

氏名・(本籍)	山本 竜平 (神奈川県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1036 号
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Treg expansion with trichostatin A ameliorates kidney ischemia/reperfusion injury in mice by suppressing the expression of costimulatory molecules (マウス腎虚血/再灌流障害モデルにおける制御性 T 細胞の腎保護効果の検討)
論文審査委員	(主査) 山本 雄造 教授 (副査) 海老原 敬 教授 高橋 直人 教授

学位論文内容要旨

論文題目

Treg expansion with trichostatin A ameliorates kidney ischemia/reperfusion injury in mice by suppressing the expression of costimulatory molecules

マウス腎虚血／再灌流障害モデルにおける制御性 T 細胞の腎保護効果の検討

申請者氏名 山本竜平

研究目的

虚血／再灌流障害 (Ischemia / Reperfusion Injury, IRI) による臓器障害は、活性酸素やフリーラジカル産生による直接的機序に加え、血管内皮細胞障害、微少循環障害に伴う炎症細胞浸潤による過剰免疫応答が関連している (Hercule A et al, J Pharmacol Exp Ther 2002)。制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg) は過剰な免疫応答を制御する機能を有することから、Treg を増幅することは臓器 IRI の治療として有用な可能性が示唆されており (Lai LW et al, Kidney Int 2012)、薬剤で特定の経路を抑制する手法よりも理にかなっている。

一方、IRI 臓器の血管内皮細胞上では CD80、CD86、ICAM-1 などの免疫関連抗原分子の発現強度が亢進し、炎症細胞浸潤、ひいては臓器機能の低下をもたらす事が報告されている (Kojima N et al, Hepatology 2001, Satoh S et al, Lab Invest 2002, Saito M et al, Arch Histol Cytol 2005)。Treg は CTLA-4 と競合的に CD80・86 に結合し、免疫応答の促進を防ぐことから、我々は Treg の臓器 IRI に対する保護効果は免疫関連抗原分子の発現亢進を抑制することと関連していると仮説を立てた。

本研究では、自己の Treg を内因性に増幅することで腎 IRI に対して腎保護効果を発揮できるか、また免疫関連抗原分子の発現との関連性を検証することを目的とした。

研究方法

1) C57BL/6 マウス (10-12 週齢) の左腎動静脈を血管鉗子で遮断し、30 分経過した後に遮断を解除すると同時に右腎を摘出するマウス腎 IRI モデルを作成した。

2) ヒストン脱アセチル酵素阻害薬である Trichostatin A (TsA) を投与し、フローサイトメトリーを用いて脾臓での Treg 分画 (CD4(+)Foxp3(+)) の割合が増加、すなわち Treg が増幅される (Liesz A et al, J Neurosci 2013) ことを確認し、また、PC61 (抗 CD25 抗体) を投与し Treg が減少することを確認した。

3) Treg が増幅している治療群 (TsA 群)、コントロール群 (DMSO 群)、TsA+PC61 群、DMSO+PC61 群の 4 群に分け、それぞれに IRI を起こし、クレアチニン、抗炎症性・炎症性サイトカイン (IL-10, TGF- β , IL-6 など) の血中濃度を経時的に ELISA で測定し比較した。また IRI 後の左腎を摘出して PAS 染色を行い、病理学的に組織障害の評価を行った。さらに IRI 後の左腎・脾臓における抗炎症性・炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルを半定量し比較した。

4) 4 群間で IRI 腎での免疫関連抗原分子 (CD80, CD86, ICAM-1) の発現を mRNA レベル・蛋白レベル (ウエスタンブロット) で比較した。

5) 4 群間で IRI 腎での炎症細胞浸潤を評価する目的で CD45 免疫染色を行い、単位面積当たりの陽性細胞数を測定して比較した。

研究成績

IRI 後早期の腎機能障害は、DMSO 群と比較して、TsA 群で血清学的 (クレアチニン濃度) にも組織学的 (ATN score) にも有意に軽減されていた。

