

## 論文の内容の要旨

論文題目 Inhibition of VAP-1 enzyme activity attenuates renal ischemia–reperfusion injury via suppression of neutrophil infiltration

(VAP-1 酵素活性の阻害は、好中球浸潤の抑制を介して腎虚血再灌流障害を軽減する)

氏名 田中 真司

近年、急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は臨床転帰に大きな影響を及ぼすことがわかってきたが、現時点において AKI を直接のターゲットとした有効な治療法は確立していない。AKI の原因は多岐にわたるが、虚血がその病態生理において主要な役割を果たしていることは広く受け入れられている。その背景から、AKI のモデルとして、腎虚血再灌流障害が頻繁に使用されている。腎虚血再灌流障害においては、白血球浸潤に伴う炎症が重要な役割を果たすことが知られており、虚血状態では、内皮細胞における接着因子 (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin) の発現が上昇し、これらの阻害が障害の軽減につながる事が多くの方法で報告されている。

Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) は内皮細胞に発現する接着因子の一つであるが、非常に興味深いことに、第一級アミンの酸化的脱アミノ化を触媒する酵素でもある。VAP-1 はホモダイマーを形成する膜貫通型糖タンパクである。膜上での切断により可溶性 VAP-1 (soluble VAP-1: sVAP-1) が産生され、循環血液中で検出されるが、その機能や切断の調節についてはほとんどわかっていない。これまで多くの臓器において、VAP-1 が内皮細胞の他に平滑筋細胞、pericyte、脂肪細胞において発現していることが示されたが、内皮細胞以外での機能についてはほとんど不明である。

炎症状態の組織において VAP-1 は白血球の浸潤を促進し、VAP-1 酵素活性がその機能に重要な役割を果たすことが報告されている。他臓器の炎症性疾患モデルにおいて、VAP-1 酵素活性の阻害が障害を軽減させることが報告されているが、AKI モデルにおける VAP-1 阻害の有

効性については報告がない。以上の背景から、本実験は、特異的な VAP-1 阻害剤の投与により、白血球浸潤の抑制を介して、ラット腎虚血再灌流障害が軽減するかを検討することを目的とした。

動物は雄性 8 週齢の SD ラットを用い、ランダムに vehicle 投与群と VAP-1 阻害剤投与群に分けた。特異的 VAP-1 酵素活性阻害剤は、混餌 (40 mg/kg/day) で手術の 7 日前から投与を開始した。虚血再灌流は、右腎摘出後に左腎を 45 分クランプする方法で行い、0 時間後 (sham; 各群 n=3)、6 時間後 (各群 n=5)、48 時間後 (各群 n=10) に sacrifice を行い、血液及び腎臓を解析に用いた。

以下に結果を記す。まず、sham 手術+vehicle 投与群の腎を用いて免疫組織染色を行った。内皮細胞 (RECA-1 染色) または pericyte (PDGFR $\beta$  染色) との共染色を行い、VAP-1 の分布を確認した。その結果、VAP-1 は内皮細胞よりもむしろ pericyte に強く発現していた。pericyte における VAP-1 の発現は、マウス腎から単離された培養 pericyte を用いた immunoblotting でも確認された。

腎及び血漿における VAP-1 酵素活性は、6 時間後の血漿で上昇していたことを除き、虚血再灌流処置によって有意には変化しなかったが、VAP-1 阻害剤投与によって著明に低下した。VAP-1 阻害に伴い、48 時間後の腎虚血再灌流障害は有意に減少した。すなわち、BUN, 血漿 Cr 濃度, 組織学的尿細管障害スコア, 腎での KIM-1 mRNA 発現レベルがいずれも有意に低下した。

次に、VAP-1 が炎症部位への白血球浸潤において重要な役割を果たすことから、虚血再灌流後の腎での白血球数を計測した。これまでの報告から、虚血再灌流の病態生理において重要な役割を果たすことがわかっている好中球とマクロファージの浸潤について、最も白血球浸潤が著しい部位である皮髄境界において計測した。その結果、両群で差を認めたのは、48 時間後の好中球数のみであり、VAP-1 阻害剤投与群で有意に減少していた。また、両細胞の代表的なケモカイン (CXCL-1, CXCL-2 : 好中球, MCP-1 : マクロファージ) の腎での発現レベルを調べたところ、VAP-1 阻害により発現が低下したのは 48 時間後の CXCL-1 と CXCL-2 のみであった。このことは浸潤細胞数の傾向と一致している。

