APP-085 オステオポンチン中和抗体を用いた腎結石形成のメカニズムの解明と分子標的治療への応用

22 日 (金) ポスター会場 2

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野¹⁾, 北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野²⁾濱本 周造¹⁾, 安井 孝周¹⁾, 岡田 淳志¹⁾, 田口 和己¹⁾, 小島 祥敬¹⁾, 戸澤 啓一¹⁾, 佐々木 昌一¹⁾, 上出 利光²⁾, 郡 健二郎¹⁾

【背景・目的】腎結石形成には結石マトリックス成分の 1 つであるオステオポンチン (OPN) が強く関わっている。OPN は多くの機能的アミノ酸配列をもち、それらが切断や重合することにより生理活性を生じる。私たちは、結石形成マウスにおいて、非切断型 OPN は腎全体に分布しているが、切断型 OPN は結晶の形成に一致して腎皮髄境界部に発現するという興味深い現象を見つけた。この現象は、切断型 OPN が腎結石の形成に密接に関わっていることを示すものである。そこで本研究では、切断型 OPN にて露出されるアミノ酸配列 (SLAYGLR) に対する中和抗体を作成し、腎結石形成の抑制作用を検討した。【対象・方法】【35B6 抗体作成】OPN の SLAYGLR 配列を含んだ合成ペプチドで免疫されたマウスからモノクローナル抗体を作成した。【*In vitro* 実験】イヌ遠位尿細管上皮 (MDCK) 細胞に放射性同位元素 (14C) でラベルしたシュウ酸カルシウム (COM) 結晶を暴露し、抗体投与による結晶付着能の変化を定量的、形態学的に評価した。【*In vivo* 実験】8 週齢 C57BL/6 雄マウスの WT 群、抗体投与群、OPN ノックアウトマウス群 (KO 群) (各群 20 匹) を用意し、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 (100 mg/kg) を腹腔内連日投与した。抗体投与群には、0、3、6、9 日目に 35B6 抗体 (250、500、1000 µg/ml) を投与、WT 群、KO 群には、マウス IgG (500 µg/ml) を投与し腎組織を採取した。結晶形成の評価は、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて行った。非切断型 OPN、切断型 OPN の発現は、免疫染色、western blotting 法、定量 RT-PCR を用い評価した。【結果】【*In vitro* 実験】尿細管細胞に COM 結晶を暴露すると、細胞に結晶が取り込まれ、形態は膨化し崩壊するものの、OPN 抗体投与により、結晶の尿細管細胞への接着、細胞の崩壊が抑制された。【*In vivo* 実験】結晶形成量は、WT 群で最も多く、抗体投与により容量依存性に低下した。特に 500、1000 µg/ml 抗体投与においては、有意に結晶形成が抑制された。結晶の微細構造は、WT 群では結晶が整然と放射状に成長し花弁状構造を示しており、KO 群では小さな結晶核が不規則に集まる形態を示した。抗体投与群では、結晶は放射状に形成されるも、内部が細かく砕けていた。透過型電子顕微鏡による尿細管細胞の構造は、WT 群では管腔が拡張し、尿細管細胞に取り込まれる結晶を認めたが、抗体投与群、KO 群においては、尿細管腔内に脱落組織は認められるものの、結晶形成は認めなかった。【考察】切断型 OPN に対する中和抗体を用い、結晶の尿細管上皮への接着を抑制することで、結石形成を抑制することに成功した。今後この研究成果を用い、分子標的治療の臨床応用ができると考えた。

APP-086

22 日 (金) ポスター会場 2

ラット 5/6 腎摘モデルにおける腎不全発症機序と carbamylated erythropoietin (CEPO) の腎保護作用に関する検討

大阪府立急性期・総合医療センター泌尿器科¹⁾, 大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学²⁾, Department of Nephrology, Indiana University³⁾, 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 (泌尿器科学)⁴⁾, 大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学⁵⁾今村 亮一¹⁾, 谷川 剛¹⁾, 藤田 和利¹⁾, 細見 昌弘¹⁾, 山口 誓司¹⁾, 猪阪 善隆²⁾, Ruben M Sandoval³⁾, Bruce A Molitoris³⁾, 野々村 祝夫⁴⁾, 高原 史郎⁵⁾

【背景】Erythropoietin (EPO) は、造血作用のみならず、腎、心、神経組織をはじめとする諸臓器に対し保護作用を持つとの報告が散見される。しかし保護作用を誘導するには高用量の EPO 投与を必要とするため、多血症および付随合併症を誘発することは否定しえない。近年 EPO 受容体が造血作用を誘導するものと組織保護作用を誘導するものでは異なることが報告された。また EPO を carbamylation (carbamylated erythropoietin; CEPO) すると組織保護受容体に高親和性を呈することが報告された。われわれはラット慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘モデルに CEPO を投与し、保護作用に関し検討した。【方法】6 週齢雄性 SD ラットを 3 群に分類し、それぞれコントロール群、EPO 群、CEPO 群とした。5/6 腎摘施行 1 週間後より、コントロール群には 1ml の生理食塩水、EPO、CEPO 群にはそれぞれ 1000 単位/Kg の EPO および CEPO を週 1 回皮下投与した。投与開始 4 週間および 8 週間後に各パラメータを検討した。また 2-photon microscopy を用い、腰部縦切開創から体外へ導いた生体ラットの腎を直接顕微鏡下に観察し、その傷害抑制の程度、peritubular capillary の血流傷害、尿細管傷害等もあわせて検討した。【結果】血清 Cr 値は EPO、CEPO 群で有意に抑制されていた。またコントロール群に比し、両群において尿細管上皮細胞の apoptosis の抑制、間質の fibrosis の抑制を認めた。一方、EPO 群と異なり CEPO 群では Hb の上昇は認めなかった。コントロール群では peritubular capillary の血流は著明に低下し、血流傷害領域、尿細管傷害領域は有意に拡大しており、尿細管腔内には cast を多数認めた。【結論】慢性腎不全の発症機序として、これまで糸球体の hyperfiltration が報告されてきた。今回生体ラット腎に対し 2-photon microscopy を用いてリアルタイムに観察することにより、peritubular capillary の血流傷害、尿細管傷害も一因である事が示唆され、腎不全治療に対する新たな試みの一助となりうると思われた。また CEPO 投与により、造血効果を認めることなく慢性腎障害に対する保護効果を認めた。CEPO 投与が腎不全の進行を抑制しうることが示唆された。