

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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591806

研究課題名（和文）シクロスポリン腎症に対するカルバミル化エリスロポイエチンの腎保護効果の研究

研究課題名（英文）Carbamylated erythropoietin ameliorates cyclosporine nephropathy without stimulating erythropoiesis

研究代表者

矢澤 浩治 (YAZAWA KOJI)

大阪大学 医学系研究科・助教

研究者番号：40569109

研究成果の概要（和文）：

免疫抑制剤のシクロスポリンの導入により腎移植の成績は向上した。しかし、シクロスポリンはそれ自身、腎毒性を有しており長期使用することにより腎機能障害(シクロスポリン腎症)を来す。そこでシクロスポリン腎症に対するカルバミル化エリスロポイエチン長期投与の効果について検討した。シクロスポリン腎症モデルにエリスロポイエチン、カルバミル化エリスロポイエチンを加えることにより腎機能障害が軽減された。また、エリスロポイエチンは、Hbの上昇を来したが、カルバミル化エリスロポイエチンはHbに変化を与えなかった。この結果は、シクロスポリン腎症に対する新たな治療戦略となりうる。

研究成果の概要（英文）：

The introduction of cyclosporine (CsA) has improved graft survival, but it causes nephropathy, which limits its clinical utility. To investigate the clinical applications of CEPO, we next evaluated the long-term therapeutic effect of CEPO using a CsA-induced nephropathy model. CsA caused renal dysfunction, while EPO/CEPO administration significantly improved renal function. EPO-treatment significantly increased Hb concentration, while CEPO-treatment neither enhanced nor reduced Hb concentration. These results suggest a new therapeutic approach using CEPO to protect kidneys from CsA-induced nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：シクロスポリン腎症、エリスロポイエチン、カルバミル化エリスロポイエチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫抑制剤の進歩により、腎臓移植の短期生着率は飛躍的に向上した。とくに 1980 年のシクロスポリンの登場は急性拒絶反応を抑制し、移植腎生着率の著明な改善をもたらした。ただし、免疫抑制剤の進歩にもかかわらず、10 年、15 年の長期生着率を考えると未だ満足のものではない。それは、移植後長期になると、免疫学的要素、非免疫学的要素による慢性的な移植腎障害、いわゆる慢性移植腎症が問題になってくるからである。慢性移植腎症には、虚血再還流障害、カルシニューリン阻害薬による薬剤性腎障害、高血圧、脂質代謝異常、糖尿病など様々な要因が関係している。これら一つ一つの要因を克服していくことにより移植腎の長期生着の向上につながると思われる。慢性移植腎症の要因の一つであるシクロスポリンの腎障害は、シクロスポリン腎症と呼ばれ、病理学的には不可逆性の腎間質縞状線維化、尿細管萎縮、細動脈のヒアリン化を特徴とする。

(2) エリスロポエチン (EPO) は、造血作用のみならず、諸臓器に対して保護作用を持つことが報告され、脳血管障害や心血管障害に対する新たな治療薬として注目されている。腎臓においても EPO 自体が腎保護作用を有し、EPO 受容体が腎臓に存在することが報告されている。ただし、EPO の尿細管細胞への親和性 Kd 値は $\sim 1\text{nM}$ であり、血清 EPO 濃度 $1\sim 10\text{pM}$ に比べて非常に低いことが報告されている。従って腎臓での組織保護効果を期待して EPO を投与する場合は、造血作用を期待して投与する場合に比して大量

の EPO が必要になると考えられ、多血症等とそれに付随する合併症が問題になってくる。近年 EPO 受容体が造血作用と組織保護作用では異なり、カルバミル化エリスロポエチン (Carbamylated Erythropoietin, CEPO) は組織保護受容体に高親和性を持つことが報告されている。すなわち CEPO においては、EPO 受容体とコモンベータ受容体のヘテロダイマーを通してシグナルが伝達され、組織保護効果を有するが造血作用を有しないという特性を持つ。我々はラット虚血再還流障害モデルに EPO/CEPO を投与することにより、尿細管のアポトーシス、 αSMA の発現が抑制されることをすでに報告している。EPO/CEPO ともに腎保護作用を有するが、CEPO は EPO と違い、造血作用を認めないことも実証している。また、ラット尿細管間質障害モデルにおいても同様に CEPO が造血作用なく腎保護効果を有することを報告している。

