

腎虚血再灌流に対する Ischemic Preconditioning の 腎保護作用

学位論文内容の要旨

【背景と目的】腎の Ischemic preconditioning(IP)の免疫反応, 病理組織形成における炎症担当細胞, 特に好中球とマクロファージの動態, 抗 IL-10 受容体抗体(anti-IL-10rAb)が IP に与える影響について検討した。

【材料と方法】C57BL/6 マウスを用い以下の実験に分類し生存率、腎機能、腎組織像、ケモカイン産生、腎に浸潤した炎症細胞数を検討した。

実験 1 32℃45 分の腎虚血再灌流障害を与える 5 日前に腎に 32℃30 分の短い虚血再灌流障害を与えた群を IP 群, 32℃45 分の腎虚血再灌流障害を与える 5 日前 Sham 手術を行った群を non-IP 群, Sham 手術の 5 日前に Sham 手術を行った群を Sham 群とした。

実験 2 IL-10 の効果を減ずることによる IP に対する影響を検討するために, 実験 1 の 3 群に加え, non-IP 群および IP 群に対し, 再灌流後 30 分, 9 時間後にラット IgG またはラット抗マウス IL-10 受容体抗体 (anti-IL-10rAb) 200 μ g/body を投与した 2 群を追加した。

【結果】 **実験 1 生存率と腎機能**: non-IP 群は 4 日以内に 80%のマウスが死亡したが IP 群は全例生存し, 再灌流後の血清クレアチニン値は有意に低値であった。 **腎組織像**: 再灌流前では non-IP 群と比較して IP 群は近位尿細管を中心に軽度の尿細管壊死および Cast 形成を認めた。一方, 再灌流後では non-IP 群の腎に高度の尿細管壊死, Cast 形成を認めたが IP 群では明らかに軽度であった。 **好中球およびマクロファージの浸潤**: non-IP 群と比較して IP 群の再灌流後の腎組織への好中球浸潤は軽度であった。一方, Sham 群, non-IP 群, IP 群において, 再灌流前からすでにマクロファージを認め, 再灌流後では non-IP 群と比較して IP 群は高度の浸潤を認めた。 **qRT-PCR および ELISA 法による腎組織中のケモカイン (CXCL1, CXCL2, CCL2) 産生の評価**: 再灌流後の CXCL1 および CXCL2 発現量および蛋白濃度は non-IP 群と比較し IP 群に有意な低値を認めた。再灌流前では両群に有意差を認めなかった。一方, CCL2 mRNA 発現量および蛋白濃度に関しては再灌流後における non-IP 群と比較して IP 群は有意に高値であった。 **好中球からの Myeloperoxidase (MPO) の放出**: 再灌流後の IP 群の MPO レベルは non-IP 群と比較し有意に低値であった。 **尿細管のアポトーシスと繊維化**: 再灌流後のアポトーシス細胞数は IP 群で有意に少なかった。また, 線維化については non-IP 群で近位尿細管, 遠位尿細管, 腎間質に広範囲の線維化を認めたが IP 群では軽度であった。 **実験 2 腎虚血再灌流後の腎組織中 IL-10 mRNA の発現量**: 再灌流後では IP は non-IP と比較し有意に発現していた。 **生存率と腎機能**: 再灌流 45 日後の生存率は IP +IgG 群および IP +anti-IL-10rAb 群ともに 100%であり有意差を認めなかった。しかし, 腎機能に関して IP +anti-IL-10rAb 群は IP +IgG 群に比し s-Cr および BUN の有意な上昇を認めた。 **ケモカインの産生と好中球およびマクロファージ浸潤細胞数**: CXCL1 および CXCL2 の mRNA 発現量は, IP +anti-IL-10rAb 群は IP +IgG 群と比較し有意に高く, 浸潤好中球数も有意に多かった。一方, CCL2 の発現量は, IP +anti-IL-10rAb 群は IP

