

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 片桐大輔

本研究は急性腎障害 (AKI) において今後新たな治療ターゲットと考えられている遠隔臓器からの腎保護作用を明らかにするため、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) に注目し以下の解析を行った。Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬はラット虚血性腎障害モデルで腎保護効果が報告されているがその機序については不明である。腸管由来のインクレチンホルモンであるGlucagon-like peptide-1 (GLP-1) は膵臓β細胞や心筋細胞で抗アポトーシス効果が報告されている。本研究ではアポトーシスはその主たる原因と考えられているシスプラチン急性腎障害 (CP-AKI) モデルを用いて、DPP-4阻害薬のAKIに対する効果を検討したものであり下記の結果を得ている

1. C57/B16 雄マウスに選択的 DPP-4 阻害薬であるアログリプチン (AG) 10 mg/kg/日あるいは生理食塩水を連日経口投与し、投与 7 日目に 15 mg/kg のシスプラチン (CP) を腹腔内投与した。CP 投与後 96 時間で著明な BUN や Cre の上昇、組織障害がみられたがこれらは AG 投与群では抑制された。AG 投与に伴った有意な体重変化や血糖変動は認めなかった。8-OHdG 染色および 4-HHE 染色にて酸化ストレスの程度を評価したところ、CP 投与に伴う 8-OHdG および 4-HHE 陽性集積が AG 投与群では抑制されていた。
2. CP 注射 96 時間後では ssDNA および cleaved caspase-3 陽性尿細管細胞の著明な増加が見られたが、AG 投与によってこれらは有意に改善された。kidney homognates から RNA を回収し、cDNA を得たのち、アポトーシス因子 (Bax, Bim) および抗アポトーシス因子 (Bcl-2, Bcl-xL) の発現に関してリアルタイム PCR を用いて定量化評価したところ CP 注射によってアポトーシス促進/制御因子 mRNA 比が亢進していたが、これらは AG 治療によって有意に低下した。
3. DPP-4 活性を血中と腎組織の両方で ELISA を用いて検討したところ、AG 投与によって両者とも有意に活性が抑制されていた。DPP-4 の代表的な各基質を網羅的に評価したところ治療群では CP 注射 48 時間後より血中 GLP-1 濃度の上昇が見られ、非治療群に比べて有意に高値であった。GLP-1 と対照的に、他の基質である SDF-1 濃度や NPY 濃度は AG 非治療群で AG 治療群に比べて高い傾向を示した。以上より GLP-1 の濃度上昇が CP-AKI における AG の腎保護効果に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

4. CP-AKI における GLP-1 の役割を明確にすべく、GLP-1 受容体作動薬である Exendin-4 (Ex-4) あるいは生理食塩水を連日経口投与して7日目にCPを投与するモデルも検討した。PCRを用いて正常腎にGLP-1Rの発現を確認した。CP投与あるいはAG, Ex-4投与によってその発現レベルに変化は認めなかった。Ex-4投与によってAGと同じように腎保護効果をBUN, Cre, PAS染色で確認し、ssDNAやcleaved casase-3陽性細胞の抑制およびリアルタイムPCRを用いての定量化評価でもCP注射によるアポトーシス促進/制御因子 mRNA比の亢進はEx-4治療によって有意に低下した。
5. GLP-1Rの発現を改めてウエスタンブロットで検討し、その局在は免疫染色にて腎近位尿細管にあることを確認した。GLP-1Rを介した pathway がCP-AKIにおけるAGの腎保護作用に寄与していることを検討するために、*in vivo*のGLP-1Rに対するsmall interfering RNA (siRNA)を用いた実験を行った。GLP-1Rのノックダウンが十分に行われていることをRT-PCRとウエスタンブロットで確認した。*in vivo* siRNAでGLP-1Rを抑制したところ、AGによるCP-AKIの腎保護作用はキャンセルされたことをBUNやCreの測定および組織学的検討で確認した。

以上の結果から、本論文はDPP-4の主要な基質である腸管由来のGLP-1が、血糖降下作用以外の抗アポトーシス作用を腎臓で発揮しシスプラチン腎症を改善させた可能性が考えられた。AKIにおいては腎臓から遠隔臓器への障害である遠隔臓器障害が動物実験レベルで注目されているが、反対にAKIに際して遠隔臓器から腎臓に保護的に働く作用が今後注目されてくると思われる。本研究の結果からDPP-4阻害薬のAKIに対する保護的な作用およびその機序が明らかになり、またAKIにおける新たな治療ターゲットとして腸腎連関の可能性が示唆されたため、学位の授与に値するものと考えられる。