

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	中川 直樹
<b>学位論文題目</b>			
<b>The intrinsic prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice</b>			
(腎尿細管上皮の内在性プロスタグランジン E <sub>2</sub> -EP <sub>4</sub> 系は マウス腎間質線維化の進展を制限する)			
共著者名			
結城 幸一、川辺 淳一、藤野 貴行、高畑 治、鹿原 真樹、 阿部 和利、小島 史章、柏木 仁、長谷部 直幸、菊池 健次郎、 杉本 幸彦、成宮 周、牛首 文隆			
掲載雑誌名			
<b><i>Kidney International</i></b> 誌			
平成 24 年 掲載予定			
<b>研究目的</b>			
<p>腎間質線維化は、種々の腎疾患において末期腎不全に至る共通過程であり、その病態解明は極めて重要な課題となっている。腎間質線維化の病態形成では、尿細管上皮細胞が分泌する種々のケモカインによる間質へのマクロファージの動員が引き金となり、続く腎間質での筋線維芽細胞の増殖と細胞外基質の蓄積が重要と考えられている(引用文献 1)。</p> <p>プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、その受容体である EP を介して作用を発揮するが、EP には EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub> の 4 種類のサブタイプが存在する(引用文献 2)。従来、PGE<sub>2</sub> の腎臓での作用として、腎血流や電解質再吸収の調節作用が良く知られている。しかし、PGE<sub>2</sub> の腎間質線維化における役割や、関与する受容体サブタイプに関しては、不明な点が多く残されている。</p> <p>本研究は、PGE<sub>2</sub> の受容体サブタイプである EP<sub>4</sub> を欠損するマウスと、EP<sub>4</sub> 選択的アゴニストを用い、腎間質線維化の病態形成における PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 系の役割およびその作用機構の解明を目指した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 腎間質線維化モデル

動物は、遺伝背景が同等 (C57BL/6 x 129/sv) の野生型 (WT) および EP<sub>4</sub> 欠損マウス (雌性 8~12 週齢) を用いた。麻酔下に、マウス左側背部を小切開し、左側尿管一側を結紮した。術後 1、4、7 日目に結紮腎および対側腎を摘出し、解析に用いた。また、EP<sub>4</sub> アゴニスト ONO-4819 (小野薬品より供与) の各線維化パラメーターに対する効果を検討した。

### 2. RT-PCR

摘出したマウス腎臓から total RNA を抽出し、逆転写によって cDNA を合成した。ついで、シクロオキシゲナーゼ (COX)-1、COX-2、各 PGE<sub>2</sub> 受容体サブタイプ、サイトカイン (MCP-1、RANTES)、成長因子 (TGF- $\beta$ 、CTGF) の mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した。

### 3. 腎間質線維化の評価

腎組織標本の Sirius red 染色により、組織学的な線維化の解析を行った。また、腎間質線維化の定量は、組織中ハイドロキシプロリン量の測定により実施した。

### 4. 免疫組織染色および *in situ hybridization*

マクロファージあるいは筋線維芽細胞のマーカー (各々 F4/80 と  $\alpha$ -SMA) に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、これら細胞の腎間質を場とした浸潤や増殖を解析した。また、免疫組織染色法により COX-2 と MCP-1 の腎臓での発現部位の同定も行った。さらに、*in situ hybridization* 法を用い、腎組織内の EP<sub>4</sub> mRNA 発現部位の同定を行った。

### 5. 培養細胞を用いた解析

術後 7 日後の結紮腎をコラゲナーゼ処理した後、腎線維芽細胞を分離培養した。また、抗体結合磁気ビーズを用い、尿細管上皮細胞を分離培養した。これらの細胞を PDGF や TGF- $\beta$  で刺激し、その反応に対する EP<sub>4</sub> アゴニスト AE1-329 (小野薬品より供与) の効果を検討した。

