

論文の内容の要旨

論文題目 PPAR アゴニストによる尿細管 L-FABP 発現増強を介した

Cisplatin 腎症の抑制効果

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

医学博士課程

内科学専攻

氏名 根岸 康介

背景

急性腎不全の死亡率は、持続的血液濾過透析（CHDF）などを含めた ICU での集学的治療が進歩した今日においても依然として 40～70%と高い。また、日本では 2004 年末までに透析患者総数は 24 万人を超え、毎年 1 万人ずつ増加している。特に糖尿病性腎症による透析導入患者が全体の 40%を超え、さらに増え続けている日本において、糖尿病とその標的臓器障害の一つである腎障害の早期診断・治療が重要である。つまり、急性・慢性腎不全ともにこれまで以上に病態早期からの治療介入が不可欠であるが、有用な早期診断ツールがなく、バイオマーカーの確立が求められている。

近年、心臓(2)や腸管(3)の虚血性疾患において、障害早期に脂肪酸結合蛋白（Fatty acid binding protein, FABP）が血中で上昇することが報告された。また、細胞内の ROS scavenger として機能している可能性が示唆されている。

さらには種々の腎疾患においても尿中の L-FABP が高値となることが報告されている(6-10)。肝臓型である L-FABP はヒトにおいて肝臓で強く発現するとともに腎臓では近位尿管に発現しており、核内受容体の一つである PPAR がプロモーター領域に結合することで転写の制御を受ける。腎臓における PPAR の関与についてはマウス Cisplatin 腎症において、PPAR α 活性の低下により尿管への脂質の蓄積、Apoptosis の誘導が起これ、PPAR α アゴニスト投与で尿管での脂質蓄積が消失すると同時に尿管障害が著明に改善することが確認されている。

ここで、尿管障害での尿中 L-FABP の役割を検討するにあたり、げっ歯類では一般に、L-FABP 遺伝子のプロモーター領域に腎臓での発現に対する silencing sequence が存在する(14)ため、腎臓においてはノックアウト動物であることが知られており、human L-FABP (hL-FABP)遺伝子を導入した“humanized mice”を用いることでヒトでの腎障害における病態生理の解析を試みることにした。

目的と方法

第一に、尿管障害でのバイオマーカーとしての有用性を評価するため、腎虚血再灌流障害と Cisplatin 腎症という異なる急性腎不全モデルについて通常の障害とさらに軽度の障害モデルを作製し、既存の腎機能マーカーと尿中 L-FABP との感度の違いを検討した。第二に、尿管においても PPAR アゴニストによって L-FABP が誘導されることを *in vitro* study で検討した。最後に、PPAR アゴニストによる Cisplatin 腎症の介入効果を humanized mice を使用して、尿中 L-FABP をモニタリングすることで検討した。尿中 L-FABP の測定には、高感度な sandwich ELISA キットを使用した。

結果

野生型マウスの両腎 30 分間虚血により再灌流 3 時間後、24 時間後いずれにおいても偽

手術群 (sham) に比べて有意な BUN の増加を認めた (50.8 ± 1.0 , 118.8 ± 4.4 ; $n = 10$)。変異型マウスの両腎 30 分間虚血においても再灌流 3 時間後、24 時間後ともに偽手術群に比べて有意な BUN の増加 (33.6 ± 3.4 , 94.1 ± 4.7 ; $n = 5$)、尿中 NAG 増加、組織学的な尿細管障害所見を認めたが、野生型マウスの 30 分間虚血群と比較して再灌流 3 時間後、24 時間後いずれにおいても有意な BUN 増加の抑制や、再灌流 24 時間後の尿細管障害の軽減を認めた。一方、変異型マウスの 5 分間虚血群では偽手術群と比較して有意な BUN 増加や尿中 NAG 増加はみられなかったが、S3 領域のごく一部に尿細管上皮の脱落がみられた。また、偽手術群では BUN や組織学的所見に有意な変化は認めなかった。腎組織 hL-FABP 免疫染色では、野生型マウス腎に陽性像はみられなかったが、変異型マウス偽手術群では皮質外層の近位尿細管上皮細胞、Bowman 嚢上皮細胞で陽性であり、変異型マウス 5 分間及び 30 分間虚血群では皮質外層から髄質外層付近の近位尿細管上皮に発現の増強が認められたが、30 分間虚血群でより顕著だった。変異型マウスの 30 分間または 5 分間両腎虚血再灌流障害での尿中 hL-FABP は、30 分間虚血群、5 分間虚血群ともに再灌流 1 時間後にそれぞれ虚血前のおよそ 1300 倍、150 倍まで著明に増加し、再灌流 3 時間後以降は徐々に減少したが、12 時間後まで虚血前に比較して有意な高値を示した。30 分間虚血群と 5 分間虚血群では再灌流 24 時間後、及び全経過と比較しても 30 分間虚血群で有意に増加しており、虚血時間が長いほど尿中排出量も増加した。

