

血漿クレアチニン濃度の低下，クレアチニンクリアランスの上昇，尿蛋白量の抑制傾向作用を示し、病理学的所見においては、高食塩負荷による糸球体の硬化，細動脈の硬化，増殖及び尿細管間質の線維化が改善され、さらに高食塩負荷で起こる MCP1 やニトロチロシンの集合管，ヘンレ上行脚および遠位尿細管への発現を ONO-8809 の投与が改善した。以上より，食塩負荷により増悪する腎機能障害や、TXA₂ を介した細動脈周囲への MCP1，ニトロチロシンなどの炎症因子による腎障害を TPR 拮抗薬の ONO-8809 が改善したことから、食塩過負荷では TXA₂ 産生増加を介して腎障害が進行するが TPR 拮抗薬がそれを抑制する有効な薬物であるとの結果を得た。

【結論】本研究では，腎障害モデルとして高食塩負荷 SHRSP を用い，TPR 拮抗薬である ONO-8809 の腎保護作用について検討を行った。その結果，高食塩負荷 SHRSP において，ONO-8809 の慢性投与が腎機能の悪化を防ぎ、腎組織の炎症を改善して細動脈硬化や増殖を抑制した。すなわち、TPR 拮抗薬が腎障害の悪化の予防に有効であることを見出した。

以上の研究法や解析法は当を得たもので臨床治療上に重要な見解を導き出した。医学博士の学位授与に値する成果であると考える。

氏名	木下孝昭
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第1060号
学位授与の日付	平成23年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Whole rat DNA array survey for candidate genes related to hypertension in kidneys from three spontaneously hypertensive rat (SHR) substrains at two stages of age and hypotensive induction caused by hydralazine hydrochloride (高血圧自然発症ラット (SHR) 3亜系の加齢およびヒドララジン負荷血圧降下誘発による DNA マイクロアレイを用いた腎臓における高血圧関連遺伝子の探索)
論文審査委員 (主査)	教授 東野英明
(副主査)	教授 西尾和人
(副主査)	教授 宮崎俊一

論文内容の要旨

【目的】

高血圧症発症に関わる遺伝子検索は、その原因と対策に必要な喫緊の重要な課題である。そこで、ヒトの高血圧症の一モデル動物と考えられる高血圧自然発症ラット（SHR）3 亜系の腎臓を用いて、DNA アレイ法により網羅的発現遺伝子検索をした。

【方法】

正常血圧ラットとして雄性的 WKY/1zm を、高血圧ラットとして雄性的 SHR/Kpo, SHRSP/Kpo, M-SHRSP/Kpo の 6 週齢（未昇圧期）と 9 週齢（昇圧期）の各 3 尾を選び、腎臓を摘出してホモジナイズし mRNA 分画を得た。発現した mRNA を cyanine 3-CTP で標識しつつ増幅させ、アジレント社製ラット全遺伝子 DNA アレイ（44K）と反応させて遺伝子発現量を測定した。各群間の発現量を WKY サンプル平均値と比較してその大小の差異を、SHR 群の WKY 群に対する差として捉え、有意差のある遺伝子を抽出した（Method 1）。更に、各群共に週齢の進行により血圧差が拡大するため、週齢進行により変化する遺伝子を抽出し（Method 2）、また、降圧薬のヒドララジン投与による降圧により変化する遺伝子を Method 3 として抽出して総合的に血圧によって変化する遺伝子発現を特定して考察した。

【結果】

Method 1：6 週齢と 9 週齢で WKY より SHR, SHRSP, M-SHRSP で共通して高発現していたのは、*Gc, Dusp15, Sugt 1, Cyp8b1, Armc 3, Serpina3m, Bri3bp, Gtpbp4, Mettl2, Mapk14, Prkar2b* 遺伝子で、低発現していたのは *SclB, Hmnr, frame 12, Ephx2, Anxa13, Myr8, Pcdh9* 遺伝子であった。

Method 2：加齢の進行により WKY より SHR, SHRSP, M-SHRSP で共通して高発現したのは、*Nef3, Slc26a4, Cyp2C, Gfra1, Resp18* を含む 8 遺伝子で、低発現していたのは *Atp12a* and *Hbb* の 2 遺伝子であった。