### 6. 葉酸誘発腎傷害モデル

野生型 BALB/c マウスに葉酸を単回腹腔内投与し、腎傷害モデルを作成した。この時、ONO-4819 を連日皮下投与した。葉酸投与 7 日後に、腎機能 (BUN とクレアチニン) および腎間質線維化の程度を解析した。

## 成 績

1. WT マウスの結紮腎では、尿管結紮後に COX-2 および EP<sub>4</sub> mRNA の発現が著明

に増強しており、各々3.5倍 (Day 1) および7倍 (Day 7) に達した。一方、EP<sub>1</sub>とEP<sub>3</sub> mRNA の発現量に変化はなく、EP<sub>2</sub> mRNA の発現量はわずかに増強していた。

2. WT マウスの結紮腎では、マクロファージの浸潤と筋線維芽細胞の増殖を伴った間質線維化が認められた。しかし、EP<sub>4</sub> 欠損マウスでは、WT マウスと比較して、これらの現象が有意に増強していた。一方、ONO-4819 は、WT マウス結紮腎においてのみ、これらの現象を有意に抑制した。
3. WT マウスの結紮腎では、ケモカインである MCP-1 と RANTES および成長因子である TGF- $\beta$  と CTGF の mRNA 発現の亢進を認めた。しかし、EP<sub>4</sub> 欠損マウスでは、WT マウスと比較して、これらの発現が有意に増強していた。一方、ONO-4819 は、WT マウス結紮腎においてのみ、これらの発現亢進を有意に抑制した。
4. WT マウスの結紮腎において、COX-2 と MCP-1 蛋白質は主に尿細管上皮での発現が認められた。さらに WT マウス結紮腎の尿細管上皮においては、EP<sub>4</sub> mRNA の発現誘導も確認された。
5. 培養 WT 尿細管上皮細胞では、TGF- $\beta$  刺激により EP<sub>4</sub> mRNA 発現が増強した。また、TGF- $\beta$  刺激により  $\alpha$ -SMA および Twist mRNA 発現が誘導され、上皮-間葉移行が確認された。一方、AE1-329 は、EP<sub>4</sub> 依存的にこの現象を抑制した。  
培養 WT 線維芽細胞において、PDGF は細胞増殖を刺激し、TGF- $\beta$  は CTGF 蛋白質の産生を誘導した。一方、AE1-329 は、EP<sub>4</sub> 依存的にこれらの反応を抑制した。
6. ONO-4819 は、葉酸誘発腎傷害モデルにおいて認められた腎機能障害と腎間質線維化の両者を、有意に改善した。

## 考 案

本研究は、実際の腎間質線維化を再現可能な尿管結紮モデルを用い、内因性 PGE<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> アゴニストが、EP<sub>4</sub> を介して腎間質線維化の進展を抑制することを世界で初めて明らかにした。その作用機構として、結紮腎の尿細管上皮における COX-2 蛋白質および EP<sub>4</sub> mRNA の発現が亢進していたことから、まず尿管結紮により腎尿細管上皮での PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 系が活性化すると考えられた。ついで、活性化された PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 系が腎尿細管上皮でのケモカインの発現を抑制し、腎間質へのマクロファージの浸潤を抑制したと考えられた。その結果、マクロファージ由来の成長因子である PDGF や TGF- $\beta$  により誘導される筋線維芽細胞の増殖と、引き続きコラーゲン産生を主体とした腎間質の線維化も抑制されたと考えられた。一方、EP<sub>4</sub> 刺激は、*in vitro* において尿細管上皮細胞の上皮-間葉移行を抑制し、線維芽細胞の増殖や CTGF 産生を抑制したことから、これらの作用も PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 系の抗線維化作用に寄与することが示唆された。また、EP<sub>4</sub> アゴニストは、葉酸誘発腎傷害モデルにおいても腎機能障害と腎間質線維化を有意に

改善した。これらの結果、PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系が様々な腎疾患において、腎機能保護や抗線維化作用を持つ可能性が示された。

