

称号及び氏名	博士（獣医学）	柏木 絵美
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	Pathological Studies on Regenerating Renal Tubules in Cisplatin-induced Rat Renal Failure, with Particular References to Prostaglandin E₂, Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin and Osteopontin (シスプラチン誘発ラット急性腎障害における再生尿細管に関する病理学的研究；特にプロスタグランジン E ₂ 、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン及びオステオポンチンの役割について)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	竹内 正吉
	副査	岡田 利也

論文要旨

【はじめに】

急性腎障害（**Acute Kidney Injury; AKI**）とは、急激な腎機能の低下により、生体の恒常性が維持できなくなった状態とされる。アミノグリコシド系抗生物質や抗癌剤をはじめとする薬物の腎臓への副作用などによって生じ、死亡率が高い。**AKI** は、病理組織学的に尿細管の壊死やアポトーシスが認められる。また、不可逆的な傷害が生じると、尿細管の萎縮や間質の線維化及び糸球体硬化を特徴とする慢性腎臓病（**CKD**）に移行する。しかし、腎臓は傷害後、ある程度再生する能力を有する。腎尿細管の再生は、傷害後にも生存している上皮細胞が寄与しており、脱分化、修復部位への移動、増殖、分化の過程を経て成立する。傷害尿細管を早期に修復できれば、傷害の程度を軽減し、腎機能の回復が見込まれる。

低分子蛋白、リソソーム蛋白、近位尿細管の刷子縁や遠位尿細管に存在する酵素、各種サイトカイン、ケモカイン、プロスタノイドなどは腎障害後に発現が増加するため、

腎障害のバイオマーカー候補として注目されている。腎障害後に発現が増加する因子は、尿細管の再生にも関与していることが示唆されているが、再生における機能的な役割についてはほとんど研究されていない。

本研究では、副作用として腎障害を惹起する抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) によるラット AKI モデルを用いて、第 1 章では、腎障害後に発現が増加するとされるプロスタグランジン (PG) E₂ の役割を解析し、第 2 章では、PGE₂ 産生に関わるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の選択的阻害剤の効果を解析した。さらに、第 3 章では、AKI のマーカー候補として近年報告されている好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin; NGAL) とオステオポンチン (OPN) について、病理学的観点から解析した。本研究では、上記実験を遂行し、腎尿細管傷害とその後の再生に関わるこれらの因子の機能的な特性を解明することで、AKI の病理発生機序の一端を明らかにすることを目的とした。

【第 1 章】尿細管再生における内因性 PGE₂ の関与

PGE₂ は腎臓で産生される主な PG であり、アラキドン酸から COX-1 あるいは COX-2 と PGE synthase (PGES) の 2 種類の酵素反応を経て産生される。本章では、CDDP 誘発ラット AKI モデルにおける PGE₂ 産生に関わる酵素及びレセプターの発現を免疫組織化学的及び分子病理学的に解析した。また、尿細管再生における役割を *in vitro* の系を用いて解析した。

CDDP をラットに単回 (6 mg/kg BW) 投与後、COX-2 の発現は減少したのに対し、COX-1 の発現は傷害部位の近位尿細管で増加した。Microsomal PGES-1 (mPGES-1) は傷害部位とその周囲の尿細管上皮で発現が増加した。また、PGE₂ レセプター (EP) のうち、EP4 は傷害を受けた尿細管上皮に投与後 7 日より発現がみられた。ラット尿細管上皮細胞株 (NRK-52E) を用いた *in vitro* 実験では、PGE₂ あるいは EP4 アゴニストである 11-deoxy-PGE₁ の添加により細胞数が増加した。さらに、11-deoxy-PGE₁ の添加によりアポトーシスが抑制され、G₁ 期の細胞の割合が増加した。また、11-deoxy-PGE₁ の添加により、transforming growth factor (TGF)-β1 処理で増加した α-smooth muscle actin (SMA) 発現は抑制されたが、E-cadherin の発現には変化はなかった。

以上の結果から、CDDP による腎障害後の PGE₂ 産生には、COX-2 よりも COX-1 が重要であり、産生された PGE₂ は EP4 を介してアポトーシスの抑制による細胞の保護と α-SMA 発現低下により示される上皮 - 間葉転換 (EMT) の抑制をもたらすことが示され、尿細管上皮の良好な再生に影響を与えていることが示された。

