

学位論文題名

Protective effects of erythropoietin and its nonhematopoietic derivatives on mouse cyclosporine nephropathy

(エリスロポエチンおよびエリスロポエチン非造血性誘導体の
マウスシクロスポリン腎症における保護作用)

学位論文内容の要旨

背景および目的: 近年シクロスポリン (CsA) 治療は、移植領域のみならず、多くの自己免疫疾患・腎疾患へと臨床応用が拡大しその有用性が示されてきた。一方、対象疾患の性質上、投与期間が長くなり CsA の慢性腎毒性が大きな問題となっている。CsA 長期投与は、閉塞性細動脈症、虚血性糸球体病変、縞状間質繊維化等を特徴とする慢性 CsA 腎症を惹起する。これらの病変は非可逆的で、しばしば慢性腎疾患へと進行するが、確立された予防・治療法は存在しない。最近の報告によれば、慢性 CsA 腎症の機序として、血管作動性因子の攪乱による虚血性障害と直接的な尿細管細胞毒性、またそれにより惹起される尿細管細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしていると考えられる。エリスロポエチン(Epo)は、赤血球前駆細胞に作用する造血因子であるが、最近の研究において、神経系、循環器系、腎等多くの臓器で、様々な組織傷害に対する保護作用を有することが明らかになってきている。その機序として、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の産生を増加させ局所血流を回復させることや、直接的なアポトーシス抑制作用の存在が指摘されている。臨床応用に向け、組織保護を期待する場合に副作用となる造血作用を弱め、組織保護効果を高めた様々な Epo 類似物質の研究・開発が行われている。我々は、慢性 CsA 腎症の病態に対しこれらの Epo 製剤の組織保護作用が有効である可能性があると考えた。

我々は、慢性 CsA 腎症マウスモデルを作成、CsA 腎症の病態に関与している可能性のある因子について検討し、また Epo および 2 種類の非造血性 Epo 誘導体 asialo Epo (AEpo) と carbamylated Epo (CEpo) の慢性 CsA 腎症に対する腎保護作用について検討を行った。

方法: 5 週齢のオス ICR マウスを、ランダムに Control 群、CsA 単独群、CsA+Epo 群 (Epo 併用群)、CsA+AEpo 群 (AEpo 併用群)、CsA+CEpo 群 (CEpo 併用群) の 5 群に分けた。実験開始の 1 週間前から 0.01% の低 Na 飼料にてコンディショニングを行い、CsA は 30mg/kg/dose を連日皮下注射で、各 Epo 製剤は 1000IU/dose を週 2 回皮下注射で投与した。4 週間の薬剤投与の後、血液、腎組織を採取、各種解析を行った。

採取した血液は、一部でヘマトクリット (Ht) 値を測定、残りを遠心分離し血中尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (sCre) 値を測定した。

腎組織は、新鮮凍結、PLP 固定、ホルマリン固定の三種類の 방법으로標本化した。新鮮凍結および

PLP 固定標本は、各種免疫染色および TUNEL 解析に用いた。ホルマリン固定標本は、H-E 染色および PAS にて染色し、尿細管間質病変の評価に用いた。

結果： CsA 投与開始 2 週間後から、CsA 単独群のマウスに外見上、明らかな消耗が認められた。3 週間後からは、体重減少が顕著となった。Epo 併用群、AEpo 併用群、CEpo 併用群では、明らかな消耗や体重減少は認めなかった。4 週間後の採血において、Epo 併用群のマウスでは、control 群、CsA 単独群と比較して 10%程度の Ht 値の上昇を認めた。

BUN および sCre 値を測定し腎機能を評価した。CsA 単独群と比較して、AEpo 併用群、CEpo 併用群で BUN 値の有意な低下を認めた。また、Epo 併用群、CEpo 併用群で sCre 値の有意な低下を認めた。

病理組織学的に、尿細管間質病変の定量評価を行った。CsA 単独群と比較して、各 Epo 製剤併用群で尿細管間質病変領域の有意な減少を認めた。尿細管間質繊維化の評価のためⅢ型コラーゲンの免疫染色を行ったところ、CsA 単独群と比較して、各 Epo 製剤併用群でⅢ型コラーゲン沈着の有意な減少を認め、病理組織学的評価と一致した結果となった。

CsA 腎症におけるレニン-アンギオテンシン系の影響を評価するため、レニンの免疫染色を行った。control 群を含む全ての群において、糸球体血管極近傍の細胞にレニンの強い発現を認めた。群間の有意差は認めなかった。