(3) このように、さまざまな腎障害モデルにて EPO/CEPO の腎保護作用が認められている。そこで、慢性移植腎症の原因の一つであるシクロスポリン腎症に対しても EPO/CEPO の効果が期待される。実際に臨床応用が可能になれば、移植腎の長期生着率の改善が見込まれる。

2. 研究の目的

シクロスポリン (CsA) の導入により腎移植の短期成績は著明に改善した。ただし、長期生着を考えると免疫学的要素、非免疫学的要素による移植腎障害 (慢性移植腎症) は未解決の問題である。慢性移植腎症の原因の一つとしてシクロスポリンによる腎毒性 (シクロスポリン腎症) がある。最近、エリスロポイ

エチン (EPO) が神経組織をはじめ諸組織に対し保護効果を持つことが証明されている。この組織保護作用に着目し、ラットのシクロスポリン腎症モデルにおいて EPO と、EPO をカルバミル化した CEPO (造血作用を有さない) の腎保護効果を検討することが本研究の目的である。

(1) EPO/CEPO の腎保護作用・副作用の検討
腎保護作用があるか否かを検討する。腎保護作用に関しては、臨床データ、病理学的所見にて評価する。また、EPO/CEPO 投与による副作用 (とくに造血作用に関するもの) についても検討を加える。

(2) EPO/CEPO の腎保護効果のメカニズム
検討

ラットのシクロスポリン腎症モデルに EPO/CEPO を投与し、尿細管のアポトーシス、間質の線維化、血管新生に関連する因子の RNA レベルでの発現について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) シクロスポリン腎症モデルラットに対する EPO/CEPO の至適投与量を検討する

① 低ナトリウム食飼育下の6週齢の雄性 SD ラットを4群に分類し、それぞれコントロール群、シクロスポリン (CsA) 群、シクロスポリン+エリスロポエチン (EPO) 群、シクロスポリン+カルバミル化エリスロポエチン (CEPO) 群とする。シクロスポリン腎症モデル作成法については過去の報告に従い (Kidney Int 65: 2041-2053, 2004)、CsA 群、EPO 群、CEPO 群にシクロスポリン 30mg/kg を連日皮下注射しシクロスポリン腎症を作成する。

② EPO 群には EPO100~1000 単位/kg を週3回腹腔内注射、CEPO 群には CEPO100~1000 単位/kg を週3回腹腔内注射する。対照となるコントロール群は生理食塩

水、およびシクロスポリンの溶媒である sesame oil を投与、CsA 群には生理食塩水を投与する。投与開始4週間後に麻酔薬過剰投与により安楽死処分、その際に腎を摘出し、各群の所見を比較検討する。
③ ハーベスト時に採血し、CsA および EPO/CEPO による腎機能への影響を検討すると共に、赤血球数への影響を調べる。
④ ハーベストした腎組織をパラフィン包埋し、PAS 染色およびマッソン・トリクロム染色により尿細管障害および間質線維化への影響を検討する。

以上より、副作用・効果の面から EPO/CEPO の至適投与量を決定する。

(2) 至適投与量での EPO/CEPO の腎保護効果の検討、メカニズムの検討

① 酵素抗体法により組織へのマクロファージ浸潤 (ED1 染色)、間質線維芽細胞の形質転換 (α -smooth muscle actin 染色) を評価する。

② TUNEL 染色を行うことにより、EPO/CEPO によるシクロスポリン腎症に対する抗アポトーシス効果を検討すると共に、Western blot 法により組織における PI-3 kinase、Akt のリン酸化を検討し、EPO/CEPO による抗アポトーシス効果のメカニズムを詳細に検討する。

③ シクロスポリン腎症の進展には TGF- β 1 発現亢進により線維化が進行すると考えられている。EPO/CEPO による抗線維化のメカニズムの解明のために、TGF- β 1、type I collagen の mRNA 発現について real time PCR 法で検討する。

④ 虚血再還流モデルにおいて、EPO は HIF-1 α を誘導し血管新生をもたらすことを報告した。本モデルにおいても、同様に real time RT-PCR 法や Western blot

法を用いて HIF-1 α や VEGF などの mRNA、タンパクの発現を検討し、組織学的にも JG12 などの血管内皮細胞マーカーによる免疫染色法を用いて検討する。

