

中沢有香 論文内容の要旨

主 論 文

Recombinant Human Erythropoietin Attenuates Renal Tubulointerstitial Injury in Murine Adriamycin-Induced Nephropathy

(合成ヒトエリスロポエチンがマウスアドリアマイシン腎症における腎尿細管間質障害を軽減する)

Yuka Nakazawa M.D., Tomoya Nishino M.D., Ph.D., Yoko Obata M.D., Ph.D., Masayuki Nakazawa M.D., Akira Furusu M.D., Ph.D., Katsushige Abe M.D., Ph.D., Masanobu Miyazaki M.D., Ph.D., Takehiko Koji Ph.D., Shigeru Kohno M.D., Ph.D.

(Journal of Nephrology)
〔in press〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：河野茂教授)

緒 言

腎疾患における尿蛋白の存在は、腎障害進展危険因子の一つである。その腎障害進展機序として、近位尿細管細胞が尿蛋白に暴露されることで炎症や線維化を促進するサイトカインを間質へ放出し尿細管間質障害をもたらすと推察されている。さらに、間質の線維化により、尿細管周囲毛細血管が減少し腎組織の虚血が惹起されることで、尿細管間質障害を助長することが明らかとなっている。

エリスロポエチン(EPO)は、腎性貧血の治療薬として広く臨床使用されている。近年、腎局所における EPO 受容体の存在が明らかとなり、EPO が貧血改善作用のみならず直接的に腎臓に作用することで組織保護効果を発揮する可能性が示唆されている。今回我々は、多量の尿蛋白により腎間質障害を引き起こす巣状分節状糸球体硬化症(FSGS)のモデルであるマウスアドリアマイシン腎症(AN)に対して EPO を投与し、EPO の尿細管間質障害抑制効果について検討した。

対象と方法

BALB/c マウス(6 週齢メス)にアドリアマイシン(ADR)12mg/kg を尾静脈より投与し AN を惹起した。このマウスに EPO (600 単位/kg)を 7、14、21 日目に腹腔内投与した群を AN-EPO 群、EPO の代わりに同量の生理食塩水を腹腔内投与した群を AN-saline 群とした。一方、ADR の代わりに同量の生理食塩水を尾静脈より投与したマウスを対照群として 2 群に分け、EPO を投与した群を EPO-control 群、生理食塩水を投与した群を saline-control 群とした。ADR 投与から 14 及び 28 日目に血液、尿、ならびに

腎組織を採取した。線維化の評価はマッソントリクローム染色で行い、画像解析装置を用いて間質線維化面積を半定量化した。EPO レセプター(EPO-R)、血管内皮細胞のマーカーである CD34 の発現は免疫組織化学的に検討した。アポトーシスの評価は、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)法と active caspase-3、phosphorylated Akt の免疫組織化学染色により行った。また、pimonidazole 染色にて組織の低酸素の評価を行った。各染色での陽性面積ならびに陽性細胞数は顕微鏡倍率 200 倍で無作為に 8 視野を数え、平均陽性面積または陽性細胞数を各群間で比較した。血液検査ではヘマトクリット(Hct)、ヘモグロビン(Hb)、尿素窒素(BUN)を測定し、尿蛋白量は畜尿で評価した。

結 果

EPO-R の発現は糸球体、尿細管上皮細胞、血管内皮細胞に認められた。AN-saline 群において著明な間質線維化を認めたが、AN-EPO 群ではその線維化は有意に抑制されていた。CD34 陽性面積は、AN-saline 群と比較して AN-EPO 群において陽性面積の増加を認め、pimonidazole 染色による低酸素の評価でも、AN-saline 群と比較して AN-EPO 群において低酸素領域の減少を認めた。アポトーシスに関しては、AN-EPO 群において TUNEL 陽性細胞数や active caspase-3 陽性細胞数の減少を認め、尿細管間質領域における phosphorylated-Akt 陽性面積の増加を認めた。一方、Hb 濃度や Hct 値は各群間で有意差を認めなかった。尿蛋白と BUN 値は、14 日目に AN-saline 群と比較して AN-EPO 群で有意な減少を認めたが、28 日目には有意差を認めなかった。

考 察

本研究では腎組織における EPO-R の局在を確認し、AN において EPO 投与により Hct や Hb 値を変化させることなく腎尿細管間質障害を改善することが明らかとなった。本研究における AN 腎症の腎組織は、これまでの報告と同様に血管内皮細胞のマーカーである CD34 陽性面積の減少並びに pimonidazole 陽性低酸素領域を腎皮質に広く認め、尿細管間質障害に伴う尿細管周囲毛細血管の減少が尿細管間質領域の低酸素を引き起こしていることが示された。一方、EPO 投与により CD34 陽性面積の増加と pimonidazole 陽性領域の減少を認めたことから、尿細管周囲毛細血管の減少抑制による腎組織の低酸素状態の改善が腎間質障害軽減につながったと考えられた。また、EPO 投与による組織保護作用のメカニズムとしてアポトーシスとの関連を検討したところ、EPO 投与群でアポトーシス細胞の減少を認めたことから、AN の尿細管間質障害にアポトーシスも重要な役割を果たしていることが推察された。さらに、phosphorylated-Akt の増加、active caspase-3 の発現減少を認めたことから、EPO のアポトーシス抑制作用は、PI3-kinase/Akt pathway の活性化によるものが考えられた。以上の結果より、AN において EPO は尿細管上皮細胞のアポトーシスを減少させ、尿細管周囲毛細血管を保護し低酸素を改善することで造血作用とは独立した腎尿細管間質障害改善効果を発揮すると考えられた。