

論文の内容の要旨

論文題目 腎虚血後間質線維化モデルについての検討

氏名 山野 水紀

背景と目的

近年、急性腎障害(AKI ; acute kidney injury)と慢性腎臓病(CKD ; chronic kidney disease) は双方が互いのリスクとなるだけでなく、生命予後も悪化させることが示唆されており、AKI後にCKDを発症するAKI to CKD continuumが臨床的に大きな問題となってきた。

そのような背景の中で、近年AKI to CKD continuumの発症機序に関する研究を散見する。その際に用いられる動物モデルとしては、臨床的には腎性AKIの原因として虚血による急性尿細管壊死がもっとも頻度が高いため、腎虚血再灌流障害によるAKIの導入が多く用いられている。しかし、報告により様々に異なる腎虚血再灌流障害を用いたモデルが用いられており、AKI to CKD continuumにおける動物モデルが確立されているとは言い難い状況である。

一方CKDの進展は、最終的には間質線維化に代表される尿細管間質病変という最終共通経路 (final common pathway) を介して末期腎不全に至ると考えられている。これをもたらすメカニズムの一つとして、腎組織におけるレニン-アンジオテンシン系 (RAS, Renin-Angiotensin System) があり、さまざまな要因によりRASが亢進し、アンジオテンシンIIが増加することでTGF- β の発現が亢進し、種々の線維化促進因子が惹起される。

ここでは腎虚血後間質線維化として用いられているマウスモデルを2種類作成し、CKDに効果的かつ広く使用されているアンジオテンシンII Type1受容体(AT1R)拮抗薬に対する反応性を比較することで、より最適なマウスモデルおよび腎虚血後間質線維化のメカニズムについて検討した。

方法

8週齢、体重23~26gの野生型であるC57BL/6Jの雄のマウスを使用し、片側腎虚血再灌流障害および対側片腎摘の有無により、二つの腎虚血後間質線維化モデルを作製した。両群(I群, I+N群とする)に1日目に中等度の片側腎虚血再灌流障害を加え、I+N群にのみ8

日後に対側片腎摘を追加し、4週後の腎障害を形態学的、血清学的および組織学的に評価することで両モデルの違いを評価した(実験1)。次いで実験2では、この二つのモデルにAT1R拮抗薬であるtelmisartan(低用量群;3mg/kg/日,高用量群;10mg/kg/日)を10日目から経口投与し、実験1と同様にそれぞれのモデルにおける腎障害の程度をvehicle群と比較した。また、線維化に関わるmRNA発現量を定量的リアルタイムPCRにて定量し、Western blot解析により α -SMAなどの蛋白発現量を解析し、telmisartanによる腎虚血後線維化への影響の差異を両モデル間で比較検討した。

結果

実験1

I群における腎重量はSham群の46.2%まで減少したのに対し、I+N群では統計学的に有意な減少を認めず、腎萎縮が大きく軽減された。28日目におけるBUN値(I群;26.8 \pm 1.6 mg/dl, I+N;34.9 \pm 5.2 mg/dl), およびMT染色での線維化領域(I;7.6 \pm 3.1% (n=4), I+N;I+N 3.5 \pm 0.8%)においても、I群で明らかに軽減していた。

実験2

telmisartan高用量の投与により、I群のみにおいて、腎重量がvehicle群の131.5%となり、腎萎縮が有意に軽減された。MT染色における間質の線維化領域は、vehicle群の63.4%と有意に減少した。血清学的評価においては、血清クレアチニン値(HPLC)の有意な低下を認めた。虚血側における α -SMA, TGF- β 1, PAI-1, galectin-3のmRNA発現量に関しても、I群高用量でのみvehicle群に比較し有意に低下していた。また、同群における α -SMA, およびgalectin-3の蛋白発現量においても、vehicle群に比較し有意な低下を認めた。以上より、I群においてのみtelmisartan高用量投与による虚血後間質線維化の軽減効果を認めるという結果を得た。

考察

作製した動物モデルにおいてtelmisartan投与により腎虚血後間質線維化を軽減し得た。腎組織での α -SMAの発現低下と共に、TGF- β 1, PAI-1, galectin-3の発現低下を認めており、AKI to CKD continuumの発症機序において、これらの線維化促進因子およびRASが関与するpathwayの存在が示唆される。

