

令和元年6月18日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16772

研究課題名(和文)マウス腎虚血再灌流障害モデルにおける制御性T細胞の腎保護効果の検討

研究課題名(英文)Protective Effects of Regulatory T cells in Renal Ischemia-Reperfusion Injury in a Murine Model

研究代表者

山本 竜平(YAMAMOTO, RYOHEI)

秋田大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90770652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では、トリコスタチンA(抗真菌薬)を投与し体内での制御性T細胞を増幅させることで腎虚血再灌流障害後の腎機能障害が軽減することを明らかにした。この腎保護効果にはIL-10(抗炎症性サイトカイン)が重要な役割を果たし、虚血再灌流障害後の免疫関連抗原分子(免疫活性化のスイッチ)の発現を抑え、組織への炎症細胞浸潤を抑制することが関連していた。トリコスタチンA投与による制御性T細胞の増幅は、臓器虚血再灌流障害の新しい治療戦略になり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリコスタチンA(抗真菌剤として臨床的に使われている薬剤)により制御性T細胞を内因性に増幅させることは、細胞を体外に取り出して培養し輸注するという方法よりも簡便でコストが低く、臨床応用しやすい。将来的に急性期の腎虚血再灌流障害時にトリコスタチンAを投与することで制御性T細胞を増幅させ腎機能障害を軽減される新しい治療戦略になり得る可能性がある。また、他臓器でも応用可能であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Endogenously expanded-regulatory T cell (Treg) by administration of Trichostatin A (Tsa) contributed to reduce the deterioration in Ischemia/reperfusion injury(IRI) kidney in our murine model. It was associated with suppressed infiltration of inflammatory cells due to the attenuated expression of immune-related antigen molecules after IRI. The key mechanism of this renoprotective effect may be causatively associated with increased IL-10 production and its broad effect on diverse immune pathways. Tregs expansion by Tsa administration may be a new treatment strategy against organ IRI.

研究分野：移植

キーワード：虚血再灌流障害 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 固形臓器移植において虚血再灌流障害 (Ischemia-Reperfusion Injury; IRI) は不可避な事象である。IRI はフリーラジカル等により直接臓器障害をもたらすのみならず、血流再開時に免疫関連抗原分子の発現亢進を惹起し、炎症細胞浸潤を誘導する。これにより血管内皮細胞障害を引き起こし、二次的な臓器障害の誘因となることが報告されている¹⁾。

2) 制御性T細胞 (Regulatory T cell; Treg) は免疫寛容に関与していることが報告されているが、自然免疫を含めた炎症反応の抑制効果をも有することが知られている²⁾。

3) また、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤である Trichostatin A (TsA) の投与で Treg を内因性に増幅させることが報告されている³⁾。

4) 外因性に Treg を増幅させることで抑制系サイトカインの発現が亢進し、腎 IRI 後の腎機能障害が軽減したとの報告³⁾はあるが、TsA で内因性に増殖させた Treg が腎虚血再灌流障害を軽減できるかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

TsA 投与により自己の Treg を内因性に増幅させることで腎 IRI による腎機能障害を軽減することができるか、またその免疫関連抗原分子発現との関連性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 一定の温度を保持できる heating pad 上で麻酔下に C57BL/6 マウス (10-12 週齢) の左腎動静脈を血管鉗子で遮断し、30 分経過した後に遮断を解除するマウス腎 IRI モデルを作成した。

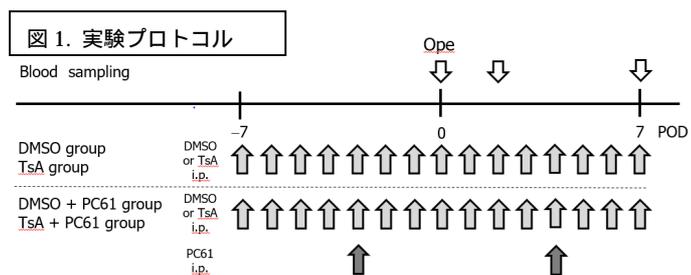
2) 本実験系での Treg が増幅する適切な TsA 濃度を設定し、Treg の増幅はフローサイトメトリーを用いて脾臓の Treg 分画 (CD4(+)Foxp3(+)) の割合を見ることで確認した。さらに、抗 CD25 抗体 (PC61) を投与することで Treg が減少することを確認した。

