

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田村 みずほ

腎不全の腎組織では尿細管の拡張、間質への細胞浸潤や間質の線維化が原因疾患を問わず共通して認められ、間質線維化の程度は腎機能低下の程度とよく相関することが知られている。腎不全の進展を阻止する有効な治療薬は未だに開発されておらず、腎不全進展のメカニズムを解明することは病態の理解と有効な治療薬の開発の基礎になると考えられる。

多くの腎疾患の腎組織でマクロファージの浸潤像や MCP-1 の発現が報告され、近年では腎疾患の初期から末期までの過程全てに MCP-1 やマクロファージが深く関与していると考えられている。しかし、CCR2 の関与は詳細に検討されていない。これらを背景として、本研究では、腎不全の進展における CCR2 の関与を明らかにする目的で、新規 CCR2 拮抗薬 TEI-E00526 と進行性間質性腎炎モデル及び進行性糸球体腎炎モデルを用いて実験を行った。

実験成績

1. CCR2 拮抗剤 TEI-E00526 の特異性

ヒト CCR1、CCR2、CCR3、CCR5 を強制発現させた細胞の膜画分とそれぞれに対応するリガンドを用いた競合結合阻害試験、及びヒト単球系培養細胞 THP-1 を用いた MCP-1 惹起細胞遊走に対する阻害試験の結果、TEI-E00526 は CCR2 特異的に結合し、その機能を阻害することが示された。

2. アデニン負荷による間質性腎炎モデルにおける CCR2 の関与の検討

尿細管間質の炎症及び線維化における CCR2 の関与を検討するため、アデニンをマウスに混餌摂取させて間質性腎炎モデルを作製し、28 日間観察した。アデニン負荷により尿細管腔内に結石の沈着が認められ、結石の増加とともに経時的な腎機能低下が観察された。腎組織では炎症性サイトカインと MCP-1 及び CCR2 の mRNA 発現が経時的に上昇し、マクロファージ浸潤も同様に上昇した。また、TGF- β などの線維化関連因子の発現も経時的に上昇した。マクロファージやコラーゲン陽性細胞、 α SMA 陽性細胞はいずれも間質に局限して認められた。以上の結果から、結石の沈着によって間質に炎症が惹起され、マクロファージが浸潤して炎症が増幅されるとともに、間質の線維芽細胞が活性化してコラーゲン産生が亢進し、間質線維化が進行したことが示唆された。TEI-E00526 の投与によってマクロファージ浸潤と線維化が抑制されたことから、CCR2 はマクロファージを介して炎症に関与していることが示唆された。

3. ラット抗糸球体基底膜(α GBM)誘発糸球体腎炎モデルにおける CCR2 の関与の検討

進行性糸球体腎炎における間質傷害と腎機能低下の関係を検討する目的で、ラット

α GBM 糸球体腎炎モデルを作製し 28 日間観察した。尿蛋白と血清クレアチニンは 28 日まで経時的に上昇した。腎組織の病変は糸球体から徐々に間質に拡大し、腎炎 28 日では間質傷害が顕著であった。マクロファージ浸潤と MCP-1 の mRNA 発現は腎炎 7 日をピークとして減少したが、CCR2 の mRNA 発現は腎炎 28 日まで経時的に上昇した。以上の結果から、MCP-1 発現の増加とマクロファージ浸潤を伴う糸球体腎炎が誘導され、続いてマクロファージ浸潤を伴う間質傷害と線維化及び腎機能低下が進行すること、糸球体傷害から間質傷害への進展過程を通して CCR2 が病態に関与していることが示唆された。

次に、糸球体傷害の形成における CCR2 の関与を検討するため、腎炎惹起直前から TEI-E00526 を 5 日間投与した。その結果、腎炎 5 日のマクロファージ浸潤、糸球体傷害、尿蛋白、血清クレアチニンが TEI-E00526 の用量依存的に抑制されたことから、糸球体傷害形成において CCR2 はマクロファージを介して関与していることが示唆された。

さらに、糸球体傷害成立後の腎炎 5 日から TEI-E00526 を投与して、腎機能低下進展期の間質傷害における CCR2 の関与を検討した。TEI-E00526 の投与によりクレアチニン上昇と糸球体傷害の進行、間質への細胞浸潤及び線維化が抑制された。マクロファージ浸潤は抑制されなかったが、腎局所の炎症マーカーである尿中 MCP-1 の上昇は抑制された。以上より、間質傷害形成において CCR2 はマクロファージ以外の発現細胞を介して炎症に関与している可能性が示唆された。

以上を要約すると、本研究は、2 つの異なる進行性腎不全モデルを構築し解析することにより、腎疾患における炎症と線維化の進展過程において、CCR2 がマクロファージのみならずマクロファージ以外の細胞を介して炎症に関与する可能性を示した。本研究で用いたアデニン負荷による間質性腎炎モデルと α GBM 糸球体腎炎モデルは、それぞれヒトの間質性腎炎と糸球体腎炎の病態をよく反映していると考えられることから、CCR2 の重要性はヒトにおける腎不全病態においても同様と推測される。以上のように本研究は、腎不全/腎硬化症発症機序における CCR2 の役割を明らかにしたものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。