

学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 代謝内分泌内科学分野	氏 名	たけした あつろう 竹下 敦郎
-----	--	-----	--------------------

主論文の題名

Thrombomodulin ameliorates transforming growth factor- β 1-mediated chronic kidney disease via the G-protein coupled receptor 15/Akt signal pathway

主論文の要旨

慢性腎臓病(CKD)は先進国の約 13%もの成人が罹患する主要な公的健康問題である。CKD は最終的に末期腎不全に至ると維持透析もしくは腎移植といった腎代替療法が必要となる。糖尿病(DM)や高血圧が CKD の最も高頻度な原因であり、虚血、原因不明の糸球体硬化、尿路閉塞、慢性感染が続く。基礎疾患に関わらず、CKD の最終的かつ共通の病理学的結果は腎線維化である。腎線維化形成の主要な原因はトランスフォーミング成長因子(TGF)- β 1 であるが、腎線維化を標的にした有効な治療戦略は存在しない。

近年、腎障害の初期の変化としてポドサイトの数的、機能的脱落が注目されている。ポドサイトは糸球体において血管内皮細胞、基底膜とともに糸球体濾過障壁(GFB)を形成している。ポドサイトが同構造の中心的な役割を果たしており、ポドサイトの変性脱落により GFB が破綻すると尿蛋白の出現を認め、進行性の腎障害を惹起する一因となる。ポドサイトの変性脱落にはアポトーシスおよび上皮間葉転換(EMT)が重要といわれており、今回我々は TGF- β 1 がポドサイトに及ぼす影響と腎線維化の関連に注目した。

臓器線維化の抑制物質として、以前我々は肺線維症に対するトロンボモジュリンの抑制効果を報告した。トロンボモジュリン(TM)は凝固系の調節に携わる膜貫通型糖蛋白質であるが、近年は抗炎症作用、細胞保護作用が注目されている。現在、TGF- β 1 によって惹起される進行性腎線維症に対してのヒト組換えトロンボモジュリン(rhTM)の効果を評価した研究はまだ無く、本研究において、我々は、rhTM が TGF- β 1 によって介在される進行性の腎線維化および腎機能障害を抑制するという仮説を立てた。

最初に、ヒト糖尿病入院患者において、血中 TM 濃度、TGF- β 1 濃度を測定した。腎障害を伴う DM 患者は、腎障害のない患者と比較して、顕著に高濃度の血中 TM、活性型 TGF- β 1 が増加し、TM 濃度は血中クレアチニン、活性型 TGF- β 1 濃度と顕著に相関していた。血管内皮障害においてはその保護的な作用を失う形で断片に切り出されるため、これらの所見は、膜型 TM の機能的喪失が活性型 TGF- β 1 の分泌増加お

よび腎機能障害と関連していることを示しており、本研究の仮定と矛盾しなかった。

次に、我々は TGF- β 1 が介在する腎線維化、慢性腎障害モデルとして、腎特異的 TGF- β 1 トランスジェニック (TG) マウスを開発した。本 TG マウスはポドサイトにヒト全長 TGF- β 1 を発現し、野生型 (WT) と比較して血漿および尿中の TGF- β 1 濃度が顕著に増加した。本 TG マウスは進行性の腎障害および尿蛋白増加を認め、組織所見としては糸球体硬化、コラーゲン沈着増加を認めた。透過型電子顕微鏡による観察ではポドサイトの足突起の微絨毛化、足突起の融合、糸球体内皮細胞の有窓構造の減少、糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム基質の沈着増加を伴っていた。これらの所見より、本 TG マウスはポドサイト変性、糸球体硬化および腎線維化を伴った腎機能障害を呈することが証明された。

次に、我々は、動物実験として rhTM を 4 週間 TG マウスに投与し、その効果を評価した。rhTM で治療した TG マウスは、生食投与群と比較して腎線維化マーカー抑制および腎機能改善を認め、組織所見としても明らかな糸球体硬化の抑制および間質コラーゲン沈着抑制を認めた。透過型電子顕微鏡による観察では、ポドサイトの足融合、糸球体基底膜肥厚が優位に減少していた。以上の所見より、rhTM 投与はポドサイト変性と腎線維化を抑制し、腎機能を改善することが示された。

次に、ヒト初代培養ポドサイトを用いた実験では、rhTM 前処置は TGF- β 1 処理で増加するアポトーシスを有意に減少させた。これは動物実験における腎組織のアポトーシス細胞減少と一致していた。また、rhTM はプロテインキナーゼ B (別名 AK 系統トランスフォーミング因子: AKT) リン酸化を促進したが、AKT 阻害剤の添加は rhTM によるアポトーシス抑制効果を打ち消した。さらに、G 蛋白共役受容体 (GPR)15 の低分子干渉 RNA (siRNA) の導入は rhTM のポドサイトに対する抗アポトーシス作用を打ち消した。EMT の観察では、rhTM 処置は TGF- β 1 処理による間葉系マーカー亢進、Sma-Mad 関連蛋白 (Smad)2、3 リン酸化を抑制した。これは動物実験における腎組織中 Smad2、3 のリン酸化抑制と一致していた。また、アポトーシスと同様に、GPR15 の siRNA 導入は、ポドサイトに対する間葉系マーカー発現抑制効果を打ち消した。ポドサイトにおける GPR15 の発現はこれまで報告がなかったが、今回ヒトおよびマウスにおいて、ポドサイトが GPR15 を発現していることを証明した。

今回我々は初めて、新たな慢性腎不全モデルマウスが糸球体において全長の TGF- β 1 を過剰発現し、自然発生的で進行性な糸球体硬化症、尿細管間質の線維化および腎機能障害を引き起こすこと、そして rhTM が GPR15 に作用し、ポドサイトのアポトーシスおよび EMT を抑制することによって腎線維症および腎機能障害を改善することを報告した。