

# 主論文

## Dynamic changes in Bach1 expression in the kidney of rhabdomyolysis-associated acute kidney injury

(横紋筋融解症性急性腎傷害における Bach1 の動態)

### [緒言]

横紋筋融解症性急性腎傷害 (rhabdomyolysis-induced acute kidney injury, RM-AKI) は災害時などのクラッシュ症候群、薬剤性横紋筋融解症の合併症として注目されている。血中に遊離したミオグロビンが RM-AKI の発症に関与するとされるが、詳細な機序は不明である。ヘムオキシゲナーゼ 1 (Heme oxygenase-1, HO-1) はヘム代謝の律速酵素で、RM-AKI の動物実験モデルにおいて保護効果を示す。BTB and CNC homology 1 (Bach1) はヘム反応性の転写因子である。通常状態では、Bach1 は small Maf タンパクと二量体を形成し、HO-1 誘導プロモーター領域にある Maf recognition element (MARE)配列に結合し、HO-1 の発現を抑制している。一方、細胞内遊離ヘムが過剰となると Bach1 は MARE 配列から遊離・核外へ移行し、HO-1 誘導が活性化される。

我々は、ミオグロビン由来の遊離ヘムが RM-AKI の発症機序に関与し、RM-AKI 腎における細胞内遊離ヘム代謝の過程で Bach1 の発現が変化すると仮定した。本研究では、両下肢へのグリセロール筋注により作成した RM-AKI ラットモデルの傷害腎における Bach1、HO-1、ヘム合成の律速酵素である ALAS1 の遺伝子発現と Bach1、HO-1 のタンパク発現について検討した。

### [材料 (対象) と方法]

体重 210–250g の雄性 Sprague–Dawley ラットを 24 時間の絶飲状態とした後、①グリセロール筋注群 (グリセロール群)、②生理食塩水筋注群 (生食群)、③無治療群にランダムに群わけした。グリセロール群では、両側下肢に生理食塩水で希釈した 50%グリセロール 10 mL/kg を筋注し、生食群は同量の生理食塩水を筋注した。薬剤投与後の実験時間 (0~24 時間) に合わせて、ラットをエチルエーテルにて鎮静し、採血とヘパリン加生食による腎灌流を行い、その後腎臓を摘出した。

RM-AKI を評価するために、血清中のクレアチニンフォスフォキナーゼ (creatinine phosphokinase; CK)、アミノトランスフェラーゼアスパラギン酸 (aspartate aminotransferase; AST)、尿素窒素 (blood urea nitrogen; BUN)、クレアチニン (creatinine ; Cr) を測定した。更に、組織学検査として、ヘマトキシリン・エオジン染色した腎組織を観察し、①尿細管上皮浮腫 (tubular epithelial cell swelling)、②空胞変性 (vacuolar degeneration)、③尿細管壊死 (necrosis)、④落屑変化 (desquamation) の 4 項目で定義した傷害尿細管の割合により、0~4 点 (<5%~>75%) でスコアリングをした。

摘出したラット腎組織から mRNA とタンパクを抽出し、HO-1、ALAS1、Bach1 のそれぞれの相補的 DNA プローブを用いた Northern Blotting 法により mRNA 発現の定量解析を行った。更に、

HO-1、Bach1、 $\beta$ -actin、Lamin-B の抗体を用いた Western Blotting 法によりそれぞれのタンパク発現を解析した。

#### [結果]

##### グリセロール投与ラットは横紋筋融解症と急性腎傷害を発症する

グリセロール投与により、CK は投与 1 時間後より急激に上昇し、3 時間後に最高値に達した。CK と同様に AST もグリセロール投与 1 時間後より上昇し、6 時間後に最高値に達した。生食群では CK と AST には変化がなかった。BUN と Cr はグリセロール投与後 12 時間までは生食群と比較して有意な変化を認めなかったが、投与 24 時間後に BUN と Cr は生食群と比較して有意に上昇した (BUN,  $108.45 \pm 20.59$  md/dl vs  $14.97 \pm 3.44$  mg/dl,  $P < 0.0001$ ; Cr,  $1.95 \pm 0.44$  mg/dl vs  $0.13 \pm 0.06$  mg/dl,  $P < 0.0001$ )。組織学検査でもグリセロール投与 24 時間後の腎組織では有意な尿細管傷害が確認された。これらの結果はグリセロール投与ラットにおいて、RM-AKI が惹起されたことを示した。