4. 研究成果

- (1) 治療 4 週後のヘモグロビン値は、CsA 群が 16.5 ± 1.2 g/dL、CEPO 群が 15.9 ± 0.7 g/dL であったのに対し、EPO 群では 20.4 ± 0.9 g/dL と有意に上昇を認めた。血清クレアチニン値については、Control 群が 0.21 ± 0.02 mg/dL であったのに対し、CsA 群では 1.17 ± 0.24 mg/dL と有意に腎機能の悪化を認めた。一方、EPO、CEPO 投与により EPO 群では 0.82 ± 0.11 mg/dL、CEPO 群では 0.73 ± 0.21 mg/dL と有意に血清クレアチニン値の上昇が抑制されていた。
- (2) PAS 染色では CsA 群では尿細管の萎縮を認めたが、EPO/CEPO 群では傷害が軽度であった。またマッソン・トリクロム染色においても、CsA による間質の線維化が、EPO/CEPO 群では有意に抑制されていた (Control 群, $3.1\% \pm 1.2\%$, CsA 群, $12.2\% \pm 2.0\%$, EPO 群, $7.2\% \pm 2.6\%$, CEPO 群, $6.7\% \pm 2.7\%$)。 α -SMA 染色で形質転換を評価したところ、EPO/CEPO 投与群では CsA 群と比較し有意に α -SMA 陽性面積が少なかった (Control 群, $1.0\% \pm 0.5\%$, CsA 群, $9.7\% \pm 2.9\%$, EPO 群, $4.4\% \pm 0.8\%$, CEPO 群 $3.4\% \pm 1.4\%$)。
- (3) また ED-1 染色にてマクロファージの浸潤を評価したところ、EPO/CEPO 群では、CsA 群と比較し有意にマクロファージの浸潤が抑制されていた (Control 群, 38 ± 11 cells /HPF, CsA 群, 909 ± 240 cells /HPF, EPO 群, 538 ± 192 cells /HPF, CEPO 群, 486 ± 191 cells /HPF)。

- (4) シクロスポロン腎症における線維化には TGF- β 1 が重要な役割を果たすことが報告されており、腎皮質における TGF- β 1 の発現を real time RT-PCR で検討したところ、EPO/CEPO 投与により有意に TGF- β 1 の発現が抑制されていた (TGF- β 1/ β -actin 比; Control 群, 0.43 ± 0.14 , CsA 群, 1.59 ± 0.38 , EPO 群, 1.05 ± 0.27 , CEPO 群, 0.89 ± 0.12)。下流の type I collagen の mRNA の発現も、同様に EPO/CEPO 投与群で有意に抑制されていた (type I collagen/ β -actin 比; Control 群, 0.43 ± 0.09 , CsA 群, 1.01 ± 0.14 , EPO 群, 0.45 ± 0.10 , CEPO 群, 0.62 ± 0.12)。
- (5) TUNEL 染色を行い、アポトーシスについて評価したところ、CsA 群では Control 群と比較し有意に TUNEL 陽性細胞数は増加していたが (Control 群, 0.5 ± 0.4 cells /HPF, CsA 群, 16.3 ± 7.4 cells /HPF)、EPO/CEPO 群では有意にアポトーシスは抑制されていた (EPO 群, 6.6 ± 2.4 cells /HPF, CEPO 群, 5.4 ± 1.7 cells /HPF)。アポトーシスに関連する因子として、生存シグナルである PI3K、Akt 経路について Western blotting 法で検討したところ、CsA 群と比較し、EPO/CEPO 群では PI3K、リン酸化 Akt の発現が亢進していた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Abe T, Isaka Y, Imamura R, Kakuta Y, Okumi M, Yazawa K, Ichimaru N, Tsuda H, Nonomura N, Takahara S, Okuyama A. Carbamylated erythropoietin ameliorates cyclosporine nephropathy without stimulating erythropoiesis. Cell Transplant. 2012;21(2-3):571-80.

()

研究者番号：

〔学会発表〕（計 1 件）

阿部 豊文, 猪阪 善隆, 今村 亮一, 斎藤 純,
角田 洋一, 蔦原 宏一, 矢澤 浩治, 市丸 直
嗣, 高原 史郎, 奥山 明彦、ラットシクロス
ポリン腎症モデルにおいてカルバミル化エ
リスロポエチンは造血作用なく腎保護効果
を有する、第 98 回日本泌尿器科学会総会、
2010. 4. 30、盛岡

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 浩治 (YAZAWA KOJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40569109

(2) 研究分担者

高原 史郎 (TAKAHARA SHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄付講座
教授
研究者番号：70179547

(3) 連携研究者