

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 堀田 記世彦

学位論文題名

Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury

(Fibroblast growth factor-inducible 14 特異的阻害は腎虚血再灌流障害を軽減する)

【背景・目的】

臓器が虚血状態に陥ると低酸素による障害が生じるが、再灌流によりさらに重篤な臓器障害が引き起こされる。この虚血再灌流障害(IRI)は腎移植において移植臓器機能発現の遅延、急性拒絶反応や慢性臓器障害の原因となり、IRIの軽減は移植腎の長期生着のために重要であるがその機序については不明な点が多い。

TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) は TNF ファミリーに属する II 型の膜蛋白であり、その receptor として Fn14 が同定されている。TWEAK/Fn14 pathway の働きは、細胞増殖の促進、炎症性サイトカインの分泌やアポトーシスの誘導など非常に多様であることが知られているが、生理的、病理的機能についてはほとんど明らかではない。今回は IRI における TWEAK/Fn14 pathway の役割について検討した。

【材料と方法】

- ・ 臨床検体：虚血再灌流腎として腎移植時の血流再開 1 時間後の検体を使用し、正常腎として腎癌で摘出した腎の正常部位を使用した。
- ・ ヒト尿細管細胞を用いた *in vitro* での虚血モデル：ヒト遠位尿細管細胞 (RPTEC) を使用し *in vitro* での虚血モデルを作製した。RPTEC を 24 時間培養後、培地を取り除き mineral oil をのせ、37°C で 15 分培養することで虚血状態にした。その後 mineral oil を取り除き PBS で洗浄後、再度培地をのせ 1 時間培養後に細胞を回収し RNA を抽出した。
- ・ マウス腎虚血再灌流モデル：C57BL/6 マウス (雄、週齢 8-10 週) を使用し、腎虚血再灌流モデルを作製した。まず右腎を摘出。その後左腎動静脈をクリップで遮断した。虚血中は体温を 32-33°C に保ち、30 分後に再灌流した。生存率の検討のために用いた致死モデルでは虚血時間を 40 分とした。

【結果】

- ・ ヒト臨床検体による Fn14 の発現：Fn14 につき免疫染色したところ、ヒト正常腎に発現は認めなかったが、腎移植時の血流再開 1 時間後の検体の尿細管に明らかな Fn14 の発現を認めた。
- ・ *in vitro*, *in vivo* モデルにおける Tweak, Fn14 の発現と局在の検討：RPTEC を用いた *in vitro* モデルにおいて、低酸素刺激により Fn14 の発現は有意に増加したが、TWEAK の発現に変化はなかった。IRI *in vivo* モデルでは、虚血腎における再灌流後の TWEAK mRNA 発現の上昇はマウス正常腎に比べ 1.7 倍であったのに対し、Fn14 の発現上昇は顕著であり、16.4 倍もの上昇を認めた。さらに免疫染色で蛋白レベルの発現を検討した。TWEAK 発現はマウス正常腎、虚血腎ともに腎全体の尿細管に認めた。一方、Fn14 発現は正常腎には認めず、虚血腎の皮髄境界を中心とした尿細管に認めた。

これらの局在をさらに検討するため、正常腎、虚血腎の組織を細胞膜、細胞質、核のそれぞれの成分に分離し蛋白を抽出した。これらの TWEAK, Fn14 の蛋白レベルの発現を Western blotting にて検討した。結果、TWEAK は正常、虚血腎の細胞質に認められたのに対し、Fn14 は虚血腎の細胞膜、核に認め、共発現していないことが明らかになった。以上より IRI において、TWEAK 受容体 Fn14 の発現が増加し、Fn14 が IRI の病態に深く関連していることが示唆された。さらに TWEAK と共発現していないことより、Fn14 は TWEAK とは独立して働いていることが考えられた。次に IRI における Fn14 の機能を検討するために Fn14 特異的阻害モノクローナル抗体 (ITEM-2) を用いて詳細に検討した。

- *in vitro* 虚血モデルにおける Fn14 阻害の効果: 低酸素刺激により RPTEC 内の TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 の mRNA 発現は増加したが、ITEM-2 を共培養することにより、これらの発現は有意に抑制された。
- *in vivo* 虚血再灌流モデルにおける Fn14 阻害の効果: 再灌流 24 時間後において、ITEM-2 投与群の血清クレアチニン値は対照群に比し有意に低かった。また、組織学的には、対照群では著明な細胞浸潤や尿細管壊死を認められたのに対し、ITEM-2 投与群では軽減されていた。免疫染色 (MPO 染色、F4/80 染色) および TUNEL 法にて体系的に検討した結果、抗体投与による虚血腎への好中球およびマクロファージの浸潤抑制および尿細管細胞のアポトーシスの有意な抑制がみられた。さらに腎局所における免疫活性を real-time PCR にて検討したところ、抗体投与により炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β)、ケモカイン (MIP-2、MCP-1)、接着因子 (ICAM-1、E-selectin) の発現は有意に抑制され、これら局所の免疫活性低下と障害抑制効果との関連が示唆された。
- *In vivo* 虚血再灌流モデルにおける Fn14 阻害の慢性期の効果: Fn14 阻害の長期的な影響を、再灌流 30 日後の虚血腎を用いて Masson trichrome 染色にて検討した。対照群では高度な線維化がみられたのに対し、抗体投与群では有意に抑制されていた。
- *In vivo* 虚血再灌流致死モデルにおける Fn14 阻害の効果: 虚血時間を 40 分にした致死モデルにおいて、7 日生存率が対照群は 9% であるのに対し、ITEM-2 投与群は 50% で有意にマウス生存率が改善した。以上より Fn14 阻害の長期的および前臨床的治療効果が確認された。

【考察】

今回の研究にて虚血再灌流後、尿細管細胞の TWEAK 受容体 Fn14 の発現が増加することが明らかになった。また、TWEAK と共発現していないことより Fn14 は IRI において独立した働きをしていると思われる。IRI における Fn14 の障害促進機序としては、Fn14 の活性化により尿細管細胞より炎症性サイトカイン、ケモカインが分泌されることが考えられる。これらのサイトカインが自然免疫を活性化し尿細管細胞に障害を与える。また、Fn14 の活性化が直接尿細管細胞のアポトーシスを引き起こす可能性もある。Fn14 の阻害によりこれらの経路が抑制され、IRI が軽減させたと考えられる。また、Fn14 の活性化が組織の再生に寄与するとの報告がある。そのため IRI における Fn14 阻害は、長期的には悪影響をもたらすと懸念されたため、今回慢性モデルにおいて IRI 後の繊維化についても検討した。結果としては Fn14 阻害により慢性期の繊維化も抑制していた。以上より Fn14 阻害は IRI の急性期と慢性期のいずれの障害も抑制し有効な治療法の 1 つと考えられた。また、ヒト臨床検体において、*in vitro*、*in vivo* モデルと同様に虚血腎で Fn14 の発現が増加していることが確認できたことは、今後の臨床応用に期待できる結果であった。

【結語】

今回初めて、腎 IRI において、TWEAK 受容体 Fn14 が障害促進に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに Fn14 特異的阻害は新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。