

学 位 論 文 要 旨

氏 名 鎌田 真理子



論 文 題 目

**「Role of lipid mediators in the development of interstitial fibrosis
in kidneys following unilateral ureteral obstruction in mice」**

(マウス一側尿管結紮モデルの腎間質線維化における

脂質メディエーターの役割)

指 導 教 授 承 認 印

鎌田 貢 寿



Role of lipid mediators in the development of interstitial fibrosis in kidneys following unilateral ureteral obstruction in mice

(マウス一側尿管結紮モデルの腎間質線維化における脂質メディエーターの役割)

氏 名 鎌田 真理子

要旨

[背景]

慢性腎臓病は、糸球体障害や尿細管障害により生じ、その原因疾患に関わらず、最終的には尿細管間質線維化という共通の進展経路を通して、末期腎不全に至るとされている。従って、腎線維化機序の解明は、慢性腎臓病の増悪進展を予防するために重要である。

一側尿管結紮(UUO)モデルは、再現性の高い腎間質線維化モデルである。このモデルは、尿管結紮により尿細管の内圧が上昇し、尿細管上皮細胞のアポトーシスやネクローシス、尿細管間質への炎症細胞浸潤、線維芽細胞の活性化や細胞外基質の産生亢進により、腎間質線維化が進行する。

UUOマウスモデルでは、プロスタグランジン(PG)D₂は、CRTH2受容体を介してTh2リンパ球を刺激誘導し、腎線維化を悪化させる。ブレオマイシン誘導肺線維症モデルでは、PGF₂αは線維化を悪化させる。一方、UUOマウスモデルでは、PGE₂は、PGE₂受容体4(EP4)シグナルを介して線維化を抑制し、プロスタサイクリン(PGI₂)アナログの投与は肝細胞成長因子(HGF)の誘導を介して腎線維化を抑制する。

PG類を産生するCOXは、恒常性維持に必要なCOX-1と炎症時に誘導されるCOX-2がある。腎臓では、COX-2は、膜結合型PGE合成酵素-1(mPGES-1)やプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)と共に、PGE₂やPGI₂の産生に関与し、このCOX-2経路の活性化は腎線維化を抑制する可能性がある。

また、UUOモデルでは5-リポキシゲナーゼ(5-LOX)がLTB₄の産生亢進を介して、糸球体血行動態に関与する。ブレオマイシン誘発肺線維症モデルでは、LTB₄の受容体拮抗薬が、肺線維化を抑制するとされている。しかしながら、LTB₄の線維化促進の機序や腎線維化に及ぼす影響は不明のままである。

そこで本研究では、一側尿管結紮(UUO)モデルマウスを作製して、選択的COX-2阻害薬(celecoxib)経口投与による線維化抑制作用と、BLT1ノックアウト(BLT1^{-/-})マウスにUUOモデルを作製し、腎間質線維化におけるLTB₄-BLT1受容体シグナルの関与を調べた。

[方法]

8週齢雄性C57BL/6マウスを用いて、麻酔下に左尿管を3-0絹糸で結紮し、UUOモデルマウスを作製した。実験1は野生型マウスを2群に分け、それぞれVehicle群とセレコキシブ投与群とした。セレコキシブ投与群は、セレコキシブ150mgを粉餌100g(100mg/kg/日/マウス)に混ぜて、尿管結紮直後から投与した。検体の採取は、Vehicle群は0, 5, 7, 14日目に行い、セレコキシブ投与群は5日目のみに行った。実験2は野生型(WT)とBLT1ノックアウトマウス(BLT1^{-/-})の2群にUUOモデルマウスを作製した。検体採取は、両群とも0, 1, 3, 5, 7, 10日目に行った。実験1, 実験2で摘出した腎臓は、免疫組織化学およびreal-time RT-PCR法にて、

尿細管間質の線維化および線維化関連因子を解析した。

チオグリコレート誘導腹腔内マクロファージ、マウス線維芽細胞(L929)、ヒト胎児腎細胞(HEK293)を使用して *in vitro* の実験を行った。これらの培養細胞に LTB₄、TGF- β 、FGF-2 のいずれかを添加し、12 時間培養後に real-time RT-PCR 法で線維化関連遺伝子の発現を調べた。全ての実験データの解析は、Student's *t* 検定を用い、有意水準は、0.05 未満とした。

[結果]

実験 1

Vehicle 群の UUO 腎は、1 週間で腎盂が拡張し、7, 14 日目では腎皮質は有意に菲薄化した。マッソントリクローム染色、シリウスレッド染色で、腎線維化の経時的増悪を確認した。腎組織の可溶性コラーゲン含有量は、0 日に比し 7, 14 日目とも有意に増加した。コラーゲン染色陽性腎面積、コラーゲン遺伝子の発現も 0 日に比し 3 日目から 7 日目まで有意に増加した。また、誘導性の COX-2、線維化促進因子である TGF- β と FGF-2 の遺伝子発現も経時的に有意な増加を示した。

