

学 位 論 文 題 名

IN VIVO EFFECT OF A SELECTIVE ENDOTHELIN RECEPTOR ANTAGONIST, BQ-123, ON RENAL FUNCTION IN CYCLOSPORIN A-TREATED RATS.

(シンクロスポリン投与下ラットにおけるエンドセリンリセプター拮抗薬(BQ-123)の腎機能に及ぼす効果)

学位論文内容の要旨

研究目的

シクロスポリンはいろいろな種類の臓器移植において生着率の向上させた免疫抑制剤である。しかし主たる副作用である腎毒性のために、その使用には制限や複雑性をきたしている。近年その腎毒性に対しては数多くの研究がなされ報告されているが未だその作用機序については不明である。一方エンドセリンは最近発見されたペプチドであり、その作用として内因性の強力な血管収縮作用が知られている。最近の研究からシクロスポリンの腎毒性にこのエンドセリン（特にエンドセリン-1(ET-1)）が重要な役割を演じていることが明らかにされ、特にシクロスポリンによる腎血管収縮に強く関与していることが報告されている。そこでシクロスポリン腎毒性における内因性エンドセリンの関与を調べるために、シクロスポリン投与下ラットの腎におけるET-1の発現状況とET-1のリセプター拮抗剤（BQ-123）の腎機能に対する効果について検討した。

対象及び方法

80～100日齢のWistar系Lewis雄ラットにBQ-123を生理食塩水にて250mg/mlになるように調整した後、持続的にかつ一定量の投与が可能なALZET osmotic minipumpに充填し、これを皮下移植したものをBQ群、同様にBQ-123の代わりに対象群として生理食塩水のみを充填したminipumpを皮下移植したものをPS群とし、これら2群を比較検討した。各ラットを代謝ケージにて管理し、BQ-123の血中濃度が一定となる翌日より24時間蓄尿を開始し、以降連日採尿した。皮下移植後から4日目より1日1回50mg/kg量のシクロスポリンを4日間連日腹腔内投与した。4日間投与終了後に下大静脈より採血し、さらに腎臓を摘出した。全尿の一部はクレアチニン(Cr)、NAG(N-acetyl- β -D-glucosamidase)、Ca、ET-1の濃度を測定し、血清はCrとBQ-123の濃度を測定した。腎組織は通常のHE染色のほかに、ET-1の局在をみるために抗ET-1抗体を用いた免疫組織染色法(ABC法)、またリセプターの局在は 125 I]ET-1を用いたAutoradiographyにて観察した。

なお検定にはt検定、Wilcoxon検定を用い危険率5%で有意差ありとした。

結果

I. シクロスポリン投与前後における腎機能

- (A)尿量はシクロスポリン投与によりPS群は平均9.3から19.3、BQ群は平均8.2から34.6 ml/dayと有意に増加した。しかし両群間をそれぞれ比較したが差を認めなかった。(表1)
- (B)尿中クレアチニン総排泄量もPS群は平均38.7から30.5、BQ群は平均40.3から31.0 mg/day/100gと共に有意に減少した。しかしこれについても両群間で有意差はなかった。(表1)
- (C)尿細管障害の指標の一つである尿中NAG量はシクロスポリン投与により両群間で有意に増加し、さらにBQ群ではPS群よりも有意に高値を示していた。(表1)
- (D)尿中Ca/Cr値もシクロスポリン投与後にBQ群、PS群ともに有意に増加した。しかし両群間には差を認めなかった。(表1)
- (E)血清クレアチニン値はBQ群0.51、PS群0.58mg/dlとPS群で有意に高値を示した。(表2)
- (F)クレアチンクリアランスはBQ群0.426、PS群0.366ml/min/100gとBQ群で高かった。(表2)
- (G)BQ群におけるBQ-123の血中濃度は $3.75 \pm 0.34 \mu\text{M}$ であり、拮抗作用を有するのに十分な濃度であった。

II. 腎におけるBQ-123の結合部位

- (A)Macroautoradiographyでは、PS群では腎全体広範囲にET-1と結合するリセプターが存在していたが、

BQ群では皮質内の腎小体が描出されていずBQ-123が拮抗作用を示していると思われた。
(B)これをmicroscopicに観察してみるとBQ群では、リセプターとET-1が結合していることを示すgrain数が糸球体において著明に減少していた。さらに尿細管と小血管を観察したところ、PS群と比較してBQ群では、尿細管についてはgrain数はほとんど変化無く、小血管ではgrain数は減少していた。

III. 腎組織内のET-1の発現状況

ET-1の局在をみるために抗ET-1抗体を用いた免疫組織染色で観察したところ両群共に無処置の状態と比較して尿細管細胞質内にET-1の発現が増強していたが、その局在については両群間で差を認めなかった。

IV. 尿中ET-1量の測定

抗ET-1抗体を用い、ELISA法にてシクロスポリン投与前後での尿中ET-1量を測定したところ両群ともに有意に増加し、特にBQ群の方が顕著であった。(表3)

