

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592083

研究課題名（和文） 新規ガンマラクトン化合物とサイトカインにより誘導される腎固有の修復再生機構の解明

研究課題名（英文） Study of proper mechanism of repair and regeneration after kidney injury evoked by novel gammalactone low molecular compounds derivatives with cytokines

研究代表者

石橋 道男 (ISHIBASHI MICHIO)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40107032

研究成果の概要（和文）：

一側尿管完全閉塞解除モデルは水腎症による尿細管障害からの修復過程の解析を可能とするラットモデルであり、尿路閉塞時における乳頭基部・血管束から尿路上皮を含む髄質への細胞応答が観察できる。尿細管障害への修復再生に関連する“niches”となる可能性を想定した。この基盤研究により、TNFは尿細管周囲に1型コラーゲンを優位に誘導し、いっぽう、新規ベンゾイソフラノン低分子化合物はガレクチン-3、rBATを発現する細胞増殖と血管新生を誘導し、異なるマトリックス応答によって尿路閉塞による尿細管組織障害を軽減した可能性が示唆された。新規ベンゾイソフラノン低分子化合物にはTGFβ1による血管内皮細胞と尿細管細胞への抗線維化作用にくわえ、ガレクチン-3とrBAT分子の誘導による血管新生と抗アポトーシス作用をもち、従来のガンマラクトン誘導体よりも10倍以上の力価をもつことから、尿細管障害を主たる病変とする慢性移植腎機能障害への有効な治療薬となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Using animal model of unilateral ureteral, complete obstruction for 14 days with for six days observation after release, cellular infiltration and accumulation surrounding crossing points of bundle of descending varsa recta at the base of papillae, and propagating beneath depressed pelvic urothelial layer, was remarkably observed. Those pathologic lesions of tissue responses were tentatively called as “niches” for repair or regeneration of injured tubules. To explore “niches”, beneficial treatment with recombinant rat TNF-alpha induced some proper matrix response with dominant type-1 collagen surrounding peritubular space. In contrast, treatment with novel benzoisofuranone induced another proper matrix response at “niches” with galectin-3 or rBAT positive cellular accumulation with angiogenesis and anti-apoptosis. The present studies suggested that ten times more potent benzoisofuranone compounds might be a candidate as promising medicine for intractable chronic renal allograft nephropathy

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：①一側尿管閉塞解除ラットモデル、②ガンマラクトン低分子化合物、③ベンゾイソフラノン低分子化合物、④TNF-α、⑤アポトーシス、(6)ガレクチン-3、(7)マトリックス応答、(8)血管新生、(9)1型コラーゲン、(10)CD98/4F2hc/rBAT

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

腎移植後の慢性移植腎機能障害が移植腎の長期成績を妨げる原因と指摘され以来、20年を経過しようとするがまだ有効な予防と治療方法は見つかっていない。慢性移植腎機能障害は移植免疫反応に加えて虚血障害、薬剤性腎障害、ウイルス感染などによる腎障害が非移植免疫因子として加わるため病態は複雑である。糖尿病性腎症や高血圧性腎硬化症による慢性進行性腎障害の治療にARB薬物療法がなされるが、腎障害進行をいくらか遅らせる効果はみられるが根本的な治療には至っていないし、現在使用されている免疫抑制剤自身にも効果はない。

いま、慢性腎障害を積極的に修復再生する方法は見つかっていないため新しい展望を開く画期的な知見は得られていないが、いくつかの試みはすでに始まっている。例えば、ES細胞から腎臓を創世することは当面困難であることから、2004年の Oliver らの論文は、成体の腎乳頭組織に尿細管を修復再生する細胞群が存在することを示唆した (JCI2004)。

本研究代表者も、あたらしいアプローチとして新規ガンマラクトン (oxo-glutarate系) 化合物と interferon-gamma あるいは TNF-alpha/beta を併用投与する新しい治療法によって、ラット急性腎障害モデル (一側尿管閉塞解除モデルおよび急性ピュロマイシン投与ネフローゼモデル) において障害を受けた腎臓の修復と回復がそれぞれの単独療法よりも効果が得られるという知見を得た。すなわち、新規ガンマラクトン (オキソグルタル酸系) 化合物には薬理効果として、腎糸球体病変と腎尿細管病変を軽減修復する活性をもつ2種類の化合物、前者として # 5 2 3 (2-Fluoro-5-oxotetrahydro-furane-2-carboxylate de benzyle)、後者として # 1 3 7 6 (1-Chloro-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofurane-1-carboxylate de benzyle) があり、recombinant gamma-interferon と # 5 2 3 の併用により腎糸球体病変の修復活性を、そして、recombinant TNF- α/β と # 1 3 7 6 の併用により腎尿細管病変の修復活性がそれぞれ強力に導入されることを見いだした。