最後に、VAP-1 阻害が他の主要な接着因子（VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin）の発現に影響を与えるかについて調べた。いずれの因子の発現レベルも、6 時間後・48 時間後において、VAP-1 阻害により影響を受けなかった。

結果をまとめると以下の通りである。（1）VAP-1 はラット・マウスの pericyte で発現が認められた。（2）特異的な VAP-1 阻害剤はラットの腎・血漿における VAP-1 活性を著明に減少させ、腎の虚血再灌流による障害を軽減させた。（3）VAP-1 阻害による腎障害の軽減は、好中球の浸潤および CXCL-1, CXCL-2 発現の抑制と関連していたが、VAP-1 阻害はマクロファージ浸潤および MCP-1 発現には影響を与えなかった。（4）その他の主要な接着因子（VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin）の発現レベルは、VAP-1 阻害により影響を受けなかった。以上より、VAP-1 阻害は好中球浸潤抑制を介して、腎の虚血再灌流障害を軽減させることが示唆された。

今回のデータからは、VAP-1 はラット・マウスの pericyte に存在することが示唆されたが、これまでの VAP-1 に関する報告の多くは、内皮細胞に発現している VAP-1 に関するものである。一方、2015 年には肝の星細胞（pericyte に相当）に VAP-1 が発現しており、様々な白血球の浸潤を促進し、肝の炎症や線維化に関与するが報告されている。

本実験では、VAP-1 阻害が好中球浸潤の抑制を介して腎虚血再灌流障害を軽減することが示唆されたが、実際、他臓器において VAP-1 阻害による炎症の軽減が、好中球浸潤の抑制と関連して観察されることが報告されている。今回観察された好中球浸潤の抑制が、軽減した腎虚血再灌流障害の原因ではなく結果であるという可能性は否定できない。しかし、このモデルにおいて、軽減した障害が必ずしも白血球浸潤の抑制につながるという報告があり、また本実験ではマクロファージの浸潤は抑制されていなかった。これらのことは、本実験における好中球浸潤の抑制は、軽減した腎虚血再灌流障害の原因であることを示唆していると考えられる。

VAP-1 酵素活性がこのモデルにおいて好中球浸潤を促進するメカニズムについては、以下の可能性が考えられる。（1）pericyte に発現した VAP-1 が、接着因子として機能する。（2）pericyte に発現した VAP-1 が、好中球走化性因子の役割を果たす。2015 年に肝の星細胞が酵素活

性を有する VAP-1 (sVAP-1) を放出することが示され、これが白血球走化性因子として働くことがわかった。この性質の少なくとも一部は、酵素反応産物である過酸化水素によることも示されている。(3) CXCL-1, CXCL-2 は pericyte でも産生されることから、炎症時において VAP-1 がこれらのケモカインの発現上昇に関与している可能性がある。しかし、VAP-1 阻害によるこれらのケモカイン発現の抑制は、軽減した腎障害や好中球浸潤の結果である可能性も十分ある。

(4) 最後に、血中の sVAP-1 が関与している可能性は否定できない。

本実験における限界は以下のものが考えられる。まず、今回使用した特異的 VAP-1 阻害剤によるオフターゲット効果は否定できない。pericyte 特異的な VAP-1 ノックアウトマウスを用いた実験により解決できると思われるが、pericyte に真に特異的なマーカーは現在まで知られていない。さらに、VAP-1 阻害が好中球浸潤、ひいては腎虚血再灌流障害を軽減させるメカニズムは不明のままである。さらなる *in vivo*、*in vitro* の実験が必要と思われる。

いくつかの限界はあるものの、本実験は、腎の pericyte に発現している VAP-1 が虚血再灌流障害において好中球浸潤をコントロールしており、虚血性 AKI の治療ターゲットになり得ることを示唆している。