Method 3：Method 2 と関連してヒドララジン降圧により変化した遺伝子は、*TC550463* (farnesyl pyrophosphate synthetase), *Kcnc3, Vnn1, RGD1561143* (similar to cell surface receptor FDFACT), *TC560558* (FK506-binding protein 1B), *TC564079* (*Drosophila melanogaster*), *XM_343516* (similar to sulfotransferase K2), *Gabraq* と 5 未解明遺伝子であった。

【考察】

SHR, SHRSP, M-SHRSP の 3 亜系について亜系間、週齢間、ヒドララジン降圧負荷の 3 方法で有意に変化した遺伝子 mRNA 発現を調べたところ、それぞれについて多くの遺伝子発現変化が観察された。亜系間の変化で観察された遺伝子を Reactome 遺伝子バンク情報で調べたところ、その多くが生体内酸化反応や脂質代謝に関係し、週齢間で有意に変化した遺伝子の多くが核酸代謝に関係し、ヒドララジン降圧負荷で有意に変化した遺伝子の多くが DNA 複製や細胞分裂反応に関係していた。したがって、SHR の高血圧発症と関連性が高い遺伝子は Method 2 と 3 で抽出された遺伝子の中にある可能性が高いと考えられた。未だいくつかの機能不明遺伝子を含むため、今後更なる解明努力が求められる。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 23 年 2 月 日 公表予定	出版物名 Experimental and Therapeutic Medicine 第 2 巻 第 1 号
	公 表 内 容	2011 年 2 月 1 日 発行予定
	全 文 と 要 約	

論文審査結果の要旨

高血圧発症に関わる遺伝子検索をヒトの高血圧症のモデル動物と考えられる高血圧自然発症ラット (SHR) 3 亜系の腎臓を用いて、DNA アレイ法により網羅的に発現遺伝子検索を行った。正常血圧ラットの WKY を対照として、高血圧ラットの SHR (高血圧自然発症ラット)、SHRSP (脳卒中易発性 SHR)、M-SHRSP (悪性型 SHRSP) の 6 週齢 (昇圧初期) と 9 週齢 (昇圧期) の腎臓が発現する mRNA を全遺伝子 DNA アレイ (Agilent 社製) を用いて血圧によって変化する遺伝子を特定しようとした。また、Reactome 遺伝子バンク情報を用いて、それら抽出遺伝子が関与する生体反応系から、より高血圧発症や維持・進展と関連性が高いと思われる遺伝子の特定に努めた。

【方法】

無負荷の 6 週齢と 9 週齢の各 3 尾からなる雄性 WKY, SHR, SHRSP, M-SHRSP から腎臓を摘出してホモジナイズし mRNA 画分を得た。また、降圧薬のヒドララジン (30mg/kg/day) を 2 日間負荷した後に摘出した腎臓からも mRNA 画分を得た。発現した mRNA を Low RNA Input Amplification kit を用いて cyanine3-CTP で標識しつつ増幅させ、アジレント社製ラット全遺伝子 DNA マイクロアレイ (44k) と反応させてハイブリダイゼーションを行った。アレイに蛍光標識されて結合した約 60 塩基からなる mRNA 断片量を Agilent GenPix Scanner で読み取り、BRArray Tool software により発現量を平準化して、各群間の発現量比較を $P < 0.01$ を有意差レベルとして各群間で比較解析した。なお、発現遺伝子 mRNA は NCBI RefSeq データベースで照合して 60 塩基の内、一致する塩基数が 50 以上、または誤差範囲が 5×10^{-5} 以下の場合に同一遺伝子として同定した。各群間の比較は、血圧に関係する遺伝子を抽出したいため、以下の 3 方法によって実施した。Method1: 各群間の発現量を WKY サンプル平均値と比較してその大小の差異を各 3 亜系 SHR 群の WKY 群に対する差として捉え、有意差のある遺伝子を抽出した。Method2: 各群共に週齢の進行により血圧差が拡大するた

