

氏名(本籍)	菅谷 健 (兵庫県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1558号
学位授与年月日	平成11年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	RENAL STRUCTURE AND FUNCTION OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR TYPE 1a DEFICIENT MICE (アンジオテンシンⅡ受容体タイプ1a遺伝子欠損マウスにおける腎臓の形態と機能)
主査	筑波大学教授 農学博士 馬場 忠
副査	筑波大学教授 理学博士 宗像 英輔
副査	筑波大学教授 農学博士 深水 昭吉
副査	筑波大学助教授 医学博士 中山 和久

### 論文の内容の要旨

レニン・アンジオテンシン系(RA系)は、生体内の水・電解質バランスおよび血圧の調節に重要な役割を果たしている。主に、肝臓で合成されるアンジオテンシノーゲンは、腎臓で合成分泌されるレニンによりアンジオテンシンⅠに分解され、さらにアンジオテンシン変換酵素により、アンジオテンシンⅡ(AⅡ)に変換される。このAⅡは特異的な受容体と結合し、直接、血管平滑筋を収縮させ、あるいは、副腎からのアルドステロン合成分泌を介して、ナトリウムの貯留、血流量の増加を引き起こすことにより、血圧を上昇させる。

心・血管系や腎臓の機能障害は、遺伝的にも、環境的にも多因子疾患であると考えられているが、その病態を理解する上で、遺伝学的多型解析とともに、実験動物を用いた発生工学的研究は、大きな知見をもたらしてくれる。本研究では、近年これら疾患との多型解析の進むRA系について、発生生物学的手法を用い、アンジオテンシンⅡ受容体遺伝子が欠損させたマウスを作製し、以下の点を明らかにした。

(1)薬理学的解析によって、RA系の生理作用の多くはType 1受容体(AT1)を介するものと考えられている。AT1には2種のサブタイプ(AT1a, AT1b)が報告されているが、これらは互いにアミノ酸レベルで90%以上の相同性を有し、両者を区別するアンタゴニストが存在しないことから、その生理機能や正確な発現細胞は明確になっていない。そこで著者らは、AT1a遺伝子座をレポーター遺伝子LacZに置換したノックアウトマウス作製を試みた。

AT1aの翻訳領域の開始コドンにインフレームでLacZが導入され、ポジティブ選択マーカーにneo, ネガティブ選択マーカーにヘルペスウイルスチミジンリン酸化酵素(HSV-tK)が接続されたターゲティングベクターを用いて、変異マウスが得られた。このうちヘテロ接合体では、レポーター遺伝子の発現(LacZの発色反応)を指標にして細胞を同定することにより、もう一方の染色体遺伝子座上で維持されている機能的なAT1a遺伝子の発現調節について調べることができる。またホモ接合体では、AT1a遺伝子が両遺伝子座で欠損した場合の生理機能や発現細胞の変化を調べることができる。

AT1a遺伝子の腎臓における発現をノーザン解析により調べた結果、ヘテロ接合体で半分以下に、ホモ接合体では完全に消失していたことから、本動物がAT1a遺伝子欠損マウスであることが確認された。また、AT1a遺伝子の発現を組織学的に検討した結果、in situ hybridizationによるmRNAの局在と、レポーター遺伝子LacZによる染

色像とが一致した。このことは、得られた変異マウスにおける AT1a 遺伝子の発現制御が、置換された LacZ の染色により検出できることを示している。ヘテロ接合体の腎臓皮質部においては、糸球体、傍糸球体装置、尿細管、特にメサンギウム細胞と輸入、輸出細動脈に強いシグナルが見られた。さらに、ホモ接合体では、腎傍糸球体細胞に顕著な過形成と強い LacZ の誘導が観察されるとともに、腎臓のレニン遺伝子の発現、血中の活性型レニン活性の著しい上昇が認められた。

また、悲観血式に血圧を測定した結果、ヘテロおよびホモ接合体の収縮期血圧は野性型に比して、それぞれ 10 および 22mmHg 低い値を示した。これは、AT1a 遺伝子欠損マウスの血圧を直接法で測定した Ito らによる報告と良好な一致を示した。著者と同じ研究室の Tanimoto らが作製したアンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスのホモ接合体の野性型に対する収縮期血圧の低下率（収縮期血圧で 33mmHg, 拡張期血圧で 14mmHg 低下）が、AT1a 遺伝子欠損マウスのそれに比して、より大きいことから考えると、他の RA 系受容体サブタイプを介する血圧調節機構の存在も予想され興味深い。