2. 研究の目的

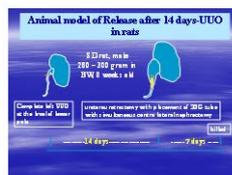
そこで、一側尿管を完全閉塞し尿管・尿管吻合による閉塞解除する水腎症からの尿細管障害からの修復過程を解析することが可能なラットモデルを用いて、腎固有の尿細管障害からの修復再生機構を解明することを目的とした。

あたらしい着眼点としては、第一には、ガンマラクトン低分子化合物と新規ベンゾイソフラノン低分子化合物、そして、サイトカインとしてラットリコンビナント TNF- α をそれぞれ単独投与実験により腎機能と病理学的解析をおこなうこと、第二に、細胞浸潤・増殖、コラーゲン、および血管新生などのマトリックス応答について免疫病理、形態学的な検討、とくに、抗アポトーシス、血管新生誘導を發揮し個体の発達に関わる糖鎖結合蛋白のうちガレクチン-3 と、細胞の生存に不可欠な Heterodimeric amino acid transporter のうち heavy chain、CD98/4F2hc/rBAT を発現する細胞集団の動向に焦点をあてたことである。CD98 (4F2hc)/rBAT がヒト末梢血単球のほかにヒトマクロファージ培養細胞株、THP-1 および U937 に発現している。# 5 2 3 と rIFN-gamma により THP-1 に CD98 (4F2hc)が、# 1 3 7 6 と rTNF-alpha/beta により U937 に rBAT がそれぞれ選択的に誘導される知見を得ており、新規化合物のスクリーニング法にもつながる (前者は、腎糸球体治療剤のスクリーニング方法 出願番号：特願 2006-161569、後者は腎尿細管治療剤のスクリーニング方法 出願番号：特願 2007-105067)。

そして、この基盤研究をとおり、成体における尿細管病変への修復再生機構のひとつとして、乳頭部血管束から尿路上皮を含む髄質が "niches" となり、ガレクチン-3、rBAT を発現する細胞集団が誘導され、細胞浸潤・増殖、1型コラーゲン、および血管新生などのマトリックス応答が惹起され尿細管障害の軽減と修復に関わる結果を得た。TNF と、従来よりも10倍以上の強い生物活性をもつガンマラクトン誘導体である新規ベンゾイソフラノン化合物は異なるマトリックス応答を惹起した。今後、腎移植後の慢性移植腎機能障害に対する有効な治療法となりうることが示唆された。

一側尿管完全閉塞解除モデル

- In UO-release model, obstruction was released by ureteroureterostomy and contra lateral nephrectomy (CNx) was done (Figure-1). After release of 14-days UO with CNx in control animals (n=16), 8 weeks old male SD rats,



plasma creatinine (pCr) level was recovered from
 4.8 ± 0.6 mg/dl on day 2,
 3.0 ± 0.6 mg/dl on day 4,
 2.8 ± 0.4 mg/dl on day 5,
 2.2 ± 0.1 mg/dl on day 6
 and
 2.2 ± 0.3 mg/dl on day 7
 respectively

3. 研究の方法

方法-1) 一侧尿管を完全閉塞し尿管・尿管吻合による閉塞解除する水腎症からの尿細管障害からの修復過程を解析することが可能なラットモデルを用いて、腎固有の尿細管障害からの修復再生機構を腎機能の予後と病理学的所見との関連を見出し、仮説を提唱する。

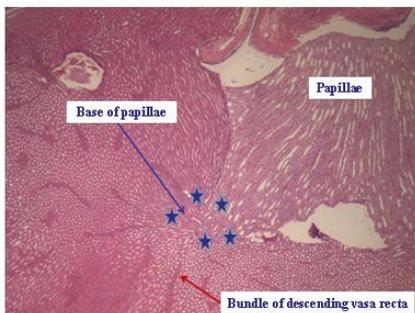
SD ラット 12 週齢、雄を用い左尿管を腎下極の高さで7.0ナイロン糸にて完全結紮し14日間放置する。14日目に閉塞部を切除し2.6Gカフを尿管ステントとして尿管・尿管吻合し閉塞を解除すると同時に対側右腎摘除する。閉塞解除後1週間観察し、ラットを犠牲し、左閉塞腎を得る。