##### RM-AKI ラット腎では、HO-1 が強誘導され、ALAS 1 が抑制される

次に、ラット腎における HO-1 の遺伝子とタンパク発現を解析した。HO-1 mRNA 発現はグリセロール投与 1 時間後から増加し、6 時間で最高値に達した。HO-1 mRNA の変化と同様に、HO-1 タンパク発現も劇的な増加を認めた。HO-1 mRNA と HO-1 タンパクは生食群ではほとんど発現していなかった。一方、グリセロール投与により、ヘム合成の律速酵素である ALAS1 mRNA 発現は有意に低下し、投与 3 時間で最低値に達し、その後回復した。

##### RM-AKI ラット腎では、核内 Bach1 タンパクが減少し、細胞質 Bach1 タンパクは増加する

次に、Bach1 タンパクの動態について解析した。グリセロール投与後、ラット腎の核内 Bach1 タンパク発現は急激に低下し、投与後 3 時間で最低値となった。核内 Bach1 タンパク発現はその後回復し、投与 12 時間後以降は基準値よりも高値で推移した。一方、核内 Bach1 タンパクとは逆に、細胞質 Bach1 タンパク発現はグリセロール投与後に増加した。細胞質 Bach1 タンパクはグリセロール投与後 6 時間で最高値に達し、その後高値を維持した後に投与後 24 時間に基準値まで低下した。

##### RM-AKI ラット腎では、Bach1 mRNA は増加する

次に、ラット腎における Bach1 遺伝子発現について解析を行った。Bach1 mRNA は生食群ではほとんど発現していなかったが、グリセロール群では投与 3 時間後から有意に増加し、6 時間後に最高値に達し、投与後 24 時間で基準値まで低下した。

#### [考察]

我々は、グリセロール投与により誘導された RM-AKI ラット腎における核内 Bach1 タンパクの有意な低下と、それに続く Bach1 mRNA と細胞質 Bach1 タンパクの増加を証明した。更に、RM-AKI ラット腎における HO-1 発現の増加と ALAS1 mRNA の低下も確認した。Bach1 はヘム感受性 HO-1

転写抑制因子であり、細胞内 Bach1 タンパクの分布の変化は RM-AKI ラット腎における HO-1 誘導と遊離ヘム代謝に関与していると考えられた。今回の研究は *in vivo* で腎臓における Bach1 の動態を明らかにした初めての報告である。

“遊離ヘム”とは、新規合成されたヘムのうちタンパクと複合体を形成していないもの、あるいはヘムタンパクから遊離したヘムのうち HO により処理されていかなるものであるとされる。ヘムはヘムタンパクの基質として必要不可欠の物質であるが、過剰発現した遊離ヘムは細胞膜リン脂質へ作用し、フリーラジカルを発生させ、細胞傷害を引き起こすと考えられている。RM-AKI ラット腎において増加したと考えられる遊離ヘムはミオグロビン由来であることが強く予想される。

いくつかの *in vitro* の研究で、Bach1 は HO-1 誘導を抑制していることが示されている。更に、紫外線暴露に関する培養細胞実験にて、細胞内ヘム増加に起因する HO-1 誘導は Bach1 過剰発現により抑制されることが報告されている。つまり、細胞内 Bach1 動態の変化はヘム誘導性の HO-1 発現に必須であると考えられる。

我々のモデルにおいて、核内 Bach1 タンパクの減少は核内 Bach1 タンパクが核外へ移行したことを示唆しているが、細胞質 Bach1 タンパク上昇の最高値はグリセロール投与 6 時間後であり、核内 Bach1 タンパクが最低値を示した時間と 3 時間の時間差があった。一方、グリセロール投与後 3 時間から増加した Bach1 mRNA の変化は核内 Bach1 タンパク減少のタイミングと一致し、細胞質 Bach1 の増加に先行していた。つまり、細胞質 Bach1 タンパクの増加は核内 Bach1 タンパク減少の代償として新規合成された Bach1 タンパクを反映していると考えられた。細胞培養実験にて核外へ移行した Bach1 タンパクはプロテアソームにてすぐに分解されると報告されており、核外移行した Bach1 タンパクを細胞質 Bach1 タンパクの直接的な増加として捉えることができなかった原因かもしれない。HO-1 は酸化傷害急性期には保護効果を示すが、HO-1 の遷延性の過剰発現は不安定鉄の産出や必要なヘムタンパクの分解などにより、有害作用をもたらすことが懸念される。故に、核内 Bach1 タンパク減少後の細胞内 Bach1 タンパクの補充は細胞内ヘム代謝関連の恒常性の維持に必須であると考えられる。

#### [結論]

今回我々は RM-AKI ラットモデルにおいて、Bach1 の動態の変化を証明した。我々の研究結果は RM-AKI の発症機序に細胞内遊離ヘムの増加が関与していることを強く示唆している。