

氏名 水谷 健一
 学位(専攻分野) 博士 (人間・環境学)
 学位記番号 人博第141号
 学位授与の日付 平成14年3月25日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 研究科・専攻 人間・環境学研究科人間・環境学専攻
 学位論文題目 本態性高血圧の成因解明に向けて
 ——モデル動物を用いた分子病態学的解析——

論文調査委員 (主査) 教授 津田 謹 輔 教授 森谷 敏 夫 教授 中村 榮 太郎

論 文 内 容 の 要 旨

本態性高血圧の成因は、遺伝素因と環境要因が関与している。遺伝素因については、複数の遺伝因子が複合した多因子遺伝によると考えられている。高血圧症の問題となる点は、長期持続した場合、脳、心臓、腎臓などに重篤な合併症を誘発し、患者の生命に影響を及ぼす点にある。従って高血圧症の大半を占める本態性高血圧の成因を明らかにすることは、極めて重要な課題となる。

本論文では、本態性高血圧症の成因という視点から、第一に、高血圧自然発症ラット (SHR) で顕著に認められる糖化反応後期反応生成物 (AGEs) の蓄積についてその機序を明らかにするとともに、AGEs の酸化障害を中心とした病態への関連性を検討した (第二章)。第二に、高血圧の成因の中で特に神経性の調節因子を解明する目的で、体系的遺伝子発現情報を解析し、SHR と正常血圧ラットである WKY 間の副腎髄質で顕著に発現量の異なる遺伝子を見出した。その候補遺伝子の詳細な解析を行い、高血圧の成因における意義を考察した (第三章)。

大血管の力学的特性は、脈圧に大きく反映することが知られているが、これは主な構成成分である細胞外マトリックスの質的・量的変化に依存する。本研究では、細胞外マトリックスに形成される架橋成分の一つであり、その力学的特性に密接に関与する AGEs に着目した。すなわち SHR では WKY と比較して、糖化反応の代謝産物である血清中のアマドリ化合物、および AGEs 前駆体である 3-デオキシグルコソンの増加が確認され、その結果、大動脈における AGEs の蓄積が亢進していることが明らかとなった。また、SHR、および WKY 大動脈から採取した血管平滑筋細胞を用いた in-vitro の評価系で、AGEs が血管平滑筋細胞における増殖性、DNA 合成能、タンパク合成能、および酸化障害の亢進に関与していることを明らかにした。加えて AGEs 阻害剤の投与は、SHR で顕著に血圧を抑制するとともに、大動脈における内皮型 NO 合成酵素、および尿中 NO 排泄量を有意に促進することが確認された。また、AGEs 阻害剤の投与は、大動脈におけるグルタチオンペルオキシダーゼの mRNA 発現レベルを亢進するとともに、血清脂質過酸化量や酸化 DNA 障害のマーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの排泄量を有意に抑制した。すなわち、SHR における AGEs の蓄積が血管壁の肥厚、酸化障害の亢進、ひいては高血圧の発症、進展に密接に関与している可能性が示された。

次に、SHR 高血圧における中枢系の調節に関与する原因遺伝子を見出すことを目的として、DNA マイクロアレイを活用して、SHR-WKY 間の副腎髄質で顕著に発現量が異なる遺伝子を網羅的に解析した。その結果、 α -actinin associated LIM protein, 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase, および Kynureninase 等の遺伝子が SHR-WKY 間で顕著に発現量が異なることが明らかとなった。特に、Kynureninase 遺伝子は、グルタミン酸のアンタゴニストであるキヌレニン酸の代謝に影響を及ぼしうる遺伝子であることから、特に着目し、詳細に解析を行った。まず、SHR と WKY の交配によって F2 世代のラットを作製した。これら F2 世代ラットの表現型と、Kynureninase 遺伝子の遺伝型の連鎖解析を検討したところ、Kynureninase 遺伝子の遺伝型は収縮期血圧と有意に相関することが明らかとなった。さらには、量的形質遺伝子座位 (QTL) の解析により、Kynureninase 遺伝子がラット染色体 3 番に位置し、収縮期血圧に関する QTL のピークと

