

学位論文題名

Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury

(Fibroblast growth factor-inducible 14特異的阻害は
腎虚血再灌流障害を軽減する)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

臓器が虚血状態に陥ると低酸素による障害が生じるが、再灌流によりさらに重篤な臓器障害が引き起こされる。この虚血再灌流障害(IRI)は腎移植において移植臓器機能発現の遅延、急性拒絶反応や慢性臓器障害の原因となり、IRIの軽減は移植腎の長期生着のために重要であるがその機序については不明な点が多い。

TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) はTNFファミリーに属するII型の膜蛋白であり、そのreceptorとしてFn14が同定されている。TWEAK/Fn14 pathwayの働きは、細胞増殖の促進、炎症性サイトカインの分泌やアポトーシスの誘導など非常に多様であることが知られているが、生理的、病的機能についてはほとんど明らかではない。今回はIRIにおけるTWEAK/Fn14 pathwayの役割について検討した。

【材料と方法】

- 臨床検体：虚血再灌流腎として腎移植時の血流再開1時間後の検体を使用し、正常腎として腎臓で摘出した腎の正常部位を使用した。
- ヒト尿細管細胞を用いた *in vitro* での虚血モデル：ヒト遠位尿細管細胞 (RPTEC) を使用し *in vitro* での虚血モデルを作製した。RPTECを24時間培養後、培地を取り除き mineral oil をのせ、37℃で15分培養することで虚血状態にした。その後 mineral oil を取り除き PBS で洗浄後、再度培地をのせ1時間培養後に細胞を回収し RNA を抽出した。
- マウス腎虚血再灌流モデル：C57BL/6 マウス (雄、週齢 8-10 週) を使用し、腎虚血再灌流モデルを作製した。まず右腎を摘出。その後左腎動静脈をクリップで遮断した。虚血中は体温を 32-33℃に保ち、30分後に再灌流した。生存率の検討のために用いた致死モデルでは虚血時間を40分とした。

【結果】

- ヒト臨床検体による Fn14 の発現：Fn14 につき免疫染色したところ、ヒト正常腎に発現は認めなかったが、腎移植時の血流再開1時間後の検体の尿細管に明らかな Fn14 の発現を認めた。
- in vitro*, *in vivo* モデルにおける Tweak, Fn14 の発現と局在の検討：RPTEC を用いた *in vitro* モデル

において、低酸素刺激により Fn14 の発現は有意に増加したが、TWEAK の発現に変化はなかった。IRI in vivo モデルでは、虚血腎における再灌流後の TWEAK mRNA 発現の上昇はマウス正常腎に比べ 1.7 倍であったのに対し、Fn14 の発現上昇は顕著であり、16.4 倍もの上昇を認めた。さらに免疫染色で蛋白レベルの発現を検討した。TWEAK 発現はマウス正常腎、虚血腎ともに腎全体の尿細管に認められた。一方、Fn14 発現は正常腎には認めず、虚血腎の皮髄境界を中心とした尿細管に認められた。これらの局在をさらに検討するため、正常腎、虚血腎の組織を細胞膜、細胞質、核のそれぞれの成分に分離し蛋白を抽出した。これらの TWEAK、Fn14 の蛋白レベルの発現を Western blotting にて検討した。結果、TWEAK は正常、虚血腎の細胞質に認められたのに対し、Fn14 は虚血腎の細胞膜、核に認め、共発現していないことが明らかになった。以上より IRI において、TWEAK 受容体 Fn14 の発現が増加し、Fn14 が IRI の病態に深く関連していることが示唆された。さらに TWEAK と共発現していないことより、Fn14 は TWEAK とは独立して働いていることが考えられた。次に IRI における Fn14 の機能を検討するために Fn14 特異的阻害モノクローナル抗体 (ITEM-2) を用いて詳細に検討した。

