

cDNAアレイ法を用いた急性腎不全における腎機能回復の可能性の予測

●野入 英世

東京大学医学部附属病院

研究の目的と進め方

急性腎不全は、病態の理解や外科手技、集中治療の進歩にも拘わらず、未だに入院患者の約5%が罹患し、そのうちの死亡率は50%以上である。この統計学的数字は過去30年間に渡って変わっていない。動物を用いた基礎実験モデルでは、急性腎不全の発症の時期が一定であるのに対して、実際の臨床では「発症が何時か？」が不明なことが多く基礎実験での成果を十分に臨床で生かすことができなかつた。即ち基礎実験データをもとにした臨床治験へ参加する患者は、急性腎不全の初期の状況であるか、回復期であるか、慢性化への移行期であるかによって層別化されるべきであるが、一定の判断が下せないためこれらが混在化して登録され、データがまとまらず治験が失敗するという基本的な問題点があったことが、国際的にもANP、IGF-Iなどの治験で示されている。このような問題点を克服し今後の医学・医療の進歩を築いていくためには、臓器がストレスに晒された後(急性腎不全後)どのような状況下にあるかを客観的に判断できる指標が必要である。

cDNAアレイ法は大量のターゲットを要するため、理論的に確立されているにも拘わらず多くの研究室でなかなかうまくいかず、国際的にも極少数の報告にとどまっていた。本検討ではこれに対する対策として、ターゲットの増幅法を確実に大量の試料が得られるマウス・ラット虚血再灌流モデルの腎臓で試みると共に、近年我々のグループが開発した(Kidney Int 56: 74,1999)培養ヒト近位尿細管細胞と低酸素ストレス法を用いて、*in vitro*の純粋な系ではこれらのストレス負荷後、どのような遺伝子アレイが経時的に発現・消失していくのかをcDNAアレイ法を用いて解明することとした。

2001年度の研究の当初計画

虚血再灌流障害の病態の首座は近位尿細管上皮細胞であり、まずヒト培養細胞の系での低酸素再酸素化によるストレス法を確立することを目指した。次に低酸素再酸素化によるストレス法のうち、ヒト近位尿細管上皮細胞が回復する場合に発現する遺伝子と回復しない場合に発現する遺伝子を比較検討し、回復(可逆性)と回復不能(不可逆性)を分けうる候補遺伝子群を決定することとした。

次に、*in vivo*の系としてマウスおよびラットを用いての虚血再灌流障害モデルを作製し、*in vitro*と同様の手法により候補遺伝子群を割り出すこととした。

2001年度の成果

虚血再灌流障害の*in vitro*モデルの開発を行った。当初低酸素化には酸素濃度5%のインキュベーターを用いたが、細胞障害が不十分であったため、嫌気バック法に切り替えた。低酸素化時間は約8時間以上で細胞障害を生じることが確認された。また再酸素化によりcell monolayerの回復が約2~4時間で生じることが低酸素化時間12時間まで確認され、これ以上の低酸素化時間では不可逆性に転ずることを確認した。この結果を踏まえてcDNAアレイ法を行い、発現の増減が1.8倍以上あるものを有意と判断した。また、2~3回の実験で再現性のある結果を採用した。遺伝子総数3,528をClonTech社製nylon membrane cDNAアレイで解析した。低酸素ストレスに対して可逆的な実験方法(低酸素5時間+再酸素5時間)

では対照群に対してセリン・プロテアーゼ、Raf反応性蛋白の遺伝子群が発現増強を認めた。一方、非可逆的な実験群(低酸素15時間+再酸素5時間)は対照群に対してG1/S cyclin, IL-1受容体の遺伝子群が発現増強を認め、*in vitro*の系ではこれらが病態把握に役立つ有用遺伝子であることが示唆された。次に*in vivo*の実験としてマウスの虚血再灌流モデルでの実験を行った。マウスは遺伝子操作動物が多く有用性が高いと考えられたため、こちらを優先した。マウスでは可逆性のモデルとして15分間の虚血時間と24時間の再灌流時間、不可逆性モデルとして虚血時間45分間、再灌流時間24時間をとった。虚血再灌流腎障害の首座である腎皮髄境界部組織により遺伝子総数2,370をClonTech社製nylon membrane cDNAアレイで解析した。可逆性モデルでは、FK506結合蛋白の発現増強を認めた。不可逆性モデルでは、mitogen activated protein kinaseや5' nuclease, IL-18などの発現増強を認めた。ラミニン, colony stimulating factorおよびその受容体の発現の低下は可逆性・不可逆性の両モデルにおいて認められた。

この他、eNOS exon 7の点変異Glu298Aspが2型糖尿病性から腎機能廃絶に至ったグループにおいて健康人よりも有意に高く疾患感受性遺伝子であるという成果を得た。同時に同変異の安定発現細胞系を樹立し、点変異の有無によりNO産生に有意差があることを見いだした(投稿中)。

国内外での成果の位置づけ

急性腎不全に対して、cDNAアレイ法またはマイクロアレイ法を用いて臨床経過を予測する手法は、現時点まで国内外において発表されたことはなく、依然として独創性の高い研究内容である。急性腎不全におけるオーダーメイド医療を確立する上で極めて重要である。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

予想外の困難としては、当大学の動物実験施設内ラット・マウスのフロアーに感染症が発生し約半年使用停止となったため、*in vivo*実験の進行に大きな遅れを生じた。また、マウスではまず虚血再灌流モデル自体が十分確立しておらず、再現性のあるデータを得るための実験手技の調整に時間要した。特に温度管理は重要であった。当初C57/BL, BDF1などの系統で行ったが、再現性が十分に得られなかった点もかなり予想外であった。近交系ICRを用いて良好な再現性を得ることができた。ラットにおける同様の実験は現在進行中であり、年度内には結論を得られる見込みである。

今後の課題

ヒト腎移植後の腎生検標本において、本検討で得られた成果を評価していきたいが、*in vitro*と*in vivo*で有用遺伝子に差異が生じており、この部分の評価が十分ではない。その原因としては、*in vivo*では近位尿細管細胞以外の部分も解析に含まれており、これらがノイズとなっている可能性があげられる。また、モデルに対する種差の影響も考慮する必要がある。従って、若干幅広く候補有用遺伝子群をとりあげ、これを腎生検標本の一部においてテストすることで、絞り込みの作業を行う必要があると考える。