考察

シクロスポリンの腎毒性において尿細管内の巨大ミトコンドリアやリソゾームに関連する小体の存在、endoplasmic reticulumの拡大による空胞化、微少石灰化及び変性が病理学的に確認されている。しかしこのような病態を引き起こすメカニズムは未だ不明である。最近発見された内因性血管収縮物質であるエンドセリン(特にエンドセリン-1(ET-1))がシクロスポリンにより誘発される血管収縮に関与していることが報告されて以来、シクロスポリン腎毒性に関するET-1の研究がなされ、以下のような結果が報告されている。

- (1)ラットのシクロスポリン腎毒性モデルでは循環血液中のET-1値の上昇が見られた。
- (2)ET-1に対する抗体を投与することでシクロスポリンによって誘発された腎血流の減少を改善させることが可能であった。
- (3)ラットにおいて、シクロスポリンの投与により尿中ET-1排泄量の増加と腎組織内のET-1に対するリセプターの増加が確認された。

これらの結果からシクロスポリンの腎毒性にはET-1による血管収縮に起因する腎の虚血性変化が関与していると考えられる。そこで我々はこのET-1による血管収縮を予防することでシクロスポリンの腎毒性を抑えることが可能かどうかをET-1に対するリセプターに対する拮抗剤を用いて検討してみた。その結果拮抗剤の投与により糸球体濾過率を反映するとされる24時間クレアチニンクリアランスのシクロスポリン投与による低下を改善させた。このことはautoradiographyによりリセプターが拮抗されていることや尿中ET-1排泄量がシクロスポリン投与により増加していることから、シクロスポリン投与によって増加した内因性のET-1が腎の糸球体濾過率を低下させ、この作用を拮抗剤であるBQ-123が抑制したと思われた。

しかしその反面で尿細管障害の指標となる尿中NAG値が拮抗剤投与により有意に増加し、むしろ尿細管障害が強調された。この原因としては、腎においてET-1のリセプターが2種類以上存在することが知られており投与した拮抗剤はその一方しか作用を持たないこと、しかもその拮抗されないリセプターは尿細管の細胞膜に存在し細胞内へのCa⁺⁺流入に関与していることが培養尿細管細胞で証明されていることから、結果的にシクロスポリン投与により過剰に産生されたET-1が拮抗されなかった尿細管におけるリセプターと結合し、その作用を増強させたのではないかと推測した。

結論

1. シクロスポリン投与によりラット尿細管細胞質内にET-1の発現が増強し、尿中ET-1排泄量も増加した。
2. BQ-123は腎の糸球体や血管に存在するリセプターと結合し拮抗作用を示し、シクロスポリン投与による腎機能障害のうち、Cr値で反映される腎機能については予防効果を認めた。しかし尿細管障害はむしろ増強された。

表1 シクロスポリン投与前後のBQ群、PS群の腎機能

	volume (ml/day)	Total Cr ⁱ (mg/day/100g)	Total NAG (10 ⁻³ U/day)	NAG/Cr (10 ⁻² U/g)	Ca/Cr (10 ⁻²)
(前) BQ群 (n=7)	8.2±0.34	40.3±1.76	97.2±11.77	7.3±0.85	2.4±0.22
PS群 (n=7)	9.3±0.63	38.7±2.21	118.6±8.81	9.1±0.73	2.5±0.25
(後) BQ群 (n=7)	34.6±6.73	31.0±1.87	481.3±29.59*	52.1±2.31*	5.0±1.18
PS群 (n=7)	19.3±3.10	30.6±1.84	382.3±25.55*	41.8±3.71*	6.2±1.30

表2 シクロスポリン投与後のBQ群、PS群のCr濃度、24h-CCr、BQ-123濃度

	serum Cr (mg/dl)	24h-CCr (ml/min/100g)	serum BQ-123 (μ M)	
BQ群 (n=7)	0.51 $\pm$ 0.016*	0.426 $\pm$ 0.031	3.75 $\pm$ 0.34	[mean $\pm$ S.E., * : p<0.05]
PS群 (n=7)	0.58 $\pm$ 0.028*	0.366 $\pm$ 0.022		

表3 シクロスポリン投与前後のBQ群、PS群の尿中ET-1排泄量

	投与前	投与後	
BQ群 (n=7)	n.d. ~ 69.58	49.92 ~ 8047.62	(pg/day)
PS群 (n=7)	n.d. ~ 57.75	n.d. ~ 333.35	(n.d. : not detected)

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 齋 藤 秀 哉

学 位 論 文 題 名

IN VIVO EFFECT OF A SELECTIVE ENDOTHELIN RECEPTOR ANTAGONIST, BQ-123, ON RENAL FUNCTION IN CYCLOSPORIN A-TREATED RATS.

