Title	移植腎長期生着へ向けた慢性移植腎症非免疫学的メカニズムの解明と予防法の開発
Sub Title	Elucidation of the non-immunological mechanism of chronic allograft nephropathy for long-term engraftment and development of prevention methods
Author	森田, 伸也(Morita, Shinya) 篠田, 和伸(Shinoda, Kazunobu) 環, 聡(Tamaki, Satoshi) 吉田, 理(Yoshida, Tadashi) 高橋, 遼平(Takahashi, Ryouhei)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	ラットの慢性シクロスポリン(CsA)腎症モデルおよび、選択的NF-κB阻害剤であるDHMEQ(dehydroxymethylepoxyquinomicin) を投与したモデルを作成した。DHMEQは、CsAが投与されたラットの腎臓において、NF-κB活性化を抑制し、機能的障害、組織学的障害を軽減した。そのメカニズムとしては、マクロファージの活性化や走化性の亢進を促すMCP-1を減少させたことによる間接的効果、マクロファージの活性化や貪食能を抑えるという直接的効果による影響が考えられた。CsAは尿中蛋白流出を抑制することが報告されているが、DHMEQ投与はその効果を変えなかった。 We created rat models of Cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity and rat models which was administered Nuclear factor-κB (NF-κB)inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ).We showed that DHMEQ inhibited NF-κB activation and contributed to the protection of the kidney against functional and histopathological damages in this model. One of the mechanisms is an indirect effect of DHMEQ that reduces MCP-1 secretion. MCP-1 is one of the major mediators of chemotaxis and macrophage activation. Another mechanism is a direct effect of DHMEQ that inhibits macrophage activation and phagocytosis. DHMEQ treatment did not offset the inhibitory effect of urinary protein extraction due to CsA.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2019～2022 課題番号 : 19K09738 研究分野 : 腎移植
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K09738seika

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｋ０９７３８

研究課題名（和文）移植腎長期生着へ向けた慢性移植腎症非免疫学的メカニズムの解明と予防法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the non-immunological mechanism of chronic allograft nephropathy for long-term engraftment and development of prevention methods

研究代表者
森田　伸也（Morita, Shinya）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：１０３６５３６４

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）：ラットの慢性シクロスポリン(CsA)腎症モデルおよび、選択的NF-κB阻害剤であるDHMEQ(dehydroxymethylepoxyquinomicin) を投与したモデルを作成した。DHMEQは、CsAが投与されたラットの腎臓において、NF-κB活性化を抑制し、機能的障害、組織学的障害を軽減した。そのメカニズムとしては、マクロファージの活性化や走化性の亢進を促すMCP-1を減少させたことによる間接的効果、マクロファージの活性化や貪食能を抑えるという直接的効果による影響が考えられた。CsAは尿中蛋白流出を抑制することが報告されているが、DHMEQ投与はその効果を変えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
増加し続ける慢性腎不全患者に対する治療のうち、予後およびQOLの改善、さらに医療経済の点で透析に勝る腎移植の長期生着を阻む原因が慢性移植腎症(choronic/sclerosing allograft nephropathy:CAN)である。CANの原因の一因といわれるシクロスポリン(CsA)腎症における研究で、DHMEQ(dehydroxymethylepoxyquinomicin) がCsA投与ラットの腎臓でNF-κB活性化を抑制し、機能的、組織学的障害を軽減することが示された。免疫抑制効果もあるDHMEQが、臓器移植でのCsA腎症の抑制ひいてはCAN克服につながる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We created rat models of Cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity and rat models which was administered Nuclear factor-κB (NF-κB)inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ). We showed that DHMEQ inhibited NF-κB activation and contributed to the protection of the kidney against functional and histopathological damages in this model. One of the mechanisms is an indirect effect of DHMEQ that reduces MCP-1 secretion. MCP-1 is one of the major mediators of chemotaxis and macrophage activation. Another mechanism is a direct effect of DHMEQ that inhibits macrophage activation and phagocytosis. DHMEQ treatment did not offset the inhibitory effect of urinary protein extraction due to CsA.