COX-1 の発現上昇や COX-2 の発現減少は、CDDP 誘発慢性腎障害モデルや尿管結紮モデルなどの他の腎障害モデルでは認められなかった。

【第2章】AKIにおけるCOX-2選択的阻害剤の影響

多くの腎障害モデルにおいて、COX-2の発現の上昇やCOX-2阻害剤投与による病変の軽減効果が報告されている。また、腎発生時には、COX-2が組織形成において重要な役割を果たす。CDDP誘発ラットAKIモデルでは、COX-2よりもCOX-1が尿細管の再生に重要であることが明らかになったが、COX-2が発現回復後に、病変形成や線維化に寄与している可能性がある。そこで、第2章ではCDDP誘発ラットAKIモデルにおけるCOX-2の関与を明らかにするためにCOX-2選択的阻害剤(NS-398)投与の効果、形態学的、免疫組織化学的及び分子病理学的に解析した。

ラットをCDDP単回投与群(6 mg/kg BW; CDDP群)、CDDP投与に加えNS-398を投与した群(1日1回投与, 3 mg/kg BW/day; 併用投与群)、コントロール群、NS-398のみを投与した群に分け、CDDP群と併用投与群の病変を比較した。その結果、形態学的な違いは認められなかったが、CDDP群と比較して併用投与群では、血中尿素窒素及びクレアチニン値の低下、5'-bromo-2'-deoxyuridine陽性の再生尿細管上皮細胞数のピークの遅れが認められ、組織保護効果があることが示唆された。また、線維化の進行に関わるCD68陽性マクロファージ及び α -SMA陽性筋線維芽細胞の減数、線維原性因子であるTGF- β 1 mRNAの減少が認められ、線維化の軽減効果が示された。

以上の結果から、COX-2がCDDP誘発ラットAKIモデルにおいて、組織傷害や線維化に一部関与していることが示された。

【第3章】尿細管再生におけるNGAL及びOPNの関与

本章では、近年AKIのバイオマーカーとして注目されているNGAL及びOPNの発現と役割をCDDP誘発ラットAKIモデルを用いて、免疫組織化学的及び分子病理学的に解析した。

NGALの発現は、ラットにCDDPを単回(6 mg/kg BW)投与後1日から傷害部位である皮髄境界部の近位尿細管において増加し、投与後5日から再生尿細管に認められ始めた。その発現はProliferating cell nuclear antigen陽性の再生尿細管上皮細胞数と正の相関を示した。一方、OPN発現は投与後5日から、傷害を受け拡張あるいは萎縮した異常な形態を示す再生尿細管に認められ始め、その発現は線維化の進行と関連するTGF- β 1 mRNA発現、 α -SMA陽性筋線維芽細胞の発現及びCD68陽性マクロファージ数と正の相関を示した。また、*in vitro*実験において、TGF- β 1添加によりEMTを誘発したNRK-52Eにおいて、NGAL mRNA発現は減少し、一方、OPN mRNA発現は増加した。

他の腎障害モデルにおいて報告されているNGAL及びOPNの役割はモデルによりさまざまであるが、CDDP誘発ラットAKIモデルでは、NGALは傷害後の尿細管上皮の良好な再生に寄与し、それに対し、OPNは間質の線維化に関与していることが示された。

【まとめ】

本研究は、**CDDP** 誘発ラット **AKI** モデルを用いて、**PGE₂** と **PGE₂** の産生に關与する酵素とレセプター (**EP4**)、**COX-2** 選択的阻害剤の効果、そして **NGAL** と **OPN** の発現を、尿細管再生の観点から多角的に解析した。得られた成果は、以下にまとめられる。

1. **AKI** モデルでは、**COX-2** よりも **COX-1** が病変形成及び尿細管の再生に寄与していることが示された。
2. **COX-1** により産生された **PGE₂** は **EP4** を介してアポトーシスの抑制による細胞の保護と **EMT** の抑制をもたらし、尿細管上皮の良好な再生に影響を与えていることが示された。
3. **AKI** モデルへの **COX-2** 選択的阻害剤 (**NS-398**) の投与の結果より、**COX-2** が組織傷害や線維化に一部關与していることが示唆された。
4. **AKI** モデルにおいて、**NGAL** は尿細管の良好な再生に、**OPN** は間質の線維化に關与していることが示された。

AKI 後の尿細管の再生と間質の線維化に **PGE₂**, **NGAL** や **OPN** が關与していることを明らかにした。本研究成果は、**AKI** の複雑な病態形成とそれに続いて起こる **CKD** の病理発生機序の解明につながるとともに、急性あるいは慢性の腎臓病の治療法の探索に有用な情報を提示する。