CsA 腎症における eNOS および iNOS の発現の変化を免疫染色にて評価した。CsA 単独群では、control 群と比較して著明な iNOS 発現の増加と、eNOS 発現の減少を認めた。Epo 製剤併用群では、CsA 単独群と比較して、有意な iNOS 発現の減少と、eNOS 発現の回復を認めた。

CsA 腎症の尿細管間質障害におけるサイトカインの影響を評価するため、腎尿細管における代表的な炎症性サイトカインであるオステオポンチン (OPN) とそのレセプターである CD44 の免疫染色を行った。Epo 製剤併用群では、CsA 群と比較して、有意な OPN および CD44 の発現の減少を認めた。

尿細管上皮細胞のアポトーシスを評価するため、実験開始から 1 週、2 週、4 週に採取した腎組織について、TUNEL 法および cleaved caspase-3 の免疫染色を行った。TUNEL 法では、CsA 単独群で、CsA 投与期間の延長とともに著明な TUNEL 陽性細胞数の増加を認めた。一方、Epo 併用群では、2 週、4 週で、AEpo 併用群では、2 週のみで、CEpo 併用群では、1 週、2 週、4 週の全てで CsA 単独群と比較して TUNEL 陽性細胞数の有意な減少を認めた。cleaved caspase-3 免疫染色では、CsA 単独群との比較にて、全ての Epo 製剤併用群で、1 週、2 週、4 週の全てで有意な cleaved caspase-3 陽性細胞数の減少を認めた。

考察：最近の研究にて、CsA 腎症の発症・進展においては、血管作動性因子の攪乱から惹起される虚血・低酸素性の組織障害と、直接的な細胞毒性による組織障害の二つが主要な役割を果たしているとされている。また、Epo 製剤の組織保護作用については、直接的なアポトーシス抑制や血管拡張因子である eNOS の産生を増加させることによる局所血流の改善等の関与が指摘されている。

今回の我々の実験では、CsA 投与により、機能的・病理組織学的腎障害が出現し、尿細管上皮細胞のアポトーシスが増加、組織障害性 NOS である iNOS の発現が増加、血管拡張因子である eNOS は減少、炎症性サイトカインである OPN とそのレセプターである CD44 の発現が増加することが示され、CsA 腎症の発症・進展には、これらが重要な役割を持つことが示唆された。一方、Epo 製剤の投与により、機能的・病理組織学的腎障害は明らかに軽減し、尿細管上皮細胞のアポトーシスは著明に

抑制, iNOS の発現は減少, eNOS の発現は増加, OPN・CD44 の発現は抑制されることが示され, Epo 製剤による慢性 CsA 腎症に対する組織保護効果は, これらの作用によるものであることが示唆された。最後に, 組織保護効果を期待する場合には, 副作用となる造血作用についてであるが, Epo 群では, Ht 値の上昇が見られたのに対し, AEpo 群, CEpo 群では, Ht 値の上昇を認めなかった。Epo の過剰投与によって, 脳血管・心血管イベントが増加するという報告もあり, 慢性 CsA 腎症において腎保護を期待して Epo 製剤を使用する際には, 造血作用を示さない AEpo, CEpo が有望であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野々村	克也
副査	教授	久下	裕司
副査	教授	岩永	敏彦
副査	教授	有賀	正
副査	教授	筒井	裕之

学位論文題名

Protective effects of erythropoietin and its nonhematopoietic derivatives on mouse cyclosporine nephropathy

(エリスロポエチンおよびエリスロポエチン非造血性誘導体の
マウスシクロスポリン腎症における保護作用)

シクロスポリン (CsA) 治療は、近年移植領域のみならず多くの自己免疫疾患・腎疾患への臨床応用が拡大し、その有用性が示されてきた。一方、対象疾患の性質上、投与期間が長期化し CsA の慢性腎毒性が大きな問題となっている。CsA の長期投与は、閉塞性細動脈症、虚血性糸球体病変、縞状間質繊維化等を特徴とする慢性 CsA 腎症を惹起する。これらの病変は非可逆的で腎不全へと進行し得るが、確立された予防・治療法は存在しない。

最近、赤血球前駆細胞に作用する造血因子であるエリスロポイエチン (Epo) が、神経系、循環器系、腎等多くの臓器において、様々な組織傷害に対する保護作用を有することが明らかになってきている。また臨床応用に向けて、造血作用を減弱し組織保護効果を高めた様々な Epo 類似物質の開発が積極的に行われている。代表的な組織保護性・非造血性 Epo 誘導体としては、asialo Epo (AEpo)、及び carbamylated Epo (CEpo) が挙げられる。