AT1a 遺伝子欠損マウスは、ヘテロおよびホモ接合体で段階的に低血圧を示す一方、レニン産生に関しては、ホモ接合体のみで著しい誘導がみられた。このことは、AT1a 遺伝子の変異が、血圧の維持に関しては優性の形質として、またレニン産生細胞におけるネガティブフィードバックに関しては劣性形質として現れることを意味しており、AT1a を介するシグナルが他の調節機構で補償し得ない、重要かつ特異的な役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに、免疫学的機序による腎障害の進展におけるアンジオテンシン II の役割について検討するため、AT1a 遺伝子欠損マウスに NTS (Nephrotoxicserum) を投与して腎炎を惹起し、経時的に尿中蛋白排泄量の測定、および、LacZ の発現を指標として AT1a プロモーターの活性化部位を解析した。その結果、尿蛋白は腎障害の発症の初期においては、野性型マウス > ヘテロ > ホモ接合体の順で、本モデルの発症が AT1a の発現量に依存することが示唆された。AT1a プロモーターの活性化部位を免疫組織化学的に解析した結果、NTS 投与後、12 週目においては糸球体メサンギウム、傍糸球体装置に加えて尿細管を取り巻く間質領域においても認められるようになった。連続切片による組織学的解析から、この AT1a プロモーターの活性化部位は間質細胞の形質変換マーカーである  $\alpha$ -SMA や vimentin の発現部位と一致し、さらに I 型コラーゲンをはじめとする細胞外基質の発現部位と一致した。このことから、障害局所において AT1a のプロモーターが活性化されることが明らかになり、アンジオテンシン II が腎間質障害の進展に深く関わっていることが示唆された。

(2) さらに、ノックアウトマウスから得られた知見を、ヒトの腎疾患の発症・進展機序解明に役立てるため、ヒト腎臓におけるアンジオテンシン II 受容体サブタイプの発現様式と細胞局在を解析した。その結果、正常組織における AT1 の局在はヘテロ接合体マウスと一致したのに対し、病変部では、糸球体周囲の線維芽細胞に強い発現が見られ、腎疾患予後との相関が臨床的に確認されている腎間質障害に、AT1 を介するシグナルが関与している可能性が示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、生体内の水・電解質バランスと血圧調節に重要な役割を果たしているアンジオテンシン II の受容体サブタイプ AT1a 遺伝子を欠損するマウスを作製してその解析を行っている。得られた AT1a 欠損マウスでは腎傍糸球体細胞に顕著な過形成が観察され、収縮期血圧も野性型に比べて 22mmHg ほど低い値を示した。このことは AT1a 遺伝子の変異が血圧の維持に関しては優性の形質として作用し、AT1a を介するシグナルがほかの調節機構で補償することができない重要かつ特異的な役割を果たしていることが明らかとなった。また、免疫学的機序による腎障害の進展におけるアンジオテンシン II の役割を検討するため、AT1a 遺伝子欠損マウスに NTS (nephrotoxic serum) を投与して腎炎を惹起し経時的に尿中蛋白排泄量を測定したところ、尿蛋白の検出は腎障害

の発症の初期では野性型マウス>ヘテロ>ホモ接合体の順であり,その発症がAT1aの発現量に依存する可能性を示した。さらに,ヒトの腎疾患の発症・進展機序解明に役立つため,ヒト腎臓におけるアンジオテンシンⅡ受容体サブタイプの発現様式と細胞局在も解析し,正常組織におけるAT1の局在はヘテロ接合体マウスと一致したのに対し,病変部では糸球体周囲の線維芽細胞に強い発現が見られ,腎疾患予後との相関が臨床的に確認されている腎間質障害にAT1シグナルが関与する可能性も見出した。

以上の研究は,アンジオテンシンⅡ受容体の個体機能を明らかにしただけでなく,その病態生理学作用に踏み込んで研究を行ったものである。小学校から検尿を義務づけている国は世界でも日本以外には例がなく,腎臓の機能解析に焦点を絞ったことは社会に貢献しようとする姿勢がうかがえ高く評価することができる。また,作製した遺伝子欠損マウスのモデル動物としての利用価値を示し,ヒトの病態と比較検討したことも高く評価できる。

よって,著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。