

公募助成「腎不全病態研究助成」研究サマリー

研究名	エリスロポエチンの腎保護作用における Nrf2 の関与についての検討
所属機関	京都府立医科大学大学院医学研究科 小児科学
氏名	西田 眞佐志
<p>【目的】エリスロポエチン (Epo) は主に腎尿細管間質細胞で生成される造血因子であり、その赤血球造血機能が注目されてきた。その後、神経細胞や心筋、腎などにおける臓器保護作用も有することが報告されてきたが、その機序の詳細については依然不明である。一方、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は近年明らかとなった抗酸化・抗炎症性遺伝子群の発現を包括的に制御している転写因子であり、マクロファージにおいて炎症性サイトカインの遺伝子発現を阻害することも報告され、抗炎症薬としての効果も注目されている。また Nrf2 と Epo の関連について、近年動物モデルにおいて、種々の神経細胞障害に対する Epo の Nrf2 を介する細胞保護作用が報告されており、さらに腎線維化の進展において、間質浸潤マクロファージに対して Epo および Nrf2 はともにマクロファージによる炎症性サイトカインの産生や、M1/M2 マクロファージなどの phenotype の変化などに影響する作用が報告されている。本研究ではマウス腎線維化モデルを用い、Epo の腎保護作用における Nrf2 の関与に焦点を当てて検討することを目的とする。</p> <p>【方法および結果】雄性C56BL/6 (10-12週齢) においてマウス片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction:UUO) を作成し、UUO後期 (day 7-13) にリコンビナント・ヒト・エリスロポエチン (Epo) 1000 U/kgの連日腹腔内投与を行い、生食投与群と比較して以下の検討を行った。</p> <p>① Epo 投与の腎線維化に対する影響：UUO day 14 においてマウスを sacrifice し、UUO 腎を摘出しホルマリン固定後腎パラフィン切片の Masson 染色を行い、Epo 投与の腎線維化に対する影響を検討した。Masson point count 法による間質 collagen index は、Epo 投与群ではコントロール群と比べ有意に減少していた。さらに UUO 腎凍結組織抽出液を用い、RP-HPLC 法により hydroxyproline 定量を行ったところ、Epo 投与群ではコントロール群と比べ腎組織中 hydroxyproline 量は有意に減少していた。以上より UUO 後期における Epo 投与により UUO 腎における腎線維化は有意に軽減することが明らかとなった。</p> <p>② Epo 投与の間質マクロファージ浸潤に対する影響：同様に UUO day 14 において、UUO 腎パラフィン切片を用い、抗 F4/80 抗体を用いた免疫染色を行った。F4/80 染色切片を用いて評価した間質浸潤マクロファージ数は、Epo 投与群ではコントロール群と比べ減少傾向を認めた。</p> <p>③ Epo 投与の Nrf2 産生能に対する影響：UUO day 14 において、UUO 腎組織より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により腎組織中 Nrf2 mRNA の発現を検討した。GAPDH mRNA に対する Nrf2 mRNA の比率については、両群間で有意差を認めなかった。</p> <p>④ Epo 投与の核内 Nrf2 量に対する影響：同様に UUO day 14 において、UUO 腎組織より核分画蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティングにより核内 Nrf2 蛋白の発現を検討した。Histone H3 に対する Nrf2 の比率についても、両群間で有意差を認めなかった。</p> <p>⑤ Epo 投与の腎組織 Keap1 量に対する影響：さらに UUO day 14 において、UUO 腎組織より蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティングにより Keap1 蛋白の発現を検討した。GAPDH に対する Keap1 の比率についても、両群間で有意差を認めなかった。</p> <p>今回の結果より Epo は腎線維化出現以降の UUO 後期からの投与でも腎線維化の進展抑制および軽減作用を有する可能性が示唆され、臨床応用を念頭に置いた場合、極めて重要な知見と考えられる。また、今回の検討では Epo の腎線維化抑制作用に Keap1-Nrf2 系の関与を示唆する結果は得られなかった。</p>	