実験群：投与量は、①#1376群(30mg/kg/day、皮下注連日投与)、②#NK0075群(3mg/kg/day、皮下注連日投与)、③#ラットリコンビナント(rat recombinant) rrTNF- α 群(R&D社、0.4 μ gを腹腔内注射にて隔日投与)とし、④対照群として低分子化合物は5%アラビアゴム、rrTNF- α ではPBSを投与した。投与期間は、結紮前の5日前から投与開始し、閉塞期間14日と解除後6日間とした。

2) 腎乳頭基部・血管束から髄質における病理学的検討

図には正常なラット腎乳頭基部・血管束から髄質を示す。

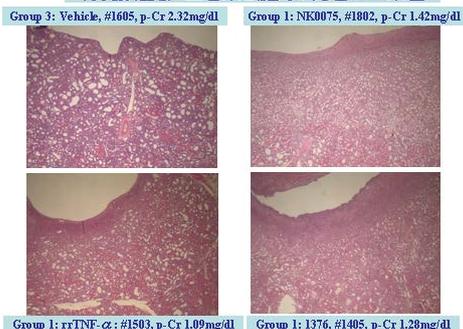
腎乳頭基部・血管束と髄質
正常ラット腎(SD、9週令、雄)



3) 閉塞解除腎への免疫病理に使用した抗体

図には、各実験群の代表的な腎乳頭基部・血管束から髄質に、腎盂粘膜下に細胞の集積が観察され、治療群の3群と対照群にあきら

腎乳頭基部・血管束と髄質の応答: HE染色



かな細胞集積の違いが観察された。

①E-cadherin (ab53033, abcom社)、
② Galectin-3:polyclonal antibody against whole rabbit galectin-3 cDNA (Teijin Pharma よりの供与)

③Collagen-1: Rabbit polyclonal (ab292, abcom社)

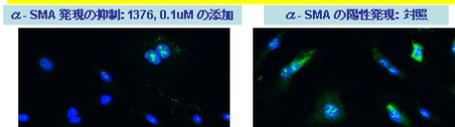
④PHA-E, biotinylated Phasolus Vulgaris Erythroagglutinin (B-1125, Vector Lab)

⑤ rBAT: Rabbit polyclonal antibody against rBAT nucleotides (Dr Yoshikatsu Kanai より)

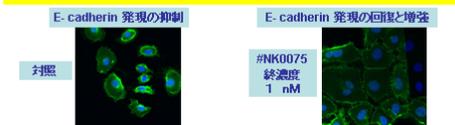
4-1) ラット腎尿細管培養細胞株、NRK52E への Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)

ラット尿細管培養細胞株、NRK52 を継代 (passage) -4 から継代-6 にて使用した。Lab-Tek II Chamber slide System (Nalge Nunc, IL) を用いて、最終 50 ng/mL の濃度のヒトリコンビナント TGF- β 1 (和光) を添加すると同時に、被検化合物を培養後に対照が線維芽細胞様を示し

ガンマラクチン#1376による、hrTGF- β 1添加後のヒト皮膚真皮血管内皮細胞に誘導される Endo-MTの阻害効果



ベンゾイノフラン#NK0075による、hrTGF- β 1添加後のラット腎尿細管細胞株 NRK52E に誘導される EMT の阻害効果



た時点で、E-カドヘリンの発現をウサギ抗-カドヘリンポリクローナル抗体 (abcom 53033)を用い4 $^{\circ}$ Cにて18時間反応させ、二次抗体として Alexa-Flour 488 にて染色し、核を DAPI にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) にて、細胞の性状とともに E-カドヘリン染色性を測定した。

4-2) ヒト皮膚真皮微小血管内非皮細胞 (HDVEC)への Endothelial-Mesenchymal Transition (Endo-MT)

EMTと同様の方法を用いた。至適なヒトリコンビナント TGF- β 1 の濃度にて HDVEC (Cell Applications, Inc, San Diego) を刺激し、 α -Smooth Muscle Actin (mouse monoclonal antibody ab7817 abcom, Cambridge) の発現の変化を評価した。#NK0075の Endo-MT への効果は未検討であるが、#1376は 100nM で Endo-MT を阻害した。