研究分野：腎移植

キーワード：シクロスポリン腎症　NF-κB　DHMEQ　慢性移植腎症

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

腎移植は慢性腎不全の唯一の根治療法であり、予後および QOL 改善にて透析に勝るとされるが、現在透析患者数 32.5 万人に対し年間約 1600 件程度しか行われていない（日本移植学会 2016 ファクトブックより）。近年の免疫抑制剤のめざましい進歩により、急性拒絶反応は減少・軽症化し、移植腎の短期生着率は飛躍的な向上を示す一方、長期生着率が向上しているとはいえない。我が国では献腎移植数が少なく、生体腎移植に頼っている現状の中で、再移植の機会は多くない。したがって、移植可能であった移植腎を長期生着させることこそが慢性腎不全の治療のなかで、最重要の課題の一つであると考えられる。
長期生着を阻む最大の原因は、慢性移植腎症(choronic/sclerosing allograft nephropathy:CAN)である。現在、免疫学的要因は、抗ドナー抗体産生を含む慢性抗体関連型拒絶反応が着目され、多方面で研究され対応が可能となってきている。しかし、カルシニューリンインヒビターによる腎症、動脈硬化、発癌などいくつかの因子が関与する非免疫学的要因はいまだにその発症のメカニズムは完全には解明されておらず、克服が極めて困難となっている。CAN の組織学的終末像は、移植腎における血管内膜肥厚と内腔狭小化、それによる虚血、尿細管の萎縮・脱落、間質線維化と拡大、糸球体硬化で特徴づけられている。
CAN に似た組織像の一つが動脈硬化である。動脈硬化進展において Nuclear factor kappa-B (NF-κB)活性化という機序が関与しており、そこに着目した。
NF-κB 活性化により、血管内皮細胞における接着因子である VCAM-1、ICAM-1 が発現され、単球が血管内皮に接着しやすくなり、動脈硬化をうながしている(Komatsu.et al. Angiotensin Reserch.2004) 。動脈硬化モデルマウスに選択的 NF-κB 活性阻害剤 (dehydroxymethylepoxyquinomicin:DHMEQ)を投与し、動脈硬化の進展を抑制したとの報告がある（Chiba.et al. J Atherocler Thromb.2006）。我々は、移植腎の NF-κB の活性化が CAN の発生のキーであると考えた。

２．研究の目的

増加の一途をたどる慢性腎不全患者に対する治療のうち、患者の予後および QOL の改善さらに医療経済の点で透析に勝る腎移植であるが、長期生着率の向上が現在直面している最大の課題である。移植腎の長期生着を阻む最大の原因である慢性移植腎症(choronic/sclerosing allograft nephropathy:CAN)の要因のうち、非免疫学的機構の発症のメカニズムは解明されておらず、決定的な対応策も現在は存在しない。本研究では、移植腎での CAN 発症における Nuclear factor kappa-B(NF-κB) 活性化を証明し、選択的 NF-κB 活性阻害剤 (dehydroxymethylepoxyquinomicin:DHMEQ)を用い NF-κB 活性阻害を行うことで CAN を予防できるかを証明し、新しい予防戦略を提示するものである。

３．研究の方法

腎移植におけるCANの非免疫学的要因として、移植腎におけるNF-κBの活性化を調べるために、三つのモデルで検討する。
慢性シクロスポリン(CsA)腎症とは、CsA の長期投与による腎の細動脈 hyalinosis、縞状間質線維化、尿細管萎縮を特徴とする非免疫学的変化で、CAN の一因である。

(1) ラット慢性 CsA 腎症モデルの腎における NF-κB 活性化の確認および DHMEQ 投与による効果の検討：6 週齢の雄 SD ラット(200-240g)に１週間 0.01%NaCl 飼料（低 Na 食）を与える。ラットの左腎 2/3 腎摘を施行する。その１週間後に右腎摘をし、5/6 腎摘モデルとし、CsA を 15mg/kg/day 連日腹腔内投与を開始し、4 週間行う。5%グルコース投与群、CsA 投与群、CsA+DHMEQ 投与群(DHMEQ は 8mg/kg/day を腹腔内投与)の 3 群に分ける。4 週後に蓄尿、採血にて腎機能評価を行い、残腎を摘出し、組織学的評価、細胞障害評価、免疫組織学的評価、移植腎の NF-κB 活性化の評価を行う。

(2) 腎臓の糸球体足細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、遠位尿細管細胞それぞれの NF-κB を特異的に抑制したマウスを用いた CsA 腎症モデルでの NF-κB 抑制の局所効果の検討：我々は、上記マウスを作成可能である。CsA を 15mg/kg/day 連日腹腔内投与を 4 週間行い、上記(1)の実験と同様の評価を行う。

