

学 位 論 文 題 名

腎虚血再灌流障害における
好中球より分泌される cathepsin G の役割

学位論文内容の要旨

緒言：臓器移植において臓器の虚血は回避できず、しばしば重大な移植臓器障害をもたらす。また阻血時間の延長は移植臓器機能発現を遅延させるだけでなく、急性拒絶反応や組織の線維化、arteriopathy といった慢性臓器障害を発生させる。虚血臓器への血液の再灌流により組織中にサイトカイン、ケモカインが産生され、接着因子、MHC 分子が高度に発現するが、これらの因子は虚血再灌流を受けた臓器へ好中球を遊走させ、組織障害を惹起する。動物実験モデルでは再灌流前に好中球を deplete することや虚血再灌流後の臓器へ好中球の遊走を阻害することにより障害を軽減することが可能であった。補体活性化物質や CXC、CC ケモカインは炎症部位へ好中球を遊走させ、それに加え、CXCR1 と CXCR2 に対するリガンドは好中球を刺激し、プロテアーゼ、サイトカイン、ケモカインやほかの走化因子を含む顆粒を放出させ、組織炎症を増幅、持続させる。cathepsin G は好中球が放出するセリンプロテアーゼであり、アズール顆粒蛋白の約 20% を占め、その働きには細胞外基質やサイトカインの前駆体を分解すること、好中球上のインテグリンクラスターを調節すること、T リンパ球やほかの白血球を炎症部位へ遊走させることが挙げられる。ところで、虚血再灌流障害を生じるメカニズムを解明し、その障害を軽減する方法を確立することは臓器移植などの臨床の場において重要なことである。虚血再灌流障害を惹起する好中球の主たる産生物質を同定することは、この障害を回避するための戦略を描く上で有効なターゲットとなりうる可能性がある。今回、私は腎の虚血再灌流障害の免疫反応や病理組織形成における好中球、また放出される cathepsin G の役割について cathepsin G 欠損マウスを使用して検討した。

方法：129/SvJ 野生型マウス (wild-type マウス) および cathepsin G 欠損マウス (雄性、8-12 週) に腎虚血再灌流障害を与えた。麻酔下に両側の腎血管をクランプし、32°C の温虚血を 60 分与えた後にクランプを外し、血液を再灌流させた。再灌流後 24 時間ごとに血清クレアチニン値を測定、生存率を検討した。再灌流 24 時間、30 日後の腎臓を摘出し Hematoxylin-eosin (H-E) 染色、および Masson trichrome 染色を施行し、腎組織の形態、線維化を評価した。また、再灌流 24 時間後の腎切片において TUNEL 法を用いアポトーシス細胞を検出し両群を比較した。再灌流 9 及び 24 時間後に腎臓の凍結切片を作成し、一次抗体として顆粒球の表面抗原に対するラット抗マウス Gr1/Ly-6G 抗体 RB6-8C5 を用い免疫組織染色を施行し、虚血再灌流後の好中球の浸潤について比較した。虚血再灌流 9 及び 24 時間後の腎組織内の CXCL1 蛋白、CXCL2 蛋白と myeloperoxidase (MPO) 蛋白の産生を ELISA 法にて測定した。

結果：64%の wild-type マウスが 60 分の虚血再灌流後 4 日以内に死亡し、その一方で cathepsin G 欠損マウスでは全例が生存した。血清クレアチニン値は両群とも同様に推移し 24 時間後に peak に達し、96 時間後までには正常レベルまで戻った。腎組織内への好中球浸潤は両群とも再灌流 9 時間後では高度であったが、24 時間後には cathepsin G 欠損マウスでは wild-type マウスに比して有意に減少した。虚血再灌流 24 時間後、wild-type マウスでは高度な尿細管壊死と尿細管細胞のアポトーシスを生じ、30 日後には繊維化、尿細管の減少を広範囲に認めた。一方、虚血再灌流 24 時間後の cathepsin G 欠損マウスでは尿細管壊死は軽く、尿細管細胞のアポトーシスは有意に減少、繊維化の形成は認めなかった。腎組織の CXCL1、CXCL2 と MPO 蛋白質産生は再灌流 9 時間後では両群いずれも高く、有意な差は認めなかったが、再灌流 24 時間後の CXCL1、CXCL2 と MPO 蛋白質産生は cathepsin G 欠損マウスでは wild-type マウスに比して有意に低下していた。

考察：cathepsin G は好中球の一次顆粒で、細胞外基質を分解し、ケモカインや Matrix Metalloproteinase (MMP) の前駆体を分解することでそれらを活性化し、セリンプロテアーゼである。活性化された好中球は reactive oxygen species (ROS) を産生し、蛋白質分解酵素や他の白血球の走化因子を含有した顆粒を組織中に放出することにより障害を引き起こす。