変異型マウスでの Cisplatin 5 または 20mg/kg 投与後の BUN は、Cisplatin 投与前と比較して、48、72 時間後に高用量群のみ有意な増加を示した。低用量群では経過中に有意な BUN の増加はみられなかったが、尿中 hL-FABP は高用量群、低用量群ともに Cisplatin 投与前と比較して (15.3 ± 3.3 , 14.0 ± 1.9)、投与 24 時間後には有意な増加を示した (1334.9 ± 220.3 , 70.1 ± 25.8)。両群とも経時的に増加し、72 時間後にはそれぞれ 8422.6 ± 1673.6 、 165.1 ± 50.3 に達した。

hL-FABP 遺伝子を導入したマウス近位尿細管培養細胞を Bezafibrate と 24 時間共培養

し、定量的リアルタイム PCR で発現量を比較したところ、Bezafibrate の用量依存性に hL-FABP mRNA が誘導された。

L-FABP の尿細管での発現増強によるマウス Cisplatin 腎症への効果を検討するため、Cisplatin 投与 7 日前より通常飼料もしくは 0.5%Bezafibrate 混合飼料を投与し、変異型、野生型マウスにそれぞれ Cisplatin または生食を投与した (表 1)。野生型マウスの CP 群、Bz+CP 群、及び変異型マウスの CP 群では 48 時間後、72 時間後に経時的な BUN の増加を認めたが、Bz+CP 群では 72 時間後に Control 群と比較して明らかな増加を示したものの、CP 群の増加よりも有意に抑制されていた。Cisplatin 投与 72 時間後の ATN score 及び Apoptosis index は、野生型の CP 群、Bz+CP 群、変異型の CP 群ではいずれも高値であったが、変異型の Bz+CP 群では有意に軽減していた。Cisplatin 投与 24、72 時間後の腎組織 hL-FABP 免疫染色は、変異型 Control 群に比べて Bz 群で S1、S2 領域の近位尿細管上皮に発現が誘導されており、変異型 CP 群、Bz+CP 群では S1、S2 領域と一部の S3 領域の近位尿細管上皮に強い発現がみられた。また hL-FABP 陽性細胞の多い尿細管は比較的形態が保たれていたが、障害による管腔の拡大や上皮の脱落を伴う尿細管には陽性細胞が減少もしくは消失していた。変異型マウスの尿中 hL-FABP は Control 群に対して Bz 群は有意に増加していた。CP 群は 24 時間後には 15.3 ± 3.3 [$\mu\text{g/gCr}$] から 1335.0 ± 220.3 まで著増し、その後も経時的に増加していき、72 時間後には 8422.6 ± 1673.6 と著しい高値を示した。一方、Bz+CP 群は 24 時間後に 1984.7 ± 478.7 まで増加したのち、48 時間後、72 時間後にはそれぞれ 1795.5 ± 346.5 、 1120.1 ± 335.2 と徐々に減少した。この結果から、Cisplatin 投与 24 時間後の早期に尿細管障害を反映して CP 群、Bz+CP 群ともに尿中 hL-FABP は著しい高値を示したが、Bz+CP 群ではその後は逆に徐々に低下しており、Bezafibrate による治療効果を示唆するものと考えられた。変異型マウス腎での hL-FABP mRNA は Control 群に対して Bz 群では 5.2 倍まで有意に増加していた。Cisplatin 投与 24 時間後に CP 群では 1.7 倍と増加傾向は認められたが、Bz+CP 群では Control 群の 34.7 倍、

Bz 群の 6.5 倍まで増加しており、Bezafibrate 投与により Cisplatin で誘導される hL-FABP mRNA 発現がさらに増幅されていた。Cisplatin 投与 72 時間後の腎 Sudan-III 染色では、野生型の CP 群、Bz+CP 群、及び変異型の CP 群で尿細管への著しい脂質陽性像を認めたが、Bz+CP 群では陽性像はほとんどみられなかった。

考察

尿中 L-FABP は既存のものよりも高感度な尿細管障害のバイオマーカーであり、障害の定量性とともに介入による治療効果も反映させることが確認された。急性腎不全モデルにおいて、近位尿細管での発現が障害早期より増強するストレス応答蛋白と考えられ、細胞質内から尿中へ出ていく過程で細胞内での脂質過酸化をはじめとした酸化ストレスを減弱し、病態の改善に寄与する可能性が示唆された。また、組織学的には尿細管細胞の viability の低下とともにその発現が減弱・消失する viability marker と考えられた。そして PPAR アゴニストにより、基礎レベルでの近位尿細管上皮細胞内での L-FABP 発現増強だけでなく、ストレス応答性も増幅させることで急性腎不全を改善しうることが示された。

今後の展望として、hL-FABP 遺伝子改変マウスと、hL-FABP を発現させた mProx-L、sandwich ELISA 測定系とをあわせて、humanized animal model がヒトにおける腎疾患の病態解明に有用であると同時に、動物種間での相違を考慮した有効性、安全性の評価に活用していくことも考えられる。