

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16011

研究課題名（和文）ラット腎移植拒絶反応モデルにおける血管内皮細胞カベオリン1発現の意義に関する検討

研究課題名（英文）The significance of peritubular capillary phenotypic changes and caveolin-1 expression in a model of rats kidney transplantation

研究代表者

山本 泉 (Yamamoto, Izumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60600468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：腎移植は腎代替療法の最も優れた治療法です。また、腎移植後の移植腎喪失の最大の原因は慢性抗体関連型拒絶反応です。我々は、これまでの臨床研究において、慢性抗体関連型拒絶反応では、内皮細胞の形質変化およびCaveolin-1の発現が亢進することを報告してきました。今回の研究の目的は、ラット腎移植モデルを用いて、内皮細胞の形質変化やCaveolin-1発現の意義を検証することです。結果では、ヒトの抗体関連型拒絶反応で見られた内皮細胞の形質変化とCaveolin-1発現の亢進をラット腎移植モデルで再現することに成功しました。今後Caveolin-1発現を抑制した際に起こる現象を検証する必要があります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎移植は腎代替療法の最も優れた治療法です。しかし、移植した腎臓は17年程度で廃絶してしまいます。この現象の最大の原因は慢性抗体関連型拒絶反応です。慢性抗体関連型拒絶反応では、内皮細胞の形質変化およびCaveolin-1の発現が亢進することが分かっています。今回の我々の研究は、この様なヒト移植腎の抗体関連型拒絶反応時に見られる変化と同等の変化を生じる動物モデルを作成することに成功したという点で大きな意義があります。今後、このモデルを用いて、Caveolin-1発現を抑制した際に起こる現象を検証することで、移植腎がより長く生着するような創薬の開発に結び付けたいと考えています。

研究成果の概要（英文）：Kidney transplantation is a best therapy among renal replacement therapy. Chronic antibody mediated rejection is a challenges to overcome in this field. In the clinical situation, we previously reported the distinct features of endothelial phenotypic changes and caveolin-1 expression in this disease. The aim of this study is to clarify the significance of peritubular capillary phenotypic changes and caveolin-1 expression in a model of rats kidney transplantation. In the results, we successfully demonstrated the distinct features of peritubular endothelial phenotypic changes and caveolin-1 expression in the model of rats kidney transplantation. We further need to observe the phenomenon when caveolin-1 expression is inhibited in the future.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎移植 抗体関連型拒絶反応 Caveolin-1

1. 研究開始当初の背景

近年、腎移植患者における移植腎生着率向上は目覚ましく、特に 1980 年代のカルシニューリン阻害剤の登場以降、20 年近い生着期間を得ることも可能となってきた。しかし、このような改善は、主に周術期から移植後 1 年までの急性拒絶反応の改善が主たる要因とされ、慢性抗体関連型拒絶反応への理解が依然として最重要である。

我々はこれまでに腎移植で生じる慢性拒絶反応のターゲットが血管内皮細胞であることに着目し、電子顕微鏡レベルでの内皮細胞の形質変化から、内皮細胞におけるカベオラ形成の増加と、その構造蛋白である PV-1 (plasmalemmal vesicle associated protein-1) および CAV-1 (Caveolin-1) が、腎臓内の毛細血管内皮細胞に高発現することを世界に先駆けて報告してきた (Am J Transplant 2007;7:1954; Am J Transplant 2008;8:2627)。さらには、最近、この現象が実臨床における移植腎予後と強く関連することも、世界に先駆けて報告した。(Clin Transplant. 2016;30:11:1417-24) また、つい最近、別の研究グループが、移植腎における Caveolin-1 の重要性を確認している (AJT 2017.Apr26.doi:10.111/ajt.14327.)。これまでの関連した研究において、カベオラ関連蛋白である PV-1 や CAV-1 は、apoptosis (J Cell Sci; 2006:119:1812)、基底膜産生障害 (MBC 2004:15:678)、リモデリング (JASN 2008; Kidney Int) に関与することが知られている。これらの事実は、慢性抗体関連型拒絶反応で特徴的な形態として周知されている、微細血管数の減少、血管基底膜の肥厚、内皮細胞のリモデリングがカベオラによって説明できる可能性がある。以上の学術的背景から、我々は、慢性抗体関連型拒絶反応の進展メカニズムには、内皮細胞のカベオラ及びカベオラ関連蛋白が関連していると仮説を立て、実証することを目的とした。

2. 研究の目的

ラット腎移植抗体関連型拒絶反応モデル(腎毛細血管におけるカベオラ形成を確認済み)を用いて、Caveolin-1 に直接介入(Caveolin-1 阻害剤:Daizein の使用)することで、その意義を検証することを目的とする。

なお、抗体関連型拒絶反応における Caveolin-1 に関連した論文としては、我々のグループの発表してきた 3 報 (AJT 2007;7:1954, AJT 2008;8:627, Clin Transplant. 2016;30(11):1417) 以外には、AJT 2017.Apr26.doi:10.111/ajt.14327. しかなく、独自性が高い。また、慢性抗体関連型拒絶反応の代表的な病理所見である 微細血管数の減少、血管基底膜の肥厚、内皮細胞のリモデリングなどの形態学的変化が、カベオラを介して生じていることが実証できれば、慢性抗体関連型拒絶反応の病態理解、診断的バイオマーカーとしての価値を提唱でき、創薬の開発にもつながると考えられ、創造性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

事前感作モデル(皮膚移植による感作)および無感作モデルにおいて、IHC による病理組織学的評価を行なう。IHC、ウエスタンブロット(Simple Western TM)およびリアルタイム PCR を用いて、Native kidney、移植モデル、皮膚感作モデルをサンプルとして用いた。Caveolin-1 に対する抗体は monoclonal 抗体 (clone:7C8) を用いる。なお、病態モデル以外にコントロールとして、Native kidney (Donor 0 hour kidney) を使用した。

4 . 研究成果 Native Kidney を用いて、IHC、ウエスタンブロット(Simple Western TM) およびリアルタイム PCR の条件設定を確立した。IHC では、一次抗体(mouse monoclonal antibody caveolin-1(7C8), sc-535)100 倍希釈、二次抗体(Goat anti-Mouse IgG H&L(Alexa Fluor488, ab150113) × 200 倍希釈にて良好な染色性が得られた。ウエスタンブロットでは、サンプル濃度 1.25 μg/μL で、Caveolin-1 antibody (R&D system AF5736 × 10 倍希釈, CST # 3267 × 50 倍希釈)にて、29kDa 付近にピークを持つ蛋白発現を確認することができた。リアルタイム PCR に関しては、TaqMan; probes for rat CAV-1 (Assay ID Rn00755834_m1) を使用し、良好な結果が得られた。

移植なしの Native Kidney、皮膚移植なしの無感作モデルにおける Caveolin-1 およびカベオラ形成を比較検討し、免疫組織化学染色や Simple Western、RT-PCR を用いて、移植モデルでは、Native kidney に比べて、Caveolin-1 の発現が増加することを確認することができた。すなわち、ヒトの抗体関連型拒絶反応で見られた内皮細胞の形質変化と Caveolin-1 発現の亢進をラット腎移植モデルで再現することに成功した。

一方、移植手技が安定しなかったこともあり、皮膚感作モデル、Caveolin-1 への介入の検証実施までは至らなかった。今後、Caveolin-1 阻害剤を確立した抗体関連型拒絶反応モデルに投与することで生じる変化を検証することで、病態解明、創薬の可能性について検証する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------