

S1-6 低酸素による肺障害の遺伝子発現変化

三重大学医学部麻酔学教室、薬理学教室*

天野 誉、丸山一男、田中利男*

生体が低酸素に曝露されると、肺血管では低酸素性肺血管攣縮(HPV)が起こり肺動脈圧が上昇する。急性肺障害ではHPVを伴うが、この状態が続くと肺血管細胞などの増殖性変化すなわち血管リモデリングが起こり肺高血圧症となる。late stage ARDSをはじめとする肺高血圧症疾患では末梢肺動脈の筋性化や中膜肥厚が発生するが、この病態動物モデルの1つである低酸素暴露ラットの肺では、ヒトの肺高血圧症と同様の血管リモデリングが起こることが知られている。このように組織変化を伴う病態はある特定の遺伝子群の発現、機能により決定付けられた結果である。その分子機構を明らかにするためには、病態を引き起こす刺激に反応して特異的な発現パターンを示す遺伝子群を同定することが有効な手段である。我々はDD(differential display)法を用いて、低酸素性肺高血圧症ラットの肺における遺伝子発現変化を解析した。これは任意の配列のプライマーをPCRに用いることで複数のcDNA断片を同時に増幅し、電気泳動法で展開して得られたフィンガープリントの比較により特異的な発現パターンを示す分子種を同定する方法である。【方法】低酸素に曝露したラットの肺からRNAを抽出し、アンカープライマーと呼ばれるオリゴdTプライマーを用いて逆転写反応を行った。次にこのcDNAを鋳型として、任意の配列を持った10merのプライマーを用いてPCRを行った。アニリング時に低い温度を用いると、6~8塩基の相同性でアニールし複数の分子が増幅される。このPCR産物をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動により展開すると、複数のcDNA断片がバンドとして得られる。バンドの可視化には、アンカープライマーを蛍光色素でラベルして蛍光イメージアナライザーでスキャンするFDD(fluorescent differential display)法を用いた。こうして得られたmRNAフィンガープリントにおいて、ゲル上の移動度はその分子の大きさに依存するため同じ高さにあるバンドは基本的に同じ分子種

のシグナルを示している。この中から、低酸素群とコントロール群とを比較して興味深い挙動を示すバンドを回収しサブクローニングした。

【結果】30種類の任意プライマーと3種類のアンカープライマーを用いて合計90通りの組合せで解析した。解析総数7665バンドのうち、低酸素により発現量が増加しているものが275バンド(3.6%)、減少しているものが108バンド(1.4%)で、約5%のバンドが発現変化した。これらのクローンの塩基配列をDNAシーケンサーにより決定し、101種類の遺伝子について相同性検索を行い、その結果から得られた遺伝子群を4つに分類した。(1)低酸素、肺高血圧症との関連が証明されており、かつ全長cDNAがデータベースに登録されている遺伝子群(既知関連遺伝子)。(2)全長cDNAがデータベースに登録されているが、この病態との関連が報告されておらず、機能解析により新たな知見が得られる可能性がある遺伝子群(既知遺伝子)。(3)全長cDNAがデータベースに登録されていないが、ESTデータベースにその断片や相同性の高いものが認められるもので、比較的新規性もあり、機能解析にはいりやすい遺伝子群(EST)。(4)データベース上に相同性の高いものが認められず、新規性はもっとも高いが、cDNAクローニングからスタートする必要のある遺伝子群(新規遺伝子)。この結果、既知関連遺伝子が23%、既知遺伝子が27%、ESTが21%、新規遺伝子が29%であった。これらの遺伝子がコードする分子の機能解析により病態形成のゲノム機構が明らかになるものと思われる。さらに、遺伝子発現プロファイルのモニタリングは、病態の重症度の診断や、治療法の効果判定などに応用できる可能性もある。