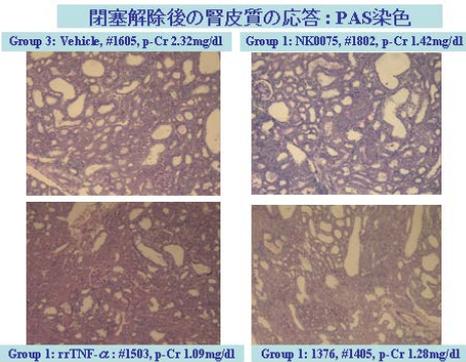
4. 研究成果

1) 閉塞解除後の腎機能：④対照群の血漿ク

レチニン値 (mg/dl) では 2. 17 ± 0. 21 に比して、① # 1376 群、1. 33 ± 0. 09、② # NK0075 群、1. 59 ± 0. 24、③ # rrTNF-α 群 1. 21 ± 0. 12 (うち 1 例は 2. 76)、と治療群に腎機能が温存されたが群間に差はなかった。

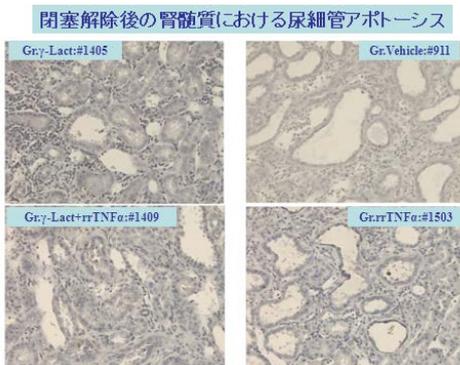
2) 閉塞腎乳頭基部・血管束に集積する細胞群の解析結果

①皮髄境界における細胞浸潤の程度：細胞浸潤の程度は、実験群すべてにみるがとくに① # 1376 群と② # NK0075 群が④対照群と③ # rrTNF-α 群に比べて優位でとくに後者で著明であった。



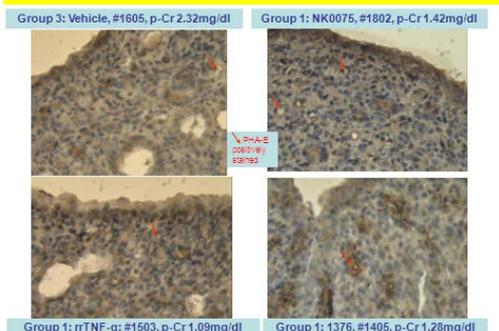
②尿細管のアポトーシス：

4 群間においては、皮髄境界での細胞浸潤の所見と同様に、① # 1376 群と② # NK0075 群にはアポトーシスの抑制がみられたが、③ # rrTNF-α 群には④対照群と同様の所見であった。



③ PHA-E 陽性による血管新生像

乳頭基部・血管束と髓質における血管新生像: PHA-E染色

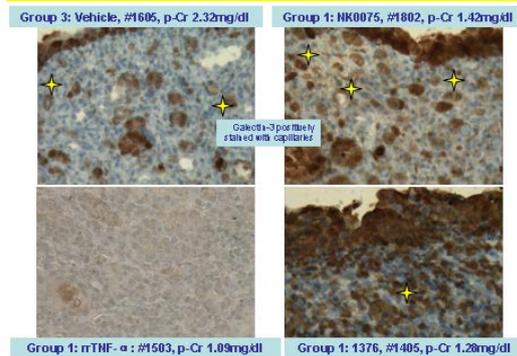


4 群間においては、皮髄境界での細胞浸潤の所見と同様に、① # 1376 群と② # NK0075 群には血管新生像が③ # rrTNF-α 群、④対照群と比べて優位な違いがみられた。

④ガレクチン-3の染色性：

4 群間においては、皮髄境界での細胞浸潤、アポトーシス、そして、血管新生像の所見と同様に① # 1376 群と② # NK0075 群においてガレクチン-3の発現が優位であった。③ # rrTNF-α 群は④対照群よりも低い発現であった。ガレクチン-3は血管新生像、尿管再生、単核球細胞、尿路移行上皮

PHA-E 陽性血管新生像に関連するガレクチン-3の発現



に陽性であった。

⑤ rBATの染色性：

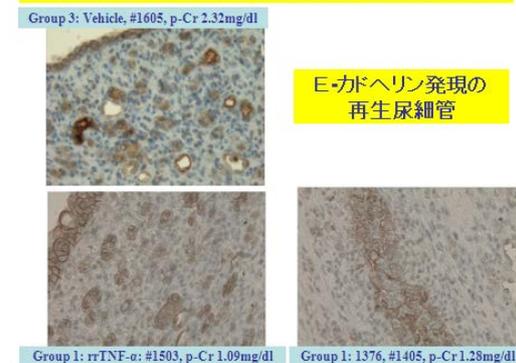
図には示していないが、① # 1376 群に③ # rrTNF-α 群と④対照群と比して優位な発現をみた。