近年、慢性腎疾患を持つ患者が急増している。その結果、末期腎不全への進行を抑制可能な薬物の開発が、急務となっている。従来、アンジオテンシンやブラジキニンの腎間質線維化への関与が知られている。実際、アンジオテンシン受容体拮抗薬が慢性腎疾患の治療に用いられているが、その効果は限定的である。このような状況下、本研究のPGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系の腎臓における役割解明が、慢性腎疾患の進行を抑える手段の開発に資することが期待される。

## 結 論

本研究は、PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系の尿管結紮モデルでの腎間質線維化における役割とその作用機構を解明した。また、EP<sub>4</sub>アゴニストの葉酸誘発腎傷害モデルでの腎保護作用を明らかにした。これらの結果、EP<sub>4</sub>アゴニストの慢性腎疾患治療薬としての可能性が強く示唆された。




## 引 用 文 献

1. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 1819–1834.
2. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999; 79: 1193–1226.

## 参 考 論 文

1. Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, *et al.* Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I<sub>2</sub> receptor IP. *J Clin Invest.* 2004; 114: 805–812.
2. Nakagawa N, Takahashi F, Chinda J, *et al.* A newly estimated glomerular filtration rate is independently associated with arterial stiffness in Japanese patients. *Hypertens Res.* 2008; 31: 193–201.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏名	中川 直樹
<p>審査委員長 <u>若宮 伸隆</u> </p> <p>審査委員 <u>長谷部 直幸</u> </p> <p>審査委員 <u>鳥本 悦彦</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>The intrinsic prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice (腎尿細管上皮の内在性プロスタグランジン E<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系はマウス腎間質線維化の進展を制限する)</p> <p>腎間質線維化は、種々の腎疾患において、末期腎不全に至る共通の疾患過程であり、その病態解明は極めて重要な課題となっている。腎間質線維化の病態形成では、尿細管上皮細胞が分泌する種々のケモカインによる間質へのマクロファージの動員が引き金となり、引き続く腎間質での筋繊維芽細胞の増殖と細胞外基質の蓄積が重要であると考えられている。</p> <p>本研究では、PGE<sub>2</sub>の受容体サブタイプである EP<sub>4</sub>を欠損するマウスと、EP<sub>4</sub>選択的アゴニストを用い、腎間質線維化の病態形成における PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub>系の役割およびその作用機序の解明を目指した。</p> <p>結果として、一側尿管結紮マウスの腎間質線維化モデルにおいて、尿細管上皮細胞から産生される MCP-1、RANTES といったケモカインによって局所に集まったマクロファージが産生する TGF-βによって、SMA、Twist の発現上昇がおり、それらによる筋線維芽細胞への EMT や CTGF 産生を介した線維化促進が腎間質線維化の機序であることを明らかにした。</p> <p>そして、その線維化の機序に尿細管細胞から産生される PGE<sub>2</sub>とその受容体である EP<sub>4</sub>の経路が抑制的に関与することを明らかにした。</p>			

これらの実験系では、 $\text{PGE}_2$ - $\text{EP}_4$ 経路の関する作用を、 $\text{EP}_4$ ノックアウトマウスや $\text{EP}_4$ のアゴニストを用いて、直接的に証明し、尿細管閉塞から腎間質線維化に至る各ステップを詳細に検討しており、非常に高く評価できると考えている。

昨今、慢性腎疾患から末期腎不全への進行する患者をどう抑制するかが、臨床的に非常に重要な問題となっているが、現時点で有効な治療薬は限られている。

本研究は、腎間質線維化に $\text{PGE}_2$ - $\text{EP}_4$ 系が関与することを示した、最初の研究であり、 $\text{EP}_4$ アゴニストの、慢性腎疾患の新しい治療薬としての可能性を示唆するものであり、臨床医学的に大変意義があると考えられる。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。