+IgG 群と比較し有意に低く、浸潤好中球数も有意に少なかった。

【考察】 IP 群では再灌流後の腎組織中の CXCL1, CXCL2 の mRNA 発現量, 蛋白濃度においていずれも non-IP 群と比較し低値であり、好中球浸潤も少なかった。また好中球活性を示す MPO の放出は IP 群で減少した。この現象は好中球そのものの MPO 放出が抑制されたのか、好中球数減少に伴う相対的な減少なのかは不明である。マクロファージも初期の炎症反応を担う細胞の一つであり主に死細胞やアポトーシス細胞の食食や炎症性サイトカインの産生を行っている。今回の結果ではマウスの腎には resident の F4/80 陽性細胞、すなわち組織中のマクロファージが存在しており、non-IP 群では虚血再灌流後にその数は有意に減少していたが、虚血再灌流障害後にマクロファージが死滅するのか、それとも腎組織外へ移行するのかは不明である。予備実験として腎虚血再灌流後に CCL2 とマクロファージの変化を調べ得た結果では、再灌流 24 時間後ではマクロファージ浸潤細胞数は減少し、再灌流 5 日後から CCL2 およびマクロファージ浸潤細胞数が増加していた。本実験では non-IP 群では再灌流後に減少したのに反し、IP 群では有意に増加していた。しかしこの結果が IP、すなわち初回の短時間の虚血再灌流障害後の影響による CCL2 産生およびマクロファージの浸潤が 2 回目の再灌流 24 時間後に一致したものなのか、それとも IP の効果により腎組織へのマクロファージ浸潤が亢進したのかは不明である。マクロファージ数が著明に増加したことに関連して、活性化マクロファージ由来の炎症性サイトカイン産生が亢進すれば好中球の浸潤も亢進し腎組織障害は促進されと考えられる。しかし、本実験では IP 群の腎機能は極めて良好であり病理組織学的にも障害は少なかった。従ってマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制する何らかの因子が働いている可能性が示唆された。本実験においては anti-IL-10rAb を投与することにより腎機能が悪化し、浸潤好中球数の増加と浸潤マクロファージ数の減少を認めた。これはマクロファージにある IL-10 レセプターに作用しシグナル伝達が阻害されたために炎症性サイトカイン産生が促進され、その結果として好中球浸潤も増加したものと考えられる。また、アポトーシス細胞数と腎機能障害の程度は相関すると報告されている。本研究においても IP 群で有意に CXCL2 の発現が抑制されており、IP 後からマクロファージによるアポトーシス細胞の食食が起こり Nitric oxide によりケモカインの産生が抑制され好中球減少に至ったと考えられた。さらに腎の IP によって尿細管上皮のアポトーシスは抑制されており、結果として腎機能は良好に保たれていた。これは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腎間質の線維化をも誘導する重要な因子であるとの報告と合致する。本研究では IP 群において再灌流 30 日後の腎間質の線維化は non-IP 群に比し極めて少なかった。これは尿細管上皮のアポトーシスの誘導が抑制されたことが一因として挙げられる。

【結論】 腎臓の IP は虚血再灌流後に腎組織の好中球浸潤を軽減させる臓器保護効果がある。一方、IP は虚血再灌流後のマクロファージの浸潤を増強させる。また腎虚血再灌流後の組織障害の軽減に IL-10 が関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

