

審査の結果の要旨

三村 維真理

本研究は慢性腎臓病において重要な役割を果たす腎尿細管間質の低酸素状態において、腎臓線維芽細胞に発現する新規グロビン蛋白サイトグロビン (Cytoglobin) の役割を明らかにするため、慢性腎不全モデル (6 分の 5 腎摘) を用いてサイトグロビンの抗線維化作用を示したものであり、下記の結果を得ている。

1. サイトグロビンに対するラビットポリクローナルラットを作成し、慢性腎不全モデルの腎尿細管間質におけるサイトグロビン発現量を解析した結果、作成から 9 週後にサイトグロビンは有意に mRNA レベルおよび蛋白レベルで増加していた。さらに線維化の指標である Collagen I, Collagen IV も 9 週後までに同様の増加傾向を示した。サイトグロビンと Collagen IV の 2 重染色では腎間質に増加した Collagen IV の近傍にサイトグロビンが発現しており、相関があることが示された。
2. サイトグロビンを全身に過剰発現させたトランスジェニックラット (Cygb-Tg) を作成した。トランスジェニックラットに慢性腎不全モデルを作成し、9 週後までの腎機能 (血清クレアチニン値、尿たんぱく量)、収縮期血圧を測定したところ、血清クレアチニン値は有意に wild type よりも Cygb-Tg のほうが軽減していた。尿蛋白量および収縮期血圧の平均値も Tg ラットで軽快傾向を認めた。さらに、9 週後の wild type および Cygb-Tg ラットの免疫染色を行い、Collagen I, Collagen IV, Masson's Trichrome Staining, alpha-smooth muscle actin (myofibroblast のマーカー), ED-1 (浸潤マクロファージのマーカー) がすべて Cygb-Tg ラットで軽減していることを確認した。
3. サイトグロビンを過剰発現すると慢性腎不全モデルの腎間質の線維化が軽減するメカニズムを解明するため、酸化ストレスのマーカーである Nitrotyrosine の免疫染色をおこなったところ、Cygb-Tg ラットは wild type より酸化ストレスが軽減していることが明らかになった。さらに酸化ストレスの別のマーカーである尿中 8OHdG も同様の結果を得られた。In vitro では正常ラット線維芽細胞 (NRK49F: normal rat kidney cell line 49F) を用いてサイトグロビンを一時的に過剰発現させると ROS (reactive oxygen species) レベルが軽減することを確認した。
4. 上記の結果を in vitro において、サイトグロビンを過剰発現させたときに Collagen I の産生量が軽減されることを示した。まず、wild type と Cygb-Tg ラットの腎間質の線維芽細胞を採取し、Primary culture を行った。WT, Tg の primary cultured cells が産生する Collagen I の産生量を mRNA レベルおよび蛋白レベル (ELISA にて評価) で測定したところ、Tg のほうが有意に Collagen I 産生量が低下していた。さらに NRK49F にサイトグロビンを過剰発現させたとき transient transfection, テトラサイクリン誘導 stable cell line とともに Collagen I 産生量は過剰発現で軽快した。

5. サイトグロビンの抗線維化作用の分子メカニズムを明らかにするため、サイトグロビン分子の構造の中で酸素と結合能があると推測される heme の領域にアミノ酸配列で Histidine→Tyrosine の mutation を入れてサイトグロビンを過剰発現させたところ、Collagen I 産生量の軽減効果は消失した。このことからサイトグロビンの酸素結合能が抗線維化作用に関与している可能性が示唆された。サイトグロビンは慢性腎不全に対する抗線維化作用を有する新規グロビン蛋白で、慢性腎不全の治療薬として可能性を有した分子である。

以上、本論文は慢性腎不全の腎尿細管間質に発現するサイトグロビンの解析からその抗線維化作用を明らかにした。本研究は慢性腎不全における新たな治療薬の開発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。