5 日目に採取されたセレコキシブ投与群の UUO 腎は、Vehicle 群に比しコラーゲン染色陽性面積が有意に増加した。定量的解析でも、同様に有意な増加を示した。コラーゲン遺伝子発現も同様に有意な増加を認め、免疫組織染色の結果と一致していた。さらに、TGF- β 、FGF-2 遺伝子発現も、Vehicle 群に比し、セレコキシブ投与群で有意に増加していた。

実験 2

コラーゲン遺伝子発現は、野生型 UUO 腎、BLT1-/-群とも前値に比し、1 日目から 7 日目まで経時的に有意に増加したが、BLT1-/-群では WT 群と比較すると 1 日目から 7 日目まで有意に抑制された。コラーゲン染色陽性腎面積やその定量評価でも、両群とも前値に比し、1 日目から 10 日目まで経時的に増加したが、BLT1-/-群では WT 群に比べ、3 日目から 10 日目まで有意な陽性面積の抑制が見られた。

WT 群の BLT1 遺伝子の発現は前値に比し、1 日目から経時的に有意に増加した。一方、BLT1-/-群の腎組織では経時的に全く検出されなかった。5-LOX 遺伝子の発現は、WT 群、BLT1-/-群共に前値に比し、3 日目から経時的に有意に増加したが、両群間の比較では 3 日目以降に BLT1-/-群が有意な低値を示した。5-LOX の免疫染色では拡張した尿細管の上皮細胞と尿細管間質細胞が陽性を示した。

ケモカインである MCP-1 の免疫染色では、野生型 UUO 腎で拡張した尿細管上皮細胞と間質細胞に陽性所見を認めた。MCP-1 遺伝子の発現は、両群とも経時的に増加したが、両群の比較では BLT1-/-群で 3 日目に有意な低値が見られた。一方、CXCL12 の免疫染色では、野生型 UUO 腎の尿細管間質に少数の陽性細胞を認めたのみであった。CXCL12 遺伝子の発現は、両群とも 1 日目に減少し、WT 群では 3 日目に前値に回復したが、BLT1-/-群では回復が遅延した。

マクロファージの表面マーカーである F4/80 の免疫染色では、尿細管間質の陽性細胞数は、WT 群、BLT1-/-群とも経時的に増加したが、両群を比較すると BLT1-/-群で 3 日目以降有意に

抑制され、遺伝子発現も同様に抑制されていた。線維芽細胞のマーカーである S100A4 の陽性細胞数と遺伝子発現も、両群で経時的に増加したが、両群で比較すると BLT1-/-群で有意に抑制されていた。線維化促進因子である TGF- β と FGF-2 の遺伝子発現は、WT 群, BLT1-/-群の両群で 1 日目から経時的に有意に増加した。両群間の比較では、BLT1-/-群で WT 群に比べ 1 日目から経時的に有意に抑制されていた。

in vitro の実験では HEK293 細胞を LTB₄ で刺激すると、MCP-1 遺伝子発現の有意な増加を認めたが、CXCL12 遺伝子発現は増加を認めなかった。また、腹腔内マクロファージを LTB₄ で刺激すると TGF- β , FGF-2 と Col1a1, 3a1, 4a1 の遺伝子が有意に増加し、マウス線維芽細胞 L929 細胞を LTB₄ で刺激すると、TGF- β , Col4a1 の遺伝子が有意に増加した。更に、L929 細胞を TGF- β で刺激すると、Col1a1, 4a1 の遺伝子発現が有意に増加した。L929 細胞を FGF-2 で刺激しても、有意な線維化関連遺伝子の発現増加は認められなかった。

[考察]

実験 1 では、セレコキシブ投与群は Vehicle 群に比べ、腎間質線維化が増悪した。PGE₂-EP4 受容体シグナルや PGI₂ は、UUO 腎の線維化を抑制すると報告されているので、UUO に伴い誘導される COX-2 が、PGE₂-EP4 シグナルや PGI₂ の産生を亢進させて、腎線維化を抑制している可能性が示唆された。

実験 2 では、WT 群に比べ BLT1-/-群で、腎線維化が抑制された。UUO 腎では、拡張した尿細管上皮細胞の 5-LOX の発現が亢進し、LT 類の産生が増加することが示された。産生が増加した LTB₄ の刺激により、尿細管上皮細胞は MCP-1 の産生を増加させ、マクロファージの誘導を促進する可能性が示唆された。傷害部位に動員されたマクロファージや線維芽細胞は、LTB₄ 刺激により線維化促進増殖因子(TGF- β , FGF-2)やコラーゲンの産生を増加させ、線維化を促進することが示唆された。

[結論と展望]

マウス UUO モデルの腎線維化には、LTB₄-BLT1 受容体シグナルを介した線維化増強作用と COX-2 により産生されるプロスタグランジンの線維化抑制作用の両者の関与が認められた。LTB₄ 受容体 1(BLT1)拮抗薬は、関節リウマチ、骨粗鬆症の予防や治療を目的に開発が進められているが、抗腎線維化治療薬としての可能性が示唆された。一方、選択的 COX-2 阻害薬 celecoxib の投与は、消化器障害や心血管疾患リスクのみならず、腎線維化促進リスクがあることが示唆された。