(シンクロスポリン投与下ラットにおけるエンドセリンリセプター拮抗薬(BQ-123)の腎機能に及ぼす効果)

研究目的

Endothelin-1(ET-1)がシクロスポリン(CsA)の腎毒性のうちの腎血管攣縮に強く関与していることが報告されている。そこでCsA腎毒性における内因性エンドセリンの関与を調べるために、CsA投与下ラットの腎におけるET-1の発現状況とリセプター拮抗剤(BQ-123)の腎機能に対する効果について検討した。

対象及び方法

80～100日齢のWistar系ラットにBQ-123を生理食塩水にて調整した後、osmotic minipumpに充填し皮下移植したものをBQ群、同様に生理食塩水を投与したものをPS群とし、2群を比較検討した。各ラットを代謝ケージにて24時間蓄尿を開始し、以降連日採尿した。皮下移植後から4日目より1日1回50mg/kg量のCsAを4日間連日腹腔内投与した。投与終了後に採血し、腎臓を摘出した。全尿の一部はクレアチニン(Cr)、NAG、Ca、ET-1の濃度を、血清はCrとBQ-123の濃度を測定した。ET-1の局在は抗ET-1抗体を用いた免疫組織染色法(ABC法)、リセプターの局在は $[^{125}\text{I}]$ ET-1を用いたAutoradiographyにて観察した。

結果

I. CsA投与前後における腎機能

- (A) 尿量はCsA投与によりBQ群は平均8.2から34.6、PS群は平均9.3から19.3 ml/dayと有意に増加した。両群間の比較では差を認めなかった。
- (B) 尿中Cr量もPS群は平均38.7から30.5、BQ群は平均40.3から31.0 mg/day/100gと共に有意に減少した。これも両群間で差はなかった。
- (C) 尿中NAG量はCsA投与によりBQ群は平均97.2から481.3、PS群は平均118.6から382.3 ($10^{-3} \times \text{U/day}$)と有意に増加し、BQ群はPS群よりも有意に高値を示した。
- (D) 尿中Ca/Cr値もCsA投与後BQ群、PS群共に有意に増加したが両群間に差はなかった。
- (E) 血清Cr値はBQ群0.51、PS群0.58mg/dlとPS群で有意に高値を示した。
- (F) Cr clearanceはBQ群0.426、PS群0.366ml/min/100gとBQ群で高かった。
- (G) BQ群におけるBQ-123の血中濃度は $3.75 \pm 0.34 \mu\text{M}$ であった。

II. 腎におけるBQ-123の結合部位

PS群では腎糸球体や血管を中心に、ET-1と結合するリセプターが存在していたが、BQ群では糸球体や血管が描出されていずBQ-123が拮抗作用を示していると思われた。

III. 腎組織内のET-1の発現状況

抗ET-1抗体を用いた免疫組織染色にて、両群共に無処置の状態と比較して尿細管細胞質内にET-1の発現が増強していたがその局在は両群間で差を認めなかった。

IV. 尿中ET-1量の測定

抗ET-1抗体を用い、ELISA法にてCsA投与前後での尿中ET-1量を測定したところ両群と

もに有意に増加し、特にBQ群の方が顕著であった。

考察

CsAで誘発される血管収縮へのET-1の関与が報告されて以来、ラット腎毒性モデルでの循環血液中のET-1値の上昇、ET-1の抗体によるCsA誘発の腎血流減少の改善、CsA投与後のラット腎組織内ET-1リセプターの増加等が報告された。我々はET-1の血管収縮の予防がCsA腎毒性を抑制するかどうかをET-1のリセプター拮抗剤を用いて検討した。結果として、拮抗剤投与により糸球体濾過率を反映するCr clearanceのCsA投与による低下を改善させた。このことはautoradiographyにてリセプターが拮抗されていることと尿中ET-1量の増加していることから、CsA投与によって増加した内因性のET-1が腎の糸球体濾過率を低下させ、この作用を拮抗剤であるBQ-123が抑制したと思われる。

しかしその反面で尿細管障害の指標となる尿中NAG値が拮抗剤投与により有意に増加し、むしろ尿細管障害が強調された。この原因としては、腎においてET-1のリセプターが2種類以上存在することが知られており投与した拮抗剤はその一方しか作用を持たないこと、しかもその拮抗されないリセプターは尿細管の細胞膜に存在し細胞内へのCa⁺⁺流入に関与していることが培養尿細管細胞で証明されていることから、結果的にCsA投与により過剰に産生されたET-1が拮抗されなかった尿細管におけるリセプターと結合し、その作用を増強させたのではないかと推測した。

結論

1.CsA投与によりラット尿細管細胞質内にET-1の発現が増強し、尿中ET-1排泄量も増加した。

2.BQ-123は腎の糸球体や血管に存在するリセプターと結合し拮抗作用を示し、CsA投与による腎機能障害のうち、Cr値で反映される腎機能については予防効果を認めた。しかし尿細管障害はむしろ増強された。

以上本研究はCsAの腎毒性に関与するET-1の役割を詳細に検討しその機序を明らかにしたもので学術的意義は高く学位 博士 (医学) 授与に値するものと判定された。