腎虚血再灌流に対する Ischemic Preconditioning の 腎保護作用

腎の Ischemic preconditioning (IP) の免疫反応, 病理組織形成における炎症担当細胞, 特に好中球とマクロファージの動態, 抗 IL-10 受容体抗体 (anti-IL-10rAb) が IP に与える影響について検討した. C57BL/6 マウスを用い以下の実験に分類し生存率, 腎機能, 腎組織像, ケモカイン産生, 腎に浸潤した炎症細胞数を検討した. 32℃45 分の腎虚血再灌流障害を与える 5 日前に腎に 32℃30 分の虚血再灌流障害を与えた群を IP 群とし, non-IP 群, Sham 群の 3 群で比較検討した. また, IL-10 の効果を減ずることによる IP への影響を検討するために, ラット IgG または anti-IL-10rAb を投与した群に分け比較検討した. non-IP 群は 4 日以内に 80% のマウスが死亡したが IP 群は全例生存し, 再灌流後の血清クレアチニン値は有意に低値であった. 腎組織所見において再灌流後では non-IP 群の腎で高度の尿細管壊死, Cast 形成を認めたが IP 群では明らかに軽度であった. 再灌流後の好中球浸潤は IP 群で軽度であった. また, マクロファージの浸潤は IP 群では高度であった. 再灌流後の IP 群の CXCL1 および CXCL2 発現量および蛋白濃度は non-IP 群と比較し有意に少なく, IP 群の再灌流後の CCL2 mRNA 発現量および蛋白濃度は有意に多かった. 再灌流後の IP 群の MPO レベルは non-IP 群と比較し有意に低値であった. アポトーシス細胞数は IP 群で少なく, 線維化は IP 群で軽度であった. IP の再灌流後の IL-10 mRNA 発現量は non-IP と比較し有意に多く発現していた. 腎機能は IP +anti-IL-10rAb 群で IP +IgG 群に比し s-Cr の有意な上昇を認めた. CXCL1 および CXCL2 の mRNA 発現量は, IP +ant-IL-10rAb 群は IP +IgG 群と比較し有意に多く, 浸潤好中球数も有意に多かった. また, CCL2 の発現量は, IP +ant-IL-10rAb 群において有意に少なく, 浸潤マクロファージ数は有意に少なかった. 以上より腎臓の IP は虚血再灌流後に腎組織中の浸潤好中球数を軽減させる臓器保護効果, IP は虚血再灌流後のマクロファージの浸潤の増強を示すこと, 腎虚血再灌流後の組織障害の軽減に IL-10 が関与を示した.

口頭発表において笠原正典教授より, 腎臓以外の他の臓器でも IP によって浸潤マクロファージ数や IL-10 産生が増加するような知見の有無についての質問があった. この質問に対し, IP における IL-10 産生の増加は肺や肝臓で認められるという報告はあるが, 浸潤マクロファージ数の増加に関しては報告がないことを回答した. また, IP に関する好中球や単球以外の細胞浸潤形態についての質問があった. この質問に対し, 腎の早期の虚血再灌流において好中球や単球以外の T 細胞, B 細胞の浸潤は認められなかったこと, 樹状細胞に関しては今後の研究課題であることを回答した. また, マクロファージにおけるケモカインの発現制御のメカニズムについての質問があった. この質問に対し, マクロファージは NO, Heat shock protein などの臓器保護効果を有する分子によって, 好

中球遊走ケモカインの産生の制御が行われていると回答した。ついで、上出利光教授より浸潤好中球数および浸潤マクロファージ数の虚血再灌流直前や再灌流24時間後以外の動態について質問があった。この質問に対し、IP後の浸潤好中球数の経時的変化は再灌流直前ではほとんど浸潤なく24時間をピークに減衰し、マクロファージについては、24時間後以降は測定データがなく今後の研究課題であると回答した。また、IPが他の臓器に与える影響についての質問があった。この質問に対し、腎のIPによる他臓器への保護的効果については不明であると回答した。また、マクロファージのサブセットの判別方法について質問があった。この質問に対し、マクロファージは好炎症性のM1、抑制性のM2に分類され、M2はCD23やCD168などの標識で解析可能であると回答した。

この論文は、腎虚血再灌流におけるIPの腎保護作用のメカニズムに関する研究の先駆けとなることで北海道医学雑誌において高く評価され、今後のIPのメカニズムの解明およびその知見が臓器移植に臨床応用されることが期待される。

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。