- in vitro 虚血モデルにおける Fn14 阻害の効果：低酸素刺激により RPTEC 内の TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 の mRNA 発現は増加したが、ITEM-2 を共培養することにより、これらの発現は有意に抑制された。
- in vivo 虚血再灌流モデルにおける Fn14 阻害の効果：再灌流 24 時間後において、ITEM-2 投与群の血清クレアチニン値は対照群に比し有意に低くかった。また、組織学的には、対照群では著明な細胞浸潤や尿細管壊死を認めたのに対し、ITEM-2 投与群では軽減されていた。免疫染色 (MPO 染色、F4/80 染色) および TUNEL 法にて体系的に検討した結果、抗体投与による虚血腎への好中球およびマクロファージの浸潤抑制および尿細管細胞のアポトーシスの有意な抑制がみられた。さらに腎局所における免疫活性を real-time PCR にて検討したところ、抗体投与により炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β)、ケモカイン (MIP-2、MCP-1)、接着因子 (ICAM-1、E-selectin) の発現は有意に抑制され、これら局所の免疫活性低下と障害抑制効果との関連が示唆された。
- In vivo 虚血再灌流モデルにおける Fn14 阻害の慢性期の効果：Fn14 阻害の長期的な影響を、再灌流 30 日後の虚血腎を用いて Masson trichrome 染色にて検討した。対照群では高度な線維化がみられたのに対し、抗体投与群では有意に抑制されていた。
- In vivo 虚血再灌流致死モデルにおける Fn14 阻害の効果：虚血時間を 40 分にした致死モデルにおいて、7 日生存率が対照群は 9% であるのに対し、ITEM-2 投与群は 50% で有意にマウス生存率が改善した。以上より Fn14 阻害の長期的および前臨床的治療効果が確認された。

【考察】

今回の研究にて虚血再灌流後、尿細管細胞の TWEAK 受容体 Fn14 の発現が増加することが明らかになった。また、TWEAK と共発現していないことより Fn14 は IRI において独立した働きをしていると思われる。IRI における Fn14 の障害促進機序としては、Fn14 の活性化により尿細管細胞より炎症性サイトカイン、ケモカインが分泌されることが考えられる。これらのサイトカインが自然免疫を活性化し尿細管細胞に障害を与える。また、Fn14 の活性化が直接尿細管細胞のアポトーシスを引き起こす可能性もある。Fn14 の阻害によりこれらの経路が抑制され、IRI が軽減させたと考えられる。また、Fn14 の活性化が組織の再生に寄与するとの報告がある。そのため IRI における Fn14 阻害は、長期的には悪影響をもたらすと懸念されたため、今回慢性モデルにおいて IRI 後の繊維化についても検討した。結果として

はFn14阻害により慢性期の繊維化も抑制していた。以上よりFn14阻害はIRIの急性期と慢性期のいずれの障害も抑制し有効な治療法の1つと考えられた。また、ヒト臨床検体において、*in vitro*, *in vivo*モデルと同様に虚血腎でFn14の発現が増加していることが確認できたことは、今後の臨床応用に期待できる結果であった。

【結語】

今回初めて、腎IRIにおいて、TWEAK受容体Fn14が障害促進に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらにFn14特異的阻害は新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 野々村 克 也
副 査 准教授 篠 原 信 雄

学位論文題名

Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury

(Fibroblast growth factor-inducible 14特異的阻害は
腎虚血再灌流障害を軽減する)

臓器が虚血状態に陥ると低酸素による障害が生じるが、再灌流によりさらに重篤な臓器障害が引き起こされる。この虚血再灌流障害(IRI)は腎移植において移植臓器機能発現の遅延、急性拒絶反応や慢性臓器障害の原因となり、IRIの軽減は移植腎の長期生着のために重要である。

TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) は TNF ファミリーに属する II 型の膜蛋白であり、その receptor として Fn14 (Fibroblast growth factor-inducible 14) が同定されている。TWEAK/Fn14 経路の働きは、細胞増殖の促進、炎症性サイトカインの分泌やアポトーシスの誘導など非常に多様であることが知られているが、生理的、病理的機能についてはほとんど明らかではない。今回は IRI における TWEAK/Fn14 経路の関与について検討した。

