

論文の内容の要旨

論文題目：

Molecular Mechanisms of Glomerular Epithelial Cell Damage and Possible Role of Statin Therapy in Kidney Diseases

糸球体上皮細胞傷害の分子機序解明とスタチン製剤による治療の有用性

指導教員 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士過程

内科学専攻

柴田 茂

腎糸球体上皮細胞(足細胞、ポドサイト)は糸球体基底膜の外層に位置する一層の細胞群である。ポドサイトの大きな特徴のひとつはその複雑な細胞形態であり、細胞体から足突起と呼ばれる多数の突起を伸ばし隣接するポドサイトの足突起と相互に噛み合う形で糸球体基底膜を覆っている。このポドサイトの足突起間にはネフリン・ポドシンなどの分子から構成される特殊な細胞間接着装置(スリット膜)が存在する。ネフローゼ症候群ではポドサイトの足突起癒合やスリット膜の消失が認められ、またネフリンやポドシンは先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子のひとつであることから、ポドサイトの足突起やスリット膜は糸球体において濾過障壁を形成し、血漿蛋白の尿中への漏出を防いでいると考えられている。ポドサイトではその複雑な細胞形態を維持するためにアクチン線維を初めとする細胞骨格が発達しており、その制御機構のひとつとして低分子量 G 蛋白質 Rho の関与が報告されているが、細胞骨格形成の詳細な機構やポドサイト傷害時に見られる足突起癒合などの形態学的変化の分子機序は現在までのところ明

らかとなっていない。

3-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬、いわゆるスタチンは多くの大規模臨床試験から、心血管保護作用を有することが報告されている。スタチンの心血管保護効果はその脂質低下作用に依存するところが大きいですが、脂質低下作用とは独立したいわゆる多面的作用を有することも知られている。この多面的作用としては抗炎症作用、核転写因子の抑制、低分子量 G 蛋白質 Rho family の抑制などがあり、虚血再灌流モデル、シクロスポリン腎症モデルなどの動物モデルにおいてスタチンが多面的作用を介して腎障害を軽減することが報告されている。

近年いくつかの臨床試験から、スタチンが糸球体腎炎やネフローゼ症候群において蛋白尿減少効果を有することが報告されている。しかし、その機序はこれまでのところ明らかにされておらず、またスタチン製剤のポドサイト傷害に対する効果はこれまでほとんど検討されていない。そこで、我々はポドサイト傷害時の形態変化に低分子量 G 蛋白質 Rho の過剰な活性化が関与し、スタチン製剤は Rho の過剰活性化を抑制することによってポドサイトに対して保護的に作用する、という仮説のもと、動物ネフローゼモデルにおいてポドサイト傷害の機序およびスタチンの保護効果の検討を行った。

【方法】

In vivo: ラット puromycin 腎症にフルバスタチン(10mg/kg/日)を経口投与し、蛋白尿、糸球体上皮細胞関連分子の発現変化ならびに RhoA 活性を比較検討した。RhoA の活性は膜分画 RhoA のウエスタンブロッティングにより評価した。また、特異的 Rho-kinase 阻害薬であるファスジルの効果を合わせて検討した。

In vitro: 培養糸球体上皮細胞において puromycin およびフルバスタチンの RhoA 活性および細胞骨格に及ぼす影響を検討した。

【研究成果】

結果 1. スタチンは動物ネフローゼモデルにおいて蛋白尿・podocyte 傷害を軽減する。

puromycin(10mg/100gBW)投与により投与 7 日目で著明な蛋白尿が認められたが(432±25.1mg/日)、スタチン治療群では蛋白尿は有意に抑制されていた(292.6±40.1mg/日、P<0.01)。免疫染色では puromycin 腎症において糸球体上皮細胞関連分子である nephrin および podocin の著明な発現低下がみられたが、スタチン投与群ではこれらの分子の発現低下が改善しており、ウエスタンブロッティング法でも同様の結果が得られた。遺伝子レベルの解析では nephrin の mRNA 発現は puromycin 投与後 24 時間で有意に低下しており、スタチンはこの変化を抑制していた。また、電子顕微鏡を用いた検討では、puromycin 腎症群では podocyte foot process の広範な癒合が認められたが、

スタチン投与群では、foot process 癒合の軽減が認められた。

結果 2. puromycin 腎症における podocyte 傷害において Rho の過剰活性化が認められる。

腎臓および糸球体分画において RhoA 活性の解析を行ったところ、puromycin 腎症において有意な RhoA 活性の上昇が認められ、スタチン群では RhoA の活性化が抑制されていた。さらに、培養糸球体上皮細胞を用いた検討では、puromycin(5 μ g/ml)負荷により糸球体上皮細胞において RhoA 活性が上昇しており(P<0.05)、同時にアクチン線維の再構成が認められた。スタチン存在下では puromycin による RhoA の活性化は抑制され、アクチン線維の変化も抑えられた。

結果 3. 特異的 Rho-kinase 阻害薬による Rho/Rho-kinase 系の抑制は puromycin 腎症における蛋白尿、podocyte 傷害を軽減する。

Rho-kinase 阻害薬を用いて puromycin 腎症における Rho/Rho-kinase 系抑制の効果を検討した。特異的 Rho kinase 阻害薬であるファスジルを puromycin 腎症に対し 30mg/kgBW にて投与したところ蛋白尿は有意に減少し、podocyte 傷害の軽減も認められた。この結果より、本モデルの podocyte 傷害に Rho 過剰活性化が関与し、スタチンの podocyte 保護作用の機序として Rho 活性化を抑制することが一因と考えられた。

【結論】

腎糸球体上皮細胞障害に Rho の活性異常が関与すると考えられた。スタチン製剤は Rho の過剰活性化を抑制することにより糸球体上皮細胞保護的に作用する可能性があると考えられる。