(3) ラット慢性移植腎症(CAN)モデルの腎における NF-κB 活性化の確認および DHMEQ 投与による効果の検討 ：吸入麻酔による全身麻酔下にドナーラット（雄 Fischer ラット 250-300g）に腹部正中切開を加え、片腎摘除を行う。摘除した腎臓は、同様の麻酔下にレシピエントラット（雄 Lewis ラット 250-300g）に腹部正中切開を加え、左側腎摘後にドナー腎血管と腹部大動静脈間の

端側吻合、尿管端端吻合を行う。術当日よりレシピエントラットに対し、低用量 CsA(5.0mg/kg)の注射投与を術当日より 10 日間施行し、術後 10 日目に再度麻酔下に右の自己腎摘を施行する。移植後 12 週から 16 週で慢性拒絶反応の所見が現れる(Hancock WH et al.Transplantation,1993)。レシピエントラットは、DHMEQ 非投与群に加え、DHMEQ8mg/kg/day を前期投与群（術後 11 日目より術後 16 週目）、後期投与群（術後 16 週目から 24 週目）、維持投与群（術後 11 日目より術後 24 週目）として腹腔内投与する。術後 4 週毎に蓄尿、採血にて腎機能評価を施行し、最終的に 24 週後に移植腎を摘出し、組織学的評価、細胞障害評価、免疫組織学的評価、移植腎内の NF-κB 活性化の評価を行う。コントロール群として Lewis ラット間の腎移植も施行し比較検討を行う。

４．研究成果

ラットの慢性シクロスポリン(CsA)腎症モデルおよび、選択的 NF-κB 阻害剤である DHMEQ(dehydroxymethylepoxyquinomicin) を投与したモデルを作成した。DHMEQ は、CsA 投与による腎皮質組織での NF-κB 活性化および核内移行を有意に妨げた。腎機能は、Control 群より CsA 群で有意に増悪し、CsA+DHMEQ 群で CsA 群より有意に改善した。一方、尿中蛋白は、Control 群より CsA 群は有意に低下し、CsA+DHMEQ 群は CsA 群と変化はなかった。腎皮質における MCP-1 および CCL5 の mRNA の発現は、Control 群より CsA 群は上昇し、CsA+DHMEQ 群は CsA 群より低下しており、マクロファージ、好中球の浸潤は、Control 群より CsA 群で有意に増加し、CsA+DHMEQ 群で CsA 群より有意に減少していた。
DHMEQ は、CsA が投与されたラットの腎臓において、NF-κB 活性化を抑制し、機能的障害、組織学的障害を軽減した。そのメカニズムとしては、マクロファージの活性化や走化性の亢進を促す MCP-1 を減少させたことによる間接的効果、以前の報告に示されたマクロファージの活性化や貪食能を抑えるという直接的効果による影響が考えられた。CsA は尿中蛋白流出を抑制することが報告されているが、DHMEQ 投与はその効果を変えなかった。本結果は、英語論文としてアクセプトされた。

腎臓局所細胞の NF-κβ抑制 CsA 腎症モデルを作成するのに際し、Control の CsA 腎症マウスモデル（腎臓局所細胞の NF-κβ抑制モデルがマウスモデルであるため）作成を試みたが、腎臓線維化が安定せず、ラット使用時のように有意差がでるモデルの作成には事業期間内に至らなかった。

またラットの慢性移植腎症モデルを作成も試みたもの事業期間内に安定したモデル獲得に至らなかった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Morita Shinya、Shinoda Kazunobu、Yoshida Tadashi、Shimoda Masayuki、Kanno Yoshihiko、Mizuno Ryuichi、Kono Hidaka、Asanuma Hiroshi、Nakagawa Ken、Umezawa Kazuo、Oya Mototsugu	４．巻 21
２．論文標題 Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor-κB inhibitor, prevents the development of cyclosporine A nephrotoxicity in a rat model	５．発行年 2020年
３．雑誌名 BMC Pharmacology and Toxicology	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40360-020-00432-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Shinya Morita
２．発表標題 Novel nuclear factor-κB activation inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, prevents the development of chronic cyclosporine nephropathy
３．学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020（国際学会）
４．発表年 2020年

〔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
研究分担者	篠田　和伸 (Shinoda Kazunobu) (60348737)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤） (32612)	
研究分担者	環　聡 (Tamaki Satoshi) (20626741)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員 (32612)	
研究分担者	吉田　理 (Yoshida Tadashi) (00306713)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	

6．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	高橋　遼平 (Takahashi Ryouhei) (90815367)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員 (32612)	

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