The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Transcription factor decoy to study the molecular mechanism of negative regulation of renin gene expression in the liver in vivo
Author(s)	冨田, 佐和子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43227
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【91】

氏　　名	富　田　佐和子（とみ　た　さわこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16645　号
学位授与年月日	平成14年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Transcription factor decoy to study the molecular mechanism of negative regulation of renin gene expression in the liver *in vivo* （デコイ法を用いた肝臓におけるレニン遺伝子発現調節の組織特異性の解明）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　荻原　俊男 （副査） 教　授　網野　信行　　教　授　金田　安史

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

近年、高血圧や心血管リモデリングにおいて組織レニン－アンジオテンシン（RA）系の重要性が指摘されている。古典的なRA系に加え、各臓器におけるRA系の各因子の存在つまり組織RA系が特に注目されている。そのRA系の中心であるレニンの組織特異的遺伝子発現の機構については未だ不明な点が多い。本研究ではDNA-転写因子結合を調整するおとり型核酸医薬（デコイ法）と効率の良い遺伝子導入法（HVJ-リポソーム法）を組み合わせる事により *in vivo* ラット肝臓においてレニンの組織特異的遺伝子発現の機構の解明を目的とした。

【方法】

ラットレニン遺伝子の5'-flanking regionに存在するnegative regulatory element（NRE）に対する33塩基対の二重鎖デコイオリゴヌクレオチド（NREデコイ）を作成し *in vivo* において肝臓におけるレニン遺伝子発現に及ぼす効果を検討した。また、本研究におけるコントロール実験にはスクランブルオリゴヌクレオチド（スクランブルデコイ）を使用した。最初にラット肝臓におけるNRE binding protein（NREB）の存在をGel Mobility Shift Assayで検討した。というのもこれまでにラット肝臓においてはNREBが存在するのという報告がなかったためである。続いてHVJ-リポソーム法を用いて *in vivo* においてラット肝臓へのデコイの導入効率についても検討した。その際にはデコイに蛍光色素をラベルしたFITC-デコイを使用した。その後に、ペントバルビタール麻酔下で門脈よりラット肝臓へNREデコイおよびクランブルデコイを含むHVJ-リポソームを2mlずつ導入した。導入2日後に採血ならびに肝臓摘出、さらに導入5日後に肝臓摘出を行い、肝組織中・血中でのレニン発現・産生を免疫組織染色法、RT-PCR法、及びRIA法を用いて検討した。更に導入7日後に血圧への影響について検討するためにテールカフ法を用いて血圧測定をおこなった。

【成績】

最初にGel Mobility Shift Assayによりラット肝臓においてNREBの存在が明らかとなった。また、導入方法の効率の検討であるが、HVJ-リポソーム法を応用することによりラット肝臓の肝細胞に効率よくデコイの導入が可能であることも判明した。このことはHVJ-リポソーム法を用いなければほとんど肝細胞には導入できなかったことを考えると導入においては非常に重要な意味を持つことがわかる。続いて本実験の結果であるが、NREデコイ導入群においては導入2日後にRT-PCR法により肝組織中のレニンmRNAの産生が認められた。また、導入2、5日後

に摘出した肝臓において免疫組織染色法により肝組織中に存在するレニンの蛋白産生が認められた。さらに導入2日後、血中でのレニン濃度の有意な上昇が認められた。一方、コントロールであるスクランブルデコイ導入群では肝組織中のレニンのmRNA発現や蛋白産生、血中でのレニン濃度の有意の上昇は認められなかった。残念ながら、導入7日後にテールカフ法により測定した血圧においてはNREおよびコントロールデコイ投与両群において有意な上昇は認められなかったが、NREデコイ投与により3日後には有意な血圧上昇が認められた。

【総括】

ラットレニン遺伝子の5'-flanking regionに存在するNREがラットレニン遺伝子の肝臓における組織特異的な発現阻害において非常に大切な役割を果たしていることが示唆された。本研究の結果は今後RA系の機能解明特にレニン遺伝子発現の制御のメカニズムについての研究に大きく貢献するものと思われる。また、効率の良い遺伝子導入法であるHVJ-リポソーム法を用いることにより *in vivo* でのおとり型核酸医薬（デコイ法）の有用性も示され、今後デコイが遺伝子発現制御や治療目的に使用される可能性を示唆するものとも考えられる。

論文審査の結果の要旨

レニン-アンジオテンシン系は血圧調節系としてだけでなく、心血管リモデリングにおいても重要な役割を果たし、また、本系の阻害薬は降圧剤としてだけでなく、臓器保護作用も有しており臨床の場においても重用視されている。本系の構成因子であるレニン、アンジオテンシン、アンジオテンシノーゲンはいろいろな臓器においてその発現が確認されている。本系の律速酵素であるレニンの発現に関しては組織特異性やその分子メカニズムに関してはマウスでは一部解明されているが、ラットに関しては全く報告されていない。本研究においては転写調節因子であるNegative Regulatory Element（NRE）とその結合蛋白（NREB）の相互作用によるものと仮説をたて、核酸医薬とよばれる技術とHVJ-リポソーム法を応用し、レニンNREデコイを肝臓へ導入をした。まず、本研究ではその存在も報告されていなかったNREBの存在をラット肝臓において証明している。続いてNREデコイの導入により肝臓においてRNAレベルおよび蛋白レベルでレニンの発現を確認している。さらに血中レベルでレニン活性の上昇までも確認している。しかも興味深いことに、導入3日後にはコントロール群に比し、NREデコイ導入群では有意な血圧上昇が認められた。

本研究はラット肝臓におけるレニン遺伝子発現のメカニズムを初めて明らかにしたもので、今後のレニン-アンジオテンシン系の重要性や組織特異性の分子機構の解明に大きく貢献するものである。また、デコイ法は現在多くは治療用ストラテジーに応用されているが、本研究では遺伝子発現制御にも応用可能であることが証明され、大きな意義を有し、学位の授与に値するものと認める。