

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 西郷 紗絵

横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御内科学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 小児科学 教授 伊藤 秀一  
副査 横浜市立大学附属病院 心臓血管外科 准教授 鈴木 伸一  
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 分子生物学 講師 廣瀬智威

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Blood Pressure Elevation of Tubular Specific (P)RR Transgenic Mice and Lethal Tubular Degeneration due to Possible Intracellular Interactions between (P)RR and Alternative Renin Products

(尿細管特異的(P)RR トランスジェニックマウスにおける血圧上昇と(P)RR と Alternative Renin の細胞内相互作用による致死的尿細管変性の可能性)

#### 論文内容の要旨

(プロ)レニン受容体((P)RR)遺伝子は発見から 20 年経過しているが、その機能や生理学的特性が解明されていない。当初はレニンプロレニンをリガンドとする受容体でありレニンアンギオテンシン系(RAS)の一部として創薬の標的になると期待され、研究が行われていた。(P)RR の機能について長年結論が出ない理由の一つに、全身性ノックアウトが V-ATPase の機能不全による細胞の酸性化に障害が出るため胎生致死であることがある。全身に分布する(P)RR の内、我々は尿細管(P)RR に注目し、マウス腎尿細管特異的に(P)RR を過剰発現させ((P)RR-TG マウス)、その形質を観察した。最も特徴的な結果としては、(P)RR-TG マウスの尿の pH はアルカリ化しており、V-ATPase の阻害薬である Bafilomycin を投与すると、正常化した。また(P)RR-TG マウスは野生型に比べて血圧が高く、オルメサルタン/アリスキレンにて血圧が降下した。Alternative Renin トランスジェニックマウス (ARen2-TG マウス)と(P)RR-TG マウスと交配すると、仔(Double Transgenic mouse; DT マウス)の生存率は低く、仔の組織病理学的観察では、ARen2 と(P)RR が共に発現している皮髄境界に甚大な障害がみられ、それらは(P)RR と ARen2 の結合を示唆している可能性があると考えた。

#### 質疑応答

論文要旨の説明に続き、以下のような質疑応答が行われた。

伊藤主査による質問/コメント

1) この研究で最も伝えたかった事は何か。

マウス尿細管での(P)RRはRASとは無関係で、主にV-ATPaseとして働いているが、(P)RR-TGマウスが高血圧を示す理由はこれだけでは説明できず更なる探求が必要であるということである。

2) 実験対象としているマウスの数が少なすぎる。

回答:遺伝子改変動物を使用しているため同時期に多数のマウスを得るのが難しかったという技術的な問題はあるものの、問題点として把握している。

3) (P)RR-TG マウスに対するアンギオテンシン II 負荷や高食塩負荷は検討したか。

回答:高食塩食負荷は(P)RR-TG マウス作成時に行っており、有意な所見はなかった。アンギオテンシン II 負荷については行っておらず、今後の課題である。

4)(P)RR-TG マウスは血圧高値を示すが、飲水量が少ないが多尿となっているのに野生型との体重差が見られていない。尿の Na の結果からは希釈尿が得られていると考えられるが、この現象はどう解釈しているか。

回答:これらの不整合性は,個体数が少ないためと思われる.また,更に代謝ケージにおける飲水量や尿量計測は誤差があり,この個体数の少なさで生理的現象を判断することは難しいと考えている.

5)(P)RR-TG マウスの血清 Na の測定は行ったか.

回答:行ったが野生型との有意な差はみられなかった.

6)尿 pH の結果からは(P)RR が V-ATPase として働いていることが示唆されるが,それは(P)RR-TG マウスの飲水行動やその他の事象に関連しているのではなく,単に V-ATPase として働いていると考えているか.

回答:そのように考えている.

7)DT マウスの腎病理については粗大な観察にとどまっており,これから何か結論を出すのは難しいのではないか

回答:我々も同様に考えていて DT マウスについては更なる分子レベルでの解析を含め詳細な探索が必要と考えている.

鈴木副査による質問/コメント

8)RAS は長年研究の対象だが未だに解明されていないことが多数あり,それが今回の結果の解釈が難しいことに関与しているのではないか.今回(P)RR-TG マウスという新規性の高い独自の遺伝子改変動物を用いて一定の結果が得られたことは学位論文として異論がないと思われる.基礎研究は臨床に結び付くことが重要と思われるが,この研究の中で何か心臓と(P)RR の関連について知見は得られたか.

回答:(P)RR は RAS への影響は少なく,V-ATPase としての働きが大きいといわれているため,(P)RR の異常が直接的な心臓疾患との関連はないようだ.心筋細胞にて特異的に(P)RR をノックアウトした動物を用いての研究においても心筋の細胞の酸性化に異常を来して胎生致死に至るといった結果が得られたという報告がある.

廣瀬副査から以下の質問/コメントを得た.

9)研究の組み立てが悪く,根本的な問題である.基本的な正しい論文作成方法を学んでおらず,一般的な研究の報告とはかけ離れている.そのため内容についての議論は難しい.(P)RR の研究が混沌としているが,(P)RR は RAS とは関わりが薄く V-ATPase として機能しているということは自明である.それを多くの研究者が曖昧にしているので現状になっているのではないか.そこに気づかないとこの世界的な混沌から脱せないのではないか.わかったことと残された課題を明確にする必要がある.(P)RR の機能を RAS との関わり中で探求していくと,V-ATPase の影響が邪魔になると思われるが今回 Bafilomycin にて阻害しているが,それ以外に何か方法を考えているか.

回答:まず初めに,今回この実験体系を組んだのは(P)RR は RAS に対する関与は少なく,V-ATPase の機能が主と考えたからである.また, RAS との関わり少ないということの間接的に示している報告は我々とほぼ同時期に発表された研究ばかりであり当研究はその真実についての新たな知見を示した先駆けの一つである.今回示されたのは過剰発現させた V-ATPase の機能を薬理的に打ち消して尿の表現型が野生型と同等になったという事象の

みであり直接的な証明は必要であることは認識している。

最後に伊藤主査から以下の質問/コメントを得た。

10)(P)RR の改変遺伝子の発現量が定量できていないことも問題である。ノックアウトマウスと過剰発現マウスと野生型の比較を行って表現型を見るべきである。(P)RR が尿細管に発現しており、V-ATPase 阻害薬によりその機能が打ち消されることは判明したが、腎臓で実際の V-ATPase の機能を調べるためには何をすればよいかということを広瀬副査は質問した。その一つの答えとして、細胞を単離して細胞伝達シグナルを見る方法がある。今回の実験によるネズミの尿量や飲水量は計測が不安定で、更に V-ATPase の機能そのものの探求に及んでおらずこれらの結果から結論を出すのは難しい。DT の検討でも胎生致死のモデルでは高血圧や心不全は老化によっておこるものであり致死モデルでは検討できない。

11)この研究に対する申請者の貢献度はどれくらいか。

回答：遺伝子改変動物作成以外はすべて申請者が行った研究内容である。

以上のようなされた質問に対して回答がなされた。長年に亘り、学術的に混沌となっていた課題に対して、新規に作製した遺伝子改変動物を用いた解析により、部分的にはあるが、結論を出すことのできる成果を上げることができた。申請者は学位論文に必要な形式への理解、本論文に関連した研究領域全般への俯瞰的な知見を有することからも、研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。