cathepsin G 欠損マウスでは虚血再灌流の好中球浸潤が持続しない。これは組織中の好中球のケモカイン (CXCL1、CXCL2) の産生が 24 時間後には低下していることが関係している。cathepsin G は接着因子の発現、活性化も調節すると報告されている。cathepsin G 欠損マウスではこれらが抑制されている可能性があり、好中球の浸潤の持続と関係しているかもしれない。好中球活性を示す MPO 放出は再灌流 24 時間後では wild-type マウスに比して cathepsin G 欠損マウスで低下している。MPO は過酸化水素をさらに活性を有する次亜塩素酸や次亜臭素酸などの生成をすすめることで組織障害を引き起こす。cathepsin G 欠損マウスでは虚血再灌流後の MPO 放出が減少するため組織内の ROS の生成が減少している可能性がある。生成された ROS、次亜塩素酸は障害された組織にアポトーシスを誘導する重要な因子であり、cathepsin G 欠損マウスでは虚血再灌流後の尿細管上皮のアポトーシスが減少している。腎の虚血再灌流障害において尿細管上皮細胞のアポトーシスの誘導が組織の線維化を導く重要な因子であると報告されており、この研究でも cathepsin G 欠損マウスでは wild-type マウスと比較して虚血再灌流障害後 30 日の腎臓の線維化は有意に減少した。

結語：cathepsin G は腎臓の虚血再灌流後に好中球が惹起する障害を持続させ、その結果として組織の線維化を引き起こす重要な因子であり、虚血再灌流後の組織障害を軽減する効果的な戦略を描く上で cathepsin G は有効なターゲットとなる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也

副 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

腎虚血再灌流障害における

好中球より分泌される cathepsin G の役割

この論文は、cathepsin G 欠損マウスとその wild-type マウスを用いることで腎虚血再灌流障害における好中球のセリンプロテアーゼである cathepsin G の役割を検討している。cathepsin G 欠損マウスの虚血再灌流後の腎組織では急性尿細管壊死とその後引き起こされる組織の線維化が軽減しており、理由として再灌流後早期に起こる好中球の浸潤、集積が持続しないことが原因としている。そのメカニズムとして好中球のケモカインである KC/CXCL1 と MIP-2/CXCL2 の産生が持続しないことが挙げられ、好中球浸潤が持続しないことは myeloperoxidase 活性、尿細管上皮のアポトーシス誘導を低下させると報告している。

質疑応答では副査の笠原正典教授から、他の好中球のセリンプロテアーゼより cathepsin G を阻害することの有効性、ケモカインに対する cathepsin G による制御について質問あった。これらの質問に対し申請者は、cathepsin G の阻害の研究は未だに未解明のことが多い分野であり他のプロテアーゼ阻害と直接比較検討することはできないが、cathepsin G は好中球の放出するアズール顆粒の 20% を占めることを考えると、他のプロテアーゼを阻害するのと同程度以上の効果が期待できること、また cathepsin G は様々なケモカインを cleave することで活性化することが既に報告されており、一例としてリンパ球やマクロファージのケモカインである CCR1 に対するリガンドを制御していることを挙げ解答した。次いで、副査の藤堂省教授から、虚血再灌流障害に対する治療では elastase の阻害より P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を阻害することの方が有効であるとの知見から、虚血再灌流障害治療のより効果的なタイミングについて、また腎移植後慢性期の線維化は解決すべき問題であり、虚血再灌流障害後の組織線維化にはアポトーシスの以外の系も関係しており、その考え得る他のメカニズムについて質問があった。これらの質問に対し申請者は、虚血再灌流障害を好中球の一機能を阻害するだけでは治療としては不十分であり、それにはより早い stage の治療、例えば E, P selectin 等の接着因子の阻害を cathepsin G の阻害に併用す

ることで効果をあげることが可能であると予想されること、また線維化形成に対するアポトーシス以外の系については、浸潤したマクロファージやリンパ球の機能により線維化を起こすことを例に、cathepsin G はこれらの細胞を活性化、遊走させるケモカイン、サイトカインを制御しており、cathepsin G 欠損によりこの系も抑えられることで線維化形成を抑制している可能性があることを挙げ、腎移植における臨床の検体を用いて臓器の繊維化と特殊顆粒の働きの関係についても検討する考えがあると発言した。次いで、主査の野々村克也教授から、cathepsin G の阻害剤の製造について、虚血再灌流障害以外の急性炎症後の線維化形成とその予防について、腎移植後に炎症を契機に誘発される急性拒絶反応と好中球、また cathepsin G の関係について質問があった。これらの質問に対し申請者は、cathepsin G 阻害剤は既に実験レベルで使用可能なものが開発済みであり、今後その阻害剤を用いた実験を計画していること、急性炎症後の線維化形成にも好中球やそれに引き続き浸潤するマクロファージなどが深く関与していることが報告されており、cathepsin G の阻害はマクロファージに対するケモカイン、サイトカインを制御することで線維化形成を抑制できる可能性があること、また炎症の拒絶反応誘発には MHC 分子の発現などが関係しており、まだ cathepsin G と MHC 分子発現に関する報告はないが、cathepsin G が血管内皮を傷害し、サイトカイン産生・接着因子発現を介し、抗原提示し、拒絶反応を誘発させる可能性がある」と解答した。

この論文は、cathepsin G が腎虚血再灌流後の組織障害を持続させ、組織の線維化形成の重要な因子であることを明確化したことで高く評価され、今後 cathepsin G 阻害剤を使用した実験を発展させることで、虚血再灌流障害に対する有効な治療の確立が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。