TGF- β はEMT(Epithelial-mesenchymal transition)を誘導する諸因子の中で最も重要な役割を担っており、UUOモデルにおいて、AT1R拮抗薬が腎組織中アンギオテンシンIIの減少およびTGF- β , α -SMA, I型コラーゲンの発現を抑制し、間質線維化進展を抑制するとされている。PAI-1については、培養線維芽細胞においてアルドステロンにより発現が増強され

るとされ、さらに TGF- β とアルドステロンそれぞれによる PAI-1 発現増強作用が相互に影響し、間質の線維化を加速度的に促進している可能性が報告されている。また、ラットにおける血管線維化において、galectin-3 がアルドステロンにより惹起される線維化をミネラルコルチコイド受容体活性依存性に介在するとの報告がある。本実験においてもこれらの機序と同様に、telmisartan によりアルドステロンが低下し、腎組織での PAI-1 および galectin-3 の発現が抑制され、腎虚血後間質線維化の改善がもたらされた可能性が考えられる。

本研究において、非虚血側の腎摘出を行わなかったモデルでのみ、telmisartan による線維化を含む腎障害の軽減効果を認め、二つのモデル間での反応性の違いを認めた。片側の虚血再灌流障害モデルにおいて、非虚血側の腎臓の存在は post-AKI fibrosis を増強することが「Renal Counterbalance」として古くから知られている。このメカニズムは完全には明らかにされていないが、非虚血側の腎摘出による皮質内での ET-1 上昇抑制、低酸素による増殖因子の発現増加抑制、G2/M arrest および JNK signal を介した線維形成性サイトカイン産生抑制、low PTEN による尿細管 degeneration 促進などの関与がこれまでに報告されている。このように様々なメカニズムが提唱されている中で、非虚血側の腎摘により障害側への腎血流量 (Renal Blood Flow ; RBF) が上昇することは明らかであり、それによる虚血側における低酸素の軽減が post-AKI fibrosis の改善に寄与していると考えられる。本研究で用いた AT1R 拮抗薬は、輸出細動脈を拡張し糸球体濾過圧を低下させることで腎保護作用を発揮するが、そのみならず、腎臓の血管拡張により RBF 自体を上昇させ、腎虚血や低酸素の改善をもたらすとの既報がある。本研究で認めた telmisartan による post-AKI fibrosis の軽減は、AT1R 拮抗薬により非虚血側の腎摘を行った際に生じるような虚血側の RBF の上昇および組織の虚血や低酸素の軽減効果がもたらされ、post-AKI fibrosis の改善に寄与した可能性が考えられる。

次に、腎虚血再灌流障害後に進展する間質線維化の評価に際して、いずれの動物モデルが適しているのかについて考察する。片側の腎虚血再灌流障害を用いた post-AKI fibrosis のモデルは、両側の腎虚血再灌流障害モデルにおいて生じる mortality の高さや障害の程度のバラつきという問題を改善できる一方で、非虚血側腎の存在の有無が間質線維化メカニズムへ影響し、実験結果を左右する可能性が考えられる。本研究がその一例であり、CKD 治療のゴールドスタンダードとして使用されている RAS 阻害薬への反応性に影響することが確認された。非虚血側の腎摘を加えたモデルは、血清学的手法によって経時的かつ簡便に腎障害の程度を評価できる利点があるものの、ヒト臨床に即した動物モデルとは言い難く、さらに非虚血側の腎摘による RBF 上昇などによってもたらされる多様なメカニズムが作用し、腎虚血後線維化の程度が修飾され、真の結果を得られない可能性があることが示唆される。一方で、非虚血側の腎摘によりダイナミックに RBF が変化し、間質の線維化に先立つ低酸素や、尿細管上皮細胞の degeneration 促進といった現象が増幅されるため、

これらのメカニズムのさらなる解明を目的とする際に適している可能性がある。しかし、AKI to CKD continuum における final common pathway としての間質線維化について、薬剤介入などに対する反応性の評価を目的とする際には、線維化への修飾を受けず、よりヒト臨床における病態を再現していると思われる非虚血側の腎摘を行わない片側腎虚血再灌流障害による動物モデルが適していると考察する。

結論

本研究により AKI to CKD continuum の発症機序として RAS が関与している可能性が示唆された。また、非虚血側腎の存在の有無による間質線維化メカニズムへの影響が実験結果を左右する可能性が十分考えられ、腎虚血後間質線維化の動物モデルの選択に際しては、研究の目的やターゲットとなるメカニズムに応じて、十分に検討の上選択する必要があることが示唆された。