まず、TWEAK, Fn14 発現について検討した。ヒト近位尿細管細胞を用いた *in vitro* 虚血モデルにおいて、低酸素刺激により Fn14 の発現は増加したが、TWEAK の発現に変化はなかった。次にマウスを用いた *in vivo* IRI モデルにて検討した。虚血腎における TWEAK mRNA 発現の上昇はマウス正常腎に比べ 1.7 倍であったのに対し、Fn14 の発現上昇は顕著で 16.4 倍であった。さらに免疫染色では、TWEAK 発現は正常腎、虚血腎ともに認めたが、Fn14 発現は虚血腎の尿細管にのみ認めた。また、正常腎、虚血腎の組織を細胞膜、細胞質、核の成分に分離し蛋白を抽出し、これらの TWEAK, Fn14 の蛋白レベルの発現を検討した。結果、TWEAK は正常、虚血腎の細胞質に認めたのに対し、Fn14 は虚血腎の細胞膜、核に認め、共発現していないことが明らかになった。

以上より IRI において、Fn14 が IRI の病態に深く関与していることが示唆された。次に Fn14 特異的阻害により IRI が軽減されるか検討した。 *in vitro* モデルにおいて、

低酸素刺激により尿細管細胞の炎症性サイトカインの発現は増加したが、Fn14 阻害により抑制された。また、*in vivo* では Fn14 阻害により虚血再灌流後の血清クレアチニン値の上昇は抑制され、組織学的にも障害は軽減された。また、好中球、マクロファージの浸潤とアポトーシスの抑制がみられ、腎局所における炎症性サイトカインや接着因子の発現も抑制された。さらに、再灌流 30 日後の線維化も抑制された。最後に臨床検体にて Fn14 の発現を検討した結果、ヒト正常腎に発現は認めなかったが、虚血再灌流腎の尿細管に明らかな Fn14 の発現を認めた。

審査に際し、笠原教授より IRI における TWEAK と Fn14 の関係について質問があった。TWEAK は Fn14 の ligand であるが、今回の実験でこの 2 分子が共発現していないことや TWEAK 阻害では Fn14 阻害よりも効果が乏しかったことより、IRI において Fn14 は TWEAK と独立して作用しているか、他の ligand が存在する可能性があるかと回答した。小池教授から TWEAK/Fn14 の免疫細胞への関与について質問があった。TWEAK/Fn14 は文献的に免疫細胞に発現しているとの報告はあるが、本実験では腎に浸潤する免疫細胞に発現は認めなかった。よって IRI においては TWEAK/Fn14 の免疫細胞への関与は少ないと考えられると回答した。また、臨床応用に向けて具体的な抗 Fn14 抗体の投与方法について質問があった。篠原准教授は IRI に関する過去の報告と TWEAK/Fn14 との関係について質問された。過去の報告の多くは免疫細胞に関連するもので、今回の TWEAK/Fn14 は尿細管細胞に関係する経路である。よって、過去の報告とは全く違った作用点であり、他の IRI との治療と併用することでより効果的な治療が期待できると回答した。上出教授は今回使用した抗 Fn14 抗体の働きは TWEAK/Fn14 経路をブロックしているのか、それとも Fn14 に結合しこれらを破壊しているのかの検討をすべきであると指摘した。また、Fn14 の新たな ligand の同定の可能性について指摘された。最後に野々村教授より今回は急性期障害の検討が中心であるため、今後慢性期障害の影響や同種移植モデルにおける慢性拒絶への関与についての検討を行うべきであるとの指摘があった。

この論文は、Fn14 の IRI への関与について明らかにした初めての論文であり、さらに臨床検体においてもその関与を証明した点で高く評価され、今後の IRI の新規治療戦略の 1 つにな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。