3) Treg が増幅している治療群 (TsA 群)、Treg が増幅していない無治療群 (DMSO 群)、TsA + PC61 群、DMSO + PC61 群の 4 群でそれぞれに IRI を起こし、血清中の Cr や抗炎症性・炎症性サイトカイン (IL-10, TGF- β , IL-6, IFN- γ など) の濃度を経時的に測定し比較した (ELISA で測定)。また IRI 後の左腎を摘出し、PAS 染色を行い病理学的に組織障害の評価を行った。さらに IRI 後の左腎、脾臓などにおける、抗炎症性・炎症性サイトカインの mRNA 発現の半定量を行い比較した。

4) 次に 4 群間で IRI 後の腎での免疫関連抗原分子 (CD80, CD86, ICAM-1 など) の発現を mRNA レベル・蛋白レベル (western blot) で比較した。さらに CD45 免疫染色で炎症細胞を染色し細胞数をカウントすることで炎症細胞浸潤の程度も比較した。

4. 研究成果

1) マウスを DMSO 群、TsA 群、DMSO + PC61 群、TsA + PC61 群の 4 群に分けて図 1 に示す腎 IRI 実験モデルを作成した。

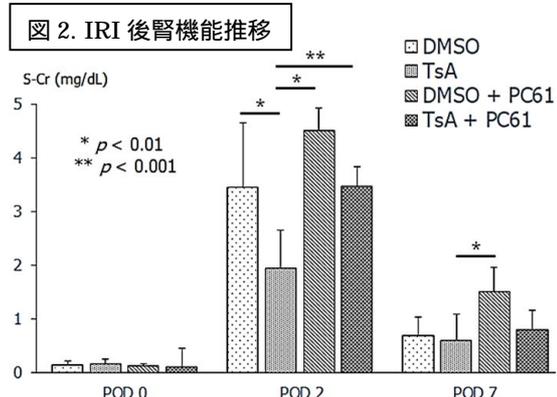


2) IRI 後 7 日目の脾臓の flow

cytometry 解析では、TsA 投与により DMSO 群と比較して有意な Treg の増加を認め、PC61 投与により有意に Treg が減少していることが確認された。

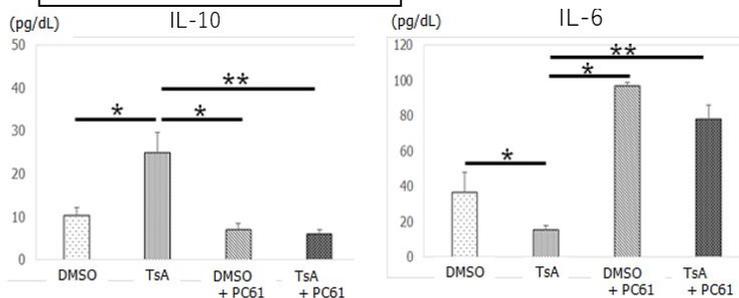
3) 腎機能は IRI 後 2 日目において、DMSO 群と比較して、TsA 群で有意に良好であったが、7 日目では両群とも腎機能の回復がみられ有意差は消失した。また、TsA + PC61 群で TsA 投与による腎保護効果が抑制され腎機能の悪化を認めた (図 2)。

組織学的評価においても IRI 後 2 日目の ATN score で、TsA 投与群は DMSO 群及び TsA + PC61 投与群と比較して有意に良好であることが確認された。



IRI 後 2 日目の血清サイトカイン濃度および腎における mRNA 発現は、いずれも TsA 群で DMSO 群と比較して、抗炎症性サイトカインである IL-10 の有意な上昇と炎症性サイトカインである IL-6 の有意な低下を認め、PC61 の投与によりその効果は相殺されていた (図 3、図 4)。

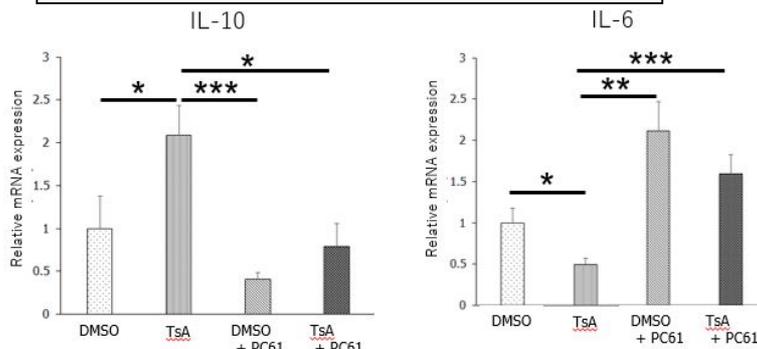
図 3. 血清サイトカイン濃度



4) Chanderaker らは⁴⁾、血管内皮細胞は IRI 後に免疫関連抗原分子 (CD80、CD86、ICAM-1) を発現し抗原提示細胞と同様の働きを示し、炎症細胞浸潤を促すと報告している。