Kynureninase 遺伝子の染色体上での位置が一致することが確認された。また、SHRにおけるKynureninase mRNAの発現レベルは、脳幹で3倍、および副腎髄質で10倍程度、WKYと比較して高値を示すことが確認された。さらには、Kynureninase mRNAの開始コドンに対応したアンチセンスオリゴヌクレオチドと正電荷脂質との複合体を作製し、頸部静脈より投与したところ、血圧が10日以上にわたって抑制されるとともに、24時間尿中のカテコールアミンが有意に抑制されることが確認された。すなわち、Kynureninase 遺伝子がSHR高血圧の原因遺伝子の一つである可能性が示唆された。

以上のように、本論文は糖化反応、およびキヌレニン経路が高血圧の成因と密接に関与する可能性を示したものであり、新たな治療法、予防法の開発に貢献するものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本学位申請論文は、本態性高血圧の成因におけるグリケーションカスケードとキヌレニンカスケードの役割について、モデル実験動物を用いた分子生物学的成果を報告している。

第一章では、この研究題目に関わるこれまでの諸研究の成果と問題点に触れ、当該研究の動機付けと目的が述べられている。

第二章では、高血圧自然発症ラット（SHR）では、正常血圧ラットであるWKYと比較して、糖化反応の代謝産物である血清中のアマドリ化合物、および糖化反応後期反応生成物（AGEs）前駆体が増加していること、同時に大動脈におけるAGEsの蓄積が亢進していることを確認した。また、SHRとWKY由来の血管平滑筋細胞で比較すると、AGEsは血管平滑筋細胞の過剰増殖や肥大を促進し、特にこれがSHRで顕著に観察される現象であることを指摘した。SHRにおけるAGEsの重要性は、AGEs阻害剤の投与がSHRの高血圧、酸化障害を顕著に抑制することからも裏付けられた。これら一連の実験から、SHR高血圧の成因として報告されている血管平滑筋細胞の増殖亢進、および酸化ストレスの亢進にAGEsが関与していることを明らかにした。本章で得られた実験結果は、SHRで糖化反応の亢進に起因した酸化障害が様々な高血圧の成因に関与することを実証した世界で最初の病態生理学的知見として高く評価でき、Journal of Hypertensionを含む多数の国際誌に報告した。

第三章では、DNAマイクロアレイを用いた体系的遺伝子発現情報解析によって、SHRとWKYの副腎髄質で極めて発現量の異なる遺伝子を網羅的に解析し、Kynureninase 遺伝子を候補遺伝子として見出した。WKY、およびSHRのゲノムDNAから増幅されたKynureninase 遺伝子のエクソン、イントロン上の詳細な塩基配列の解析から、遺伝的多型を確認した。また、WKYとSHRの交配によって作製したF2世代ラットの連鎖解析から、Kynureninase 遺伝子のSHR型のホモはWKY型のホモと比較して顕著に血圧が高値を示すことを指摘した。続いて、Kynureninase 遺伝子がラット染色体3番に位置し、この染色体上での位置がF2世代ラットの血圧に関する形質遺伝子座位と一致することを示した。WKY-SHR間の様々な臓器における発現レベルの比較によって、脳幹と副腎髄質のみで顕著に発現量が異なること、およびKynureninase 遺伝子の開始コドンに対応したアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与が、血圧を抑制するとともに尿中カテコールアミンを減少させることから、Kynureninase 遺伝子が中枢神経系を介してSHR高血圧に影響を及ぼす可能性を示した。これら一連の実験から、Kynureninase 遺伝子がSHR高血圧の原因遺伝子の一つである可能性を指摘した。高血圧の発症は、交感神経活動の亢進と動脈受容器反射の減弱ないしはリセットを引き起こすことが報告されているものの、その分子機構に関する情報は極めて乏しい。本章で述べられている研究成果は、最新のゲノム解析手法を用いてSHRの中枢系を介した血圧調節機構を見出した先駆的な仕事として高く評価でき、国際誌Hypertension Researchに報告されている。

申請者が行ったグリケーションカスケードとキヌレニンカスケードに関する研究は、本態性高血圧の病態生理学的機序を解明していく上で、今後の研究の発展に大きく貢献すると期待できる。したがって、本学位申請論文は、自然・人間共生論講座にふさわしい内容を備えている。

よって本論文は、博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成14年1月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。