの転写が亢進する。DNA 傷害が軽度の場合は **p21** による細胞周期の停止や、**E2F1** を介するアポトーシス促進因子 **Cdk2** (*cyclin dependent kinase 2*) を **p21** が抑制することで DNA 修復に働くが、DNA 傷害が高度になると、**PUMA**、**PIDD** (*p53-induced protein with death domain*)、**Bax/Bak** の活性化などによりミトコンドリア障害が惹起され、カスパーゼの活性化を経てアポトーシスが生じると考えられている。また最近の報告では、**p53** 欠損細胞でもシスプラチンによるアポトーシスが生じることから、尿細管細胞におけるシスプラチンによるアポトーシスには、**p53** 非依存性の経路も重要である。

MyoR は発生過程では多彩な機能をもつことが最近報告されているが、本研究では腎臓の再生・修復機構における **MyoR** の機能解明を試みた。

野生型マウスと比べ **MyoR** 欠失マウスでは、シスプラチン投与により著明な腎機能低下が起こり、腎組織では尿細管壊死が増悪し、生存率も低下した。**MyoR** 欠失マウスでシスプラチン腎症が増悪する原因を調べるため、フローサイトメトリーを用いた腎の **SP** 細胞の定量や、リアルタイム PCR による **BMP-7** の mRNA 発現解析を試みた。**Zeisberg** らはヒト合成 **BMP-7** を投与すると慢性腎障害が回復することを報告した。**BMP-7** はまた腎虚血や腎毒性物質による急性腎障害からの再生にも重要であることが報告されている。**BMP-7** は成体では限られた組織でしか発現を認めず、腎臓での発現が最も顕著であるが、**BMP-7** 遺伝子の腎での発現調節機構は不明である。本研究では野生型マウスの急性腎不全モデルにおいて **BMP-7** の発現が有意に増加することを確認した。しかしながら **MyoR** 欠失マウスの急性腎不全モデルでは、**BMP-7** の発現亢進は認めなかった。最近 **Ebara** らにより、**E-box** 領域 (**CATCTG**) が **BMP-4** の制御に重要な役割をもつことが報告された。**E-box** 領域は **bHLH** 型転写因子に共通した DNA 結合部位であ

り、bHLH 型因子とその E-box 領域は発達段階の多彩な細胞分化に重要な役割を果たしている。MyoR が腎臓 SP 細胞で強く発現していることが報告され、また本研究では MyoR 欠失マウスの SP 細胞上では BMP-7 の発現が有意に低いことがわかり、bHLH 型因子 MyoR は BMP-4 の転写調節と同様に E-box 領域に作用することで、腎臓での BMP-7 の発現を制御している可能性がある。

IgA 腎症モデルマウスやネフローゼ症候群モデルマウスのような慢性腎不全モデルにおいても腎 SP 細胞の数が減少することが報告されているが、本研究では、急性腎不全モデルで腎 SP 細胞が著明に減少することを確認した。また腎 SP 細胞の減少が MyoR 欠失マウスでは有意に増悪することがわかった。腎 SP 細胞は BMP-7 などの液性因子を発現することで腎再生過程を促進させると考えられており、腎 SP 細胞の投与によりアドリアマイシン腎症による急性腎不全からの回復が促進されたとも報告されている。MyoR 欠失マウスの急性腎不全モデルでは、腎 SP 細胞が減少するため腎再生能自体が減弱していると推測された。また MyoR 欠失マウスの腎 SP 細胞で BMP-7 の発現が減少していることより、腎 SP 細胞の組織幹細胞としての機能が一部失われていると考えることができ、これは MyoR 欠損により SP 細胞が non-SP 細胞へと変化する、すなわち SP 細胞の未分化性の維持が障害されている可能性もある。特に急性の組織障害では組織幹細胞は分化しやすい状況にあるため、野生型マウスでは SP 細胞の腎構成細胞への分化は否定的ではあるが、MyoR 欠失マウスではシスプラチン腎症において SP 細胞が分化して失われた可能性も考えられた。

次に、MyoR 欠失マウスの腎尿細管細胞に対してシスプラチンが直接作用するかどうかを検証した。MyoR は腎 SP 細胞では高い発現を示すが、腎の non-SP 細胞においても SP 細胞に比較して非常に低いレベルではあるが MyoR の発現を認めることが報告されている。腎尿細管上皮細胞 (RTECs: renal tubular epithelial cells) も non-SP 分画を構成する主要な細胞であるため、MyoR が RTECs のアポトーシスを制御する可能性が考えられた。そこで腎組織から RTECs を単離して、シスプラチンの RTECs に対する直接作用を検証した結果、シスプラチンの投与により MyoR 欠失マウス由来の RTECs ではアポトーシスが有意に増加し、MyoR が抗アポトーシス作用を持つことが考えられた。また、シスプラチン処置前後の各アポトーシス因子の蛋白発現レベルを検討した結果、MyoR 欠損 RTECs では p53 とリン酸化 p53 のシスプラチンによる発現誘導が減少し、p53 の標的遺伝子である p21 の発現も減少する一方で、Bax の蛋白発現は保たれていた。このため、MyoR 欠損細胞では Bax/p21 比が増大し、アポトーシスが増加すると考えられる。前述のとおり、MyoR 欠失マウスのシスプラチン腎症モデルでは腎臓の SP 細胞が減少し、また腎全体での BMP-7 の発現が低下するが、これらも腎 SP 細胞のアポトーシス、あるいは BMP-7 の産生細胞である尿細管細胞の細胞死が

大きく関与すると考えられる。詳細な機構は今後解明する必要があるが、本研究によりアポトーシスの制御に bHLH 型因子が新たな機能をもつ可能性が示された。

MyoR 欠失マウスの急性腎不全モデルでの解析により、MyoR 欠失マウスでは BMP-7 の発現調節や腎 SP 細胞の生存・維持機構、アポトーシスに異常がある可能性が示唆され、basic helix-loop-helix 型転写因子 MyoR が新たな腎保護作用をもつことが示された。MyoR は哺乳類の発生初期における強力な発生制御因子と考えられているが、本研究により MyoR はアポトーシスや成体の腎局所の組織再生システムにおいても重要な役割をもつことが示唆された。