そこで我々は、TsA 投与による Treg の増幅が、これらの免疫関連抗原分子の発現を抑制することで腎保護効果を発揮していると仮説を立て、IRI 後 2 日目の腎での

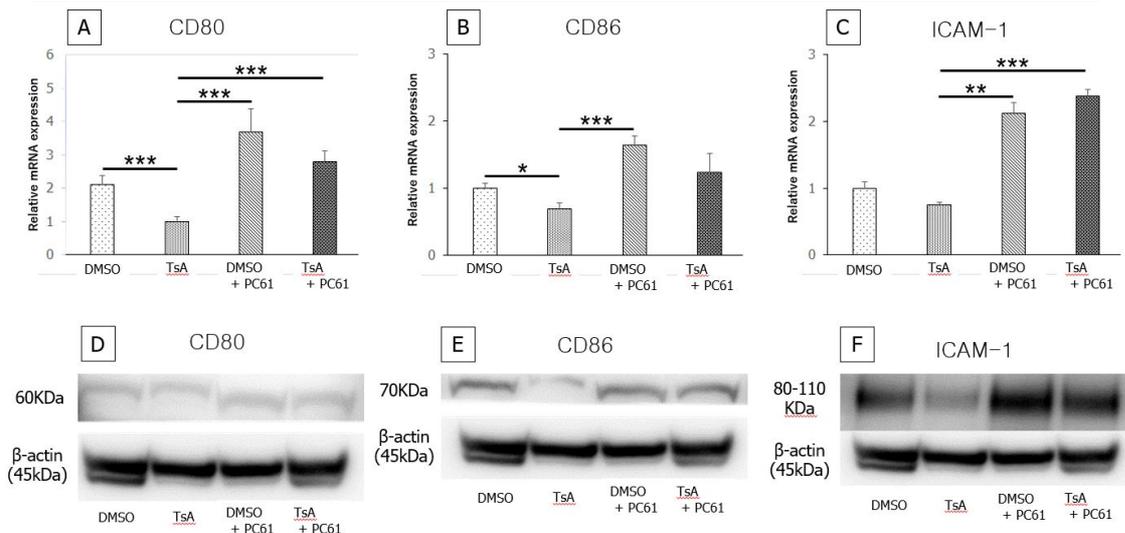
図 4. IRI 後 2 日目の腎における mRNA 発現レベル



CD80、CD86、ICAM-1 の mRNA と蛋白発現レベルの半定量を行い、4 群間で比較した。その結果 TsA 群では、CD86、ICAM1 の mRNA 発現レベル・蛋白発現レベルいずれもその他の群と比較して抑制されていることが明らかになった (図 5)。

さらに IRI 後 2 日目の CD45 免疫染色で炎症細胞数をカウントし比較した結果、TsA 群ではその他の群より炎症細胞浸潤が抑制されていた。

図 5. IRI 後 2 日目の腎における免疫関連抗原分子の mRNA 発現レベルと蛋白発現レベル



以上のことから TsA 投与による内因性の Treg の増加は、抗炎症性サイトカインである IL-10 上昇させ腎 IRI 後の免疫関連抗原分子の発現を抑制することで、IRI 後早期の腎保護効果を発揮できる可能性が示唆された。

引用文献

1. Takada M et al, J Clin Invest 100: 1199-203, 1997
2. Lee K et al, Am J transplant 14: 27-38, 2014
3. Kinsley GR et al, Kidney Int 77: 771-80, 2010
4. Chandraker A et al, Kidney Int 52: 1678-84, 1997

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. The 112th Annual Meeting of the American Urological Association, May, Boston, USA
1) Yamamoto, R., Satoh, S., Numakura K, Tsuruta H, Maeno A, Inoue, T, Narita, S, Satoh, S, and Habuchi, T, (2016) Protective Effects of Regulatory T cells in a Murine model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury.

2. 山本竜平、齋藤満、沼倉一幸、鶴田大、前野淳、井上高光、成田伸太郎、佐藤滋、羽瀧友則、マウス腎虚血再灌流障害モデルにおける制御性 T 細胞の腎保護効果の検討、第 52 回日本移植学会総会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。