⑥ 1型コラーゲンの染色性：いっぽう、1型コラーゲンは、③ # rrTNF-α 群と④対照群に優位でとくに、前者に優位であった。① # 1376 群はとくに弱く② # NK0075 群ではやや発現が増加した。

⑦ E-カドヘリンを指標にした尿細管細胞の修復再生：

閉塞腎乳頭基部・血管束に集積する細胞群のなかに、E-カドヘリンを発現する修復再生の小さなサイズの尿細管を同定できた。③ # rrTNF-α 群に優位に修復再生している尿細管が存在した。

腎乳頭基部・血管束と髓質における再生尿細管



3) 解析のまとめと考察

今回の検討によって、尿管閉塞による水腎症により障害をうけた腎病変として、乳頭基部・血管束から髄質に、腎盂粘膜である尿路移行上皮もふくめた細胞浸潤。血管新生、ガレクチン-3とrBAT蛋白分子、1型コラーゲンの応答が観察された。それらは、尿細管細胞の障害に対するマトリックス応答と解釈できる。

尿管閉塞による水腎症において観察される細胞集積、細胞浸潤の応答として、腎盂粘膜である尿路移行上皮、乳頭から集合管、遠位尿細管の障害により産生されたサイトカイン、ケモカインにより、descending vasa recta を介して遊走集積したか、あるいは局所の間質細胞の増殖応答によって乳頭基部・血管束から髄質への浸潤細胞増殖したいずれかの可能性が考えられる。

水腎症後の、腎乳頭基部・血管束から髄質におけるマトリックス応答と尿細管再生

治療群	腎機能 クレアチニン (mg/dl) mean ± SD	尿管の アポトーシス	間質への 細胞浸潤	間質の 線維化	乳頭基部・血管束から髄質への マトリックス応答と尿細管再生					
					細胞浸潤の 程度	ガレクチン-3 陽性細胞	rBAT 陽性細胞	1型 コラーゲン	血管 新生 (PHA-E)	尿細管 再生 (E-cad- herin)
対照	2.17 ± 0.21	++	+	++	+	+	±	++	+	+
ラット リコンビナント TNF-α	1.21 ± 0.12	++	+	+	++	±	±	+++	+	+++
ガンマラクトン 低分子化合物 1376	1.33 ± 0.09	+	++	+	+++	+++	++	±	++	++
ベンゾ イソフラノン 低分子化合物 NH0075	1.59 ± 0.24	±	+++	±	+++	+++	not done	+	+++	not done

治療群として、#rrTNF-α群と、ガンマラクトン低分子化合物#1376およびその誘導体であるベンゾイソフラノン低分子化合物#NK0075群は、それぞれ異なるマトリックス応答を示した。#rrTNF-α群では、1型コラーゲンの産生が尿細管周囲に優位に発現しており、尿路閉塞による圧ストレスに抗することで腎組織構造を維持し、結果として、閉塞解除腎の機能温存をもたらしたと解釈できる。いっぽう、しかし、ガンマラクトン低分子化合物#1376とベンゾイソフラノン低分子化合物#NK0075群は、細胞増殖、ガレクチン-3、rBAT、血管新生によって尿路閉塞による圧ストレスに抗し構造維持した可能性が考えられる。さらに、ガレクチン-3分子は抗アポトーシス作用と血管新生をもち、rBATは細胞の栄養供給と生存を誘導し、長期的な観点でみると組織の機能温存がより期待される可能性が推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

M Ishibashi, T Nakatani, M Iwano, K Fujimoto, Y Kanai, Yoshihiko Hirao (1). Important Repair/protective Process of Papillae in Renal Function and Morphology demonstrated by Use of 14 days-UUO-released Model and Small Synthetic Compounds in Rats American Society for Nephrology(ASN) Renal week 2011 November 12, 2011 Philadelphia, U.S.A.

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規ベンゾイソフラノン誘導体による臓器組織の修復再生治療薬

発明者：石橋道男(奈良県立医科大学泌尿器科学教室)小島直人、(大阪大学大学院薬学研究科薬品製造化学分野)、田中徹明(大阪大学大学院薬学研究科薬品製造化学分野)

権利者：公立大学法人奈良県立医科大学

種類：

番号：特願2011-35260

出願年月日：平成23年2月21日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 道男 (ISHIBASHI MICHIO)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40107032

(2) 研究分担者

藤本 清秀 (FUJIMOTO KIYOHIDE)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50264867