

論文の内容の要旨

論文題目 慢性腎不全モデルマウスの樹立、および尿中バイオマーカーの検討
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 田中 珠美

【研究の背景および目的】

透析患者に心血管疾患の合併が多いことは以前から知られていたが、近年軽度から中等度の慢性腎臓病(CKD, chronic kidney disease)においても心血管障害(CVD, cardiovascular disease)の発症やそれに関連する死亡が増加し、さらに貧血が合併することでその危険性が増加することが明らかになってきた。このように CVD、CKD、貧血は互いに影響を及ぼしあっていることから cardiorenal anemia syndrome という概念が提唱されるようになった。

アデニン過剰投与により過剰なアデニンがキサンチン脱水素酵素(XDH, xanthine dehydrogenase)による作用で腎毒性のある 2,8-ジヒドロキシアデニン(DHA, 2,8-dihydroxyadenine)に変換され、腎障害を生じることがラットですでに報告されているがマウスでの報告はない。そこで貧血、心肥大を伴う慢性腎不全モデルをアデニン過剰投与により新たにマウスを用いて作製した。

また既存の XDH 阻害剤であるアロプリノールと新規開発された Y-700 をそれぞれ新たに樹立したアデニン過剰投与による慢性腎不全モデルに投与し、その XDH 阻害効果について比較検討した。

さらに腎疾患の新規バイオマーカーとしての有効性、あるいは腎保護因子としての可能性を報告されてきている L 型脂肪酸結合タンパク(L-FABP, Liver-type fatty acid

binding protein)について、アデニン過剰投与による慢性腎不全モデルにおけるバイオマーカーとしての有効性、および腎保護効果について検討した。

[方法]

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 が存在するため、野生型マウスの腎臓では L-FABP はノックアウト状態である。そこで human L-FABP (hL-FABP) 遺伝子を導入した変異型マウスを野生型マウスとともに用いた。野生型および変異型マウスを adenine 群、allopurinol 群、Y-700 群、control 群の 4 群に分けた。adenine 群にはアデニン混合飼料を 6 週間投与し、allopurinol 群および Y-700 群にはアデニン混合飼料に加え 2 週目からそれぞれアロプリノールあるいは Y-700 を 6 週目まで投与した。control 群は通常飼料と水を投与した。各群とも 2 週間ごとに採血および採尿を行い、血清 BUN、尿中 NAG、アルブミン、蛋白、および血中と尿中の hL-FABP を ELISA 法により測定した。また 6 週間後にマウスを屠殺し、体重補正した心重量、HCT 値、腎における TGF- β 1、MCP-1、hL-FABP の mRNA の発現量を realtime RT-PCR 法を用いて測定するとともに、腎の PAS 染色と MT 染色による組織所見や、腎の α -SMA、F4/80、hL-FABP、HHE および hypoxyprobe を用いた免疫染色による組織所見を各群において比較した。さらに Western Blot 解析により腎の hL-FABP 蛋白の発現量を測定した。

[結果]

野生型マウスの adenine 群では control 群と比較して BUN の増加、HCT の低下、および体重補正した心重量の増加を認めた。Adenine 群の組織像は PAS 染色で尿細管の不均一な拡大、間質への著明な細胞浸潤といった間質障害が主体であり、MT 染色では線維化領域の増加や、 α -SMA 染色および F4/80 染色で傍尿細管領域における陽性領域の増加を認めた。また HHE 染色や hypoxyprobe を用いた染色で陽性領域の増加も認められた。腎における MCP-1 や TGF- β 1 の mRNA の発現も増加していた。

変異型マウスにおいても adenine 群と control 群を比較すると同様の所見であった。変異型マウスの腎での hL-FABP の mRNA の発現レベルは adenine 群と control 群を比較すると adenine 群で増加し hL-FABP の免疫染色では adenine 群において近位尿細管での hL-FABP 陽性濃染領域が拡大しており、hL-FABP 蛋白の Western Blot による定量結果でも、adenine 群で発現が増加していた。