め、週齢進行により変化する遺伝子を抽出した。Method3: 各群内で降圧薬のヒドララジン投与によって変化する遺伝子を抽出した。

【結果】

Method 1: 6 週齢と 9 週齢で WKY より SHR, SHRSP, M-SHRSP で共通して高発現していたのは、Gc, Dusp15, Sugt 1, Cyp8b1, Armc 3, Serpina3m, Bri3bp, Gtpbp4, Mett12, Mapk14, Prkar2b 遺伝子で、低発現していたのは Sc1b, Hmnr, frame 1 2, Ephx2, Anxa13, Myr8, Pcdh9 遺伝子であった。高発現遺伝子を Reactome 解析すると、Yc2, Cyp2c, Gsta3, Cyp8b1 の 4 つの遺伝子が生物学的酸化過程に高い関連性を示し、RGD1564999, Hmgcs2, Apob, Apt1c1, Acox2, Angpt14, Cyp8b1 の 7 つの遺伝子が、脂質とリポタンパク質代謝過程に高い関連性を示していた。Method 2: 加齢の進行により WKY より SHR, SHRSP, M-SHRSP で共通して高発現したのは、Nef3, Slc26a4, Cyp2c, Gfra1, Resp18 を含む 8 遺伝子で、低発現していたのは Atp12a と Hbb の 2 遺伝子であった。高発現遺伝子を Reactome 解析すると、Slc28a1, Xdh, Gda の 3 つの遺伝子が核酸代謝に関連性を示したが、他の過程との間では有意な関連性は認められなかった。Method 3: Method2 と関連してヒドララジン降圧により変化した遺伝子は、TC550463 (farnesyl pyrophosphate synthetase), Kcnc3, Vnn1, RGD1561143 (FDFACT), TC564079 (Drosophila melanogaster), XM_343516 (sulfotransferase K2), Gabrq と 5 未解明遺伝子であった。高発現遺伝子を Reactome 解析すると、DNA 複製と細胞増殖の過程に関連した多くの遺伝子、例えば Psmc6, Psma2, Psma6 と LOC311078 が SHRSP におけるヒドララジン投与により有意に変化していた。

【考察】Method1 でより高発現の遺伝子は、6 週齢では酸化反応過程に、9 週齢では脂質とリポタンパク質の代謝過程に非常に関連が強かった。したがって、Method1 で高発現の遺伝子の特徴は SHR の亜系と WKY との間で主に代謝に関係

していると考えられた。Method 2 では、エネルギー産生と消費、またはイオン交換に関係している Slc26a4, Cyp2c, Gfra1, Resp18, Atp12a を含む遺伝子が密接に高血圧に関係しているかもしれなかった。Method 3 では、いくつかの遺伝子が DNA 複製に関係があり、Psmc6, Psm2, Psm6, LOC311078 を含む細胞増殖に関係する遺伝子が 6 週齢の SHRSP において抽出された。したがって、Method 2 と 3 で抽出された遺伝子の中に高血圧と関連している遺伝子がある可能性が高いと考えた。

【結論】SHR、SHRSP、M-SHRSP の 3 亜系について亜系間、週齢間、ヒドララジン降圧負荷の 3 方法で有意に変化した遺伝子 mRNA 発現を調べたところ、それぞれについて多くの遺伝子発現変化が観察された。亜系間の変化で観察された遺伝子を Reactome 遺伝子バンク情報で調べたところ (Method 1)、その多くが生体内酸化反応や脂質代謝に関係し、週齢間で有意に変化した遺伝子 (Method 2) の多くが核酸代謝に関係し、ヒドララジン降圧負荷で有意に変化した遺伝子 (Method 3) の多くが DNA 複製や細胞分裂反応に関係していた。したがって、SHR の高血圧発症と関連性が高い遺伝子は Method2 と 3 で抽出された遺伝子の中にある可能性が高いと考えられた。未だいくつかの機能不明遺伝子を含むため、今後更なる解明努力が求められる。

以上のように、未だ目的を達することができなかったが、膨大なデータを新しく考え出した比較解析法で高血圧関連遺伝子を探索しようとした研究で、医学博士の学位授与に値する成果であると考えられる。

氏 名	遠藤 宏
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医第 1061 号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Catecholamine and Corticosteroid Secretion and Gene Expression of the Synthesizing Enzymes in Adrenal Glands of SHRSP and WKY Aged 6 and 9 Weeks in Response to Cold Stress (6 および 9 週齢の SHRSP と WKY における寒冷ストレス負荷後のカテコールアミンおよびコルチコステロイド分泌と副腎合成酵素遺伝子発現の関連について)
論文審査委員 (主査)	教授 東 野 英 明
(副主査)	教授 池 上 博 司
(副主査)	教授 宗 像 浩