我々は、マウスモデルを用いて、慢性 CsA 腎症に対する Epo 製剤 (Epo、AEpo、CEpo) の腎保護作用に関する検討を行った。5 週齢のオス ICR マウスを、ランダムに Control 群、CsA 単独群、CsA+Epo 群 (Epo 併用群)、CsA+AEpo 群 (AEpo 併用群)、CsA+CEpo 群 (CEpo 併用群) の 5 群に分けた。CsA 投与開始 1 週間前から 0.01% の低 Na 飼料にてコンディショニングし、CsA を連日皮下注 (30mg/kg/dose)、各 Epo 製剤を週 2 回皮下注 (1000IU/dose) にて投与した。1, 2, 4 週間後に、血液、腎組織を採取し各種解析を施行した。

腎機能 (BUN、血清クレアチニン値) の検討においては、CsA 単独群と比較して、AEpo 併用、CEpo 併用群で BUN 値の有意な低下を認めた。また、全ての Epo 製剤併用群で血清クレアチニン値の有意な低下を認めた。また病理組織学的検討として尿細管間質病変

(striped fibrosis, tubular atrophy)に関する定量的解析を施行したところ、CsA 単独群に比べ、全ての Epo 製剤併用群で尿細管間質病変領域の有意な減少を認めた。さらに間質型Ⅲ型コラーゲンの免疫染色によっても繊維化の有意な軽快が示された。Epo 製剤大量投与による造血効果を検討したところ、Epo 併用群では、control 群、CsA 単独群に対して有意なヘマトクリット (Ht) 値の上昇を認めた。AEpo、CEpo 併用群では、Ht 値上昇を認めず、組織保護を目的とした Epo 製剤大量投与における非造血性誘導体のメリットが示された。

次に、Epo 製剤の CsA 腎症保護効果に関するメカニズムについて検討した。NOS 発現様式に関する免疫組織学的検討では、CsA 単独群では、control 群に比し、尿細管上皮細胞における iNOS 発現の著明な上昇、細動脈における eNOS 発現の低下を認めた。Epo 製剤併用群では、iNOS 発現上昇の抑制と eNOS 発現の回復が有意に認められた。また CsA 腎症発症進展に関与する代表的炎症性サイトカインであるオステオポンチン (OPN) とその受容体である CD44 の発現性を免疫組織学的に評価した。CsA 投与により傷害尿細管上皮に OPN、CD44 発現の著しい誘導が認められるが、Epo 製剤併用群においては、OPN、CD44 発現の誘導が有意に抑制されていた。様々な腎症の発症進展に関与する因子であるレニンアンジオテンシン系賦活化に関しても検討を行ったが、本マウスモデルにおいては全群において Na 制限による著しい腎内レニン発現上昇が認められ、今回の実験系における RAS 系の積極的関与は考え難かった。CsA 投与は、直接、又間接的に尿細管上皮細胞のアポトーシスをもたらす事により慢性腎症発症に関与し得る。CsA 開始 1、2、4 週後の腎組織を用い、TUNEL アッセイ、cleaved caspase-3 の免疫染色を施行したところ、CsA 曝露期間の延長と共に、アポトーシス陽性細胞の有意な増加を認めた。TUNEL 陽性細胞数の抑制は、各製剤間で違いが認められ、特に CEpo 併用群で最も高い陽性細胞数減少が認められた。今後の展開として、2 種の誘導体 (AEpo、CEpo) による様々な効果の違いや各々の至適投与量設定に関しさらに追求する必要性がある。

審査に際し、副査の久下裕司教授よりアポトーシス検討における TUNEL アッセイと Caspase-3 発現の解離、副査の岩永敏彦教授より eNOS 発現の定量性、内因性 Epo 発現に関する質問があった。また副査の筒井裕之教授から、eNOS 発現の腎における局在性、レニンアンジオテンシン系評価に関する質問がなされた。副査の有賀正教授からは、CsA と Epo の相互作用の可能性、ヒト Epo 製剤に対するマウスの感受性に関する質問がなされた。最後に主査の野々村克也教授より、本動物モデルの妥当性、非造血性 Epo 製剤の臨床応用に関する質問がなされた。各々の質問に対し、申請者から適切な返答が得られた。

本研究は非造血性 Epo 製剤が、Epo 大量投与による過剰な造血等の副作用なしに、慢性 CsA 腎症を抑制し得る事を示した点で高く評価され、また本腎症の予防・治療法の確立や将来的な非造血性 Epo 製剤の臨床応用につながる可能性を示すものと考えられた。

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。