これら野生型および変異型マウスで認められた所見は allopurinol 群および Y-700 群では adenine 群よりも有意に軽減していた。

尿中のバイオマーカーを比較すると、野生型マウスにおける尿中アルブミン、蛋白、NAGはいずれの群でも上昇せず、有意差を認めなかった。しかし、変異型マウスの尿中の hL-FABP レベルは adenine 群において control 群よりも有意に増加した。allopurinol 群および Y-700 群では 2 週目以降尿中 hL-FABP レベルは徐々に低下していき、6 週目では adenine 群と比較して有意に低下していた。血中の hL-FABP レベルはいずれの群においても上昇していなかった。

野生型と変異型マウスの adenine 群を比較すると、変異型マウスの adenine 群では野生型マウスの adenine 群と比較して 6 週目の BUN が有意に低下していた。また変異型の adenine 群の腎の MT 染色、F4/80 染色では、野生型よりも組織所見の悪化が抑制されていた。

Allopurinol 群と Y-700 群を比較すると、Y-700 群では allopurinol 群と比較して 4 週目の BUN が低下していた。また野生型マウスの腎の MT 染色での線維化領域や MCP-1 の mRNA の発現量、変異型マウスの hL-FABP 蛋白および mRNA の発現量も Y-700 群では allopurinol 群より低下していた。

[考察]

本研究では心肥大および貧血を伴う慢性腎不全モデルをアデニンの過剰投与によりマウスにおいて初めて樹立した。アデニンによる腎障害の組織所見は、間質へのマクロファージの著明な浸潤と尿細管障害、および間質の線維化であり、マクロファージ走化性因子である MCP-1 や線維芽細胞の増殖を刺激するサイトカインである TGF- β 1 の mRNA の増加も認めた。

アデニン過剰投与により生じる腎毒性のある DHA は XDH 阻害により産生が抑制される。そこで XDH 阻害剤であるアロプリノールと Y-700 という新薬をアデニン投与による慢性腎不全モデルマウスに投与したところ、腎障害のみならず、心肥大および腎性貧血も改善した。このモデルは再現性よく簡便に作製でき、今後広く応用可能であり、今後の研究において有用であると考えられる。

今回作製した慢性腎不全モデルを用いて尿中バイオマーカーの有効性を検討したところ、尿中 L-FABP は尿中 NAG、アルブミン、蛋白と異なり、病態および治療効果を鋭敏に反映していた。尿中 L-FABP は腎障害を反映して上昇することは報告されているが、治療効果を反映して低下するという結果は今回の実験が初めての報告である。

尿中 L-FABP は、既存の腎障害マーカーと異なり、アルブミン負荷によるストレスや虚血による酸化ストレスに応じて近位尿細管での発現が上昇し管腔への排泄が亢進し、尿中レベルが上昇するといわれている。本モデルでは hypoxyprobe や HHE 染色の結果、アデニン投与で虚血領域および酸化ストレスが増加し、XDH 阻害剤投与

によりこれらが減少していることが明らかになり、本モデルにおける L-FABP の発現亢進、および排泄亢進には虚血による虚血による酸化ストレスが関与していたことが示された。

野生型と変異型マウスの adenine 群を比較したところ変異型マウスでは腎障害が軽減している可能性が示された。最近の報告で腎に L-FABP が存在すると、酸化ストレスの増加に応じて、L-FABP の発現が亢進し、L-FABP が酸化ストレス物質と結合しともに尿細管腔中に排泄されることで、腎保護効果を表すことが示唆された。今回も虚血による酸化ストレスに応じて変異型マウスで L-FABP の発現が亢進し、野生型と違いが生じたものと考えられた。

またアデニン投与による慢性腎不全モデルマウスにおけるアロプリノールと Y-700 の XDH 阻害効果の違いについて評価したところ Y-700 の方が腎機能の改善が早く、改善効果もより強いという傾向が認められた。Y-700 はアロプリノールよりも XDH との結合力が強く作用時間も長いことが分かっているが、今回は飲水に混ぜて投与しているので作用時間よりも結合力による違いに合致した作用効果の違いであると考えられた。アロプリノールは腎代謝であり、腎疾患患者では投与量を注意しなくてはならないが、Y-700 は肝代謝であり、腎疾患患者でも比較的使用しやすいと推測され、臨床試験での有害事象を検討した後、臨床においても広く応用されると思われる。