審査結果の要旨

急性腎障害 (**AKI**) は、急激な腎機能の低下により、生体の恒常性が維持できなくなった状態とされ、アミノグリコシド系抗生物質や抗癌剤などの医薬品の腎臓への副作用として生じることがあり、死亡率の高い疾患である。病理組織学的には、**AKI** の尿細管上皮は壊死やアポトーシスを示し、脱落する。不可逆的な傷害では、間質の線維化及び糸球体硬化を特徴とする慢性腎臓病 (**CKD**) へと進展する。尿細管上皮脱落后、傷害を受けた尿細管には再生像がみられる。再生には、生存している尿細管上皮細胞が寄与しており、脱分化、修復部位への移動、増殖、分化の過程を経て成り立つ。良好な再生を導くことができれば、傷害の程度を軽減することが可能となり、腎機能の回復が見込まれる。しかし、尿細管の再生機序については不明な点が多い。

腎障害後に発現が増加する因子として、近位尿細管の刷子縁や遠位尿細管に存在する

酵素や低分子蛋白、炎症性因子である各種のサイトカインやプロスタノイドなどが知られている。これらの因子は、AKI のバイオマーカーとして注目されているだけでなく、尿細管上皮の再生に係わると考えられている。しかし、その機能的な役割については解明されていない。本研究は、シスプラチン (CDDP) 誘発ラット AKI モデルを用いて、プロスタグランジン (PG) E₂ と PGE₂ の産生に関与する酵素とレセプターの発現、シクロオキシゲナーゼ (COX) -2 選択的阻害剤の効果、そして好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NGAL) とオステオポンチン (OPN) の発現を、尿細管再生の観点から解析した。成績の概要は以下のとおりである。

第 1 章では、CDDP 誘発ラット AKI モデルにおける PGE₂ 産生に関わる酵素とレセプターの発現とその役割を解析している。その結果、AKI モデルでは、COX-1 の上昇と COX-2 の減少が認められ、かつ Mitochondrial PGES-1 (mPGES-1) と PGE₂ レセプターのうち特に EP4 が傷害部位において発現が増加することを示した。さらに、ラット尿細管上皮細胞株 (NRK-52E) に PGE₂ あるいは EP4 アゴニスト (11-deoxy-PGE₁) を添加するとアポトーシスと上皮-間葉転換 (EMT) 現象が抑制されることを示した。以上より、AKI モデルでは、PGE₂ 産生には、COX-2 よりも COX-1 がより重要であり、産生された PGE₂ は EP4 を介してアポトーシスの抑制による細胞の保護と EMT による線維化の抑制をもたらすことで、尿細管上皮の良好な再生に係わることを明らかにした。

第 2 章では、第 1 章で COX-2 よりも COX-1 がより重要であることが示されたが、一時低下した COX-2 の発現が回復した後に病変形成に関与している可能性があり、また他の AKI モデルで COX-2 の病変形成への関与が示唆されていることから、CDDP 誘発ラット AKI モデルにおける COX-2 選択的阻害剤の影響を検討している。その結果、AKI モデルに COX-2 選択的阻害剤を投与すると、血中尿素窒素及びクレアチニン値は低下し、再生尿細管上皮細胞数のピークが遅れ、線維原性因子である TGF-β1mRNA が減少し、線維化の進行に関わるマクロファージや筋線維芽細胞が減数した。よって、CDDP 誘発ラット AKI モデルにおいても、COX-2 が組織傷害や線維化に一部関与していることが分かった。

第 3 章では、AKI のバイオマーカーとして近年注目されている NGAL 及び OPN の発現とそれらの役割を解析している。その結果、NGAL 発現は、主に良好に再生しつつある尿細管上皮に認められ、その発現は再生尿細管上皮細胞数と正の相関を示すことを明らかにした。一方、OPN の発現は、拡張あるいは萎縮など異常な形態を示す尿細管上皮に認められ、その発現は線維化の進行と関連する TGF-β1mRNA 発現、筋線維芽細胞数及びマクロファージ数と正の相関を示すことを明らかにした。さらに、NRK-52E 細胞に、TGF-β1 を添加すると、NGAL の発現が低下し、OPN 発現が増加することを示した。すなわち、NGAL は良好な尿細管の再生に、一方 OPN は尿細管の異常な再生とその後の線維化に係わることを明らかにした。

以上の研究により、CDDP 誘発ラット AKI における尿細管の再生に、PGE₂、NGAL や OPN

が関与することを初めて明らかにした。本研究は、**AKI** の複雑な病態形成とそれに続いて起こる **CKD** の病理発生機序の解明につながるとともに、急性あるいは慢性の腎臓病の治療法の探索においても有用な情報を提示している。これらの成果は、毒性病理学的な観点から、医学・獣医学の基礎・応用研究のさらなる発展に資するものである。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。