腎 IRI 後の血清サイトカイン濃度の検討では、抗炎症性サイトカインである IL-10 の血中濃度は DMSO 群と比較して TsA 群で有意に上昇し、炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度は DMSO 群と比較して TsA 群で有意に低下していた。また、腎・脾臓での mRNA 発現レベルの検討では、DMSO 群と比較して TsA 群で IL-10、TGF- β の mRNA 発現が有意に亢進し、炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA 発現が有意に低下していた。

免疫関連抗原分子である CD80、CD86、ICAM-1 の mRNA・蛋白発現レベルの検討では、DMSO 群と比較して TsA 群でいずれもその mRNA 発現レベルは低下し、また蛋白発現レベルにおいても TsA 群で CD86、ICAM-1 の発現は低下していた。

さらに IRI 後 2 日目の腎での CD45 免疫染色で炎症細胞数の評価では、DMSO 群と比較して TsA 群では炎症細胞浸潤が有意に減少していた。

これらの TsA 投与による効果は PC61 投与により相殺されたことから、TsA 投与による IRI 後の腎保護作用は Treg 依存性であると考えられた。

結論

TsA 投与による内因性の Treg の増幅は、抗炎症性サイトカイン増加と炎症性サイトカイン減少に関与し、腎 IRI 後の免疫関連抗原分子の発現亢進を抑制することで、炎症細胞浸潤を軽減し、IRI 後早期の腎保護効果を発揮できる可能性がある。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：山本 雄造

申請者：山本 竜平

論文題名：Treg expansion with trichostatin A ameliorates kidney ischemia/reperfusion injury in mice by suppressing the expression of costimulatory molecules (マウス腎虚血/再灌流障害モデルにおける制御性T細胞の腎保護効果の検討)

要旨

急性腎機能障害は様々な場面で合併症や患者死亡の原因となっている。この急性腎機能障害発生の大きな要因の1つに虚血再灌流障害があげられる。虚血再灌流障害の発生機序には活性酸素種による直接的な障害に加えて、血管内皮細胞障害、微小循環障害に伴う炎症性細胞浸潤が引き起こす過剰免疫応答が働いている事から、制御性T細胞を増幅させる事が虚血再灌流障害の抑制に効果を発揮できる可能性が示されている。一方で、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤の1つであるTrichostatin A が制御性T細胞の数を増幅し、その作用も増強するとの報告がなされている。本研究では、この観点に立ち、Trichostatin A の投与が腎虚血再灌流障害を有意に抑制する事をマウスモデルを用いて実証している。実際にTrichostatin A の投与下では自己の制御性T細胞が内因性に増幅され、抗炎症性サイトカインは増加、炎症性サイトカインは減少する現象がみられ、免疫関連抗原分子の発現も抑制されていることを証明した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の適切さは以下の通りである。

1) 斬新さ

古くから諸臓器において虚血再灌流障害を抑制するための戦略は数多く研究されているが、その多くは炎症反応の進行を特定の経路を遮断する事で制御しようとするものである。しかし、本研究では内因性の制御性T細胞数を増幅する事により、過剰な免疫応答が生じるのを抑制するという新規の方策を打ち出している。

2) 重要性

腎の虚血再灌流障害に基づく急性腎機能障害は腫瘍切除のみならず、腎移植においても術後の腎機能に大きく影響を与える。また、腎の虚血再灌流障害によって惹起される生体の炎症性変化は多臓器での炎症性障害と絡み合って生じ、相互に作用しうる。本研

究はin vivoで行われており、ここで得られた知見は全身臓器での生体反応として受け止める事ができる。また、今回の研究でみられた障害抑制効果はヒストン脱アセチル酵素阻害剤による制御性T細胞の増幅によって得られたものであり、同様の処置で心、肝、小腸などにおいても虚血再灌流障害を抑制できる可能性を示すものであり、移植医療をはじめとする様々な外科系医療の分野に貢献する公算が高い。

このように本研究は今後も種々の分野で医学の発展に貢献するであろうことが期待される。

3) 実験方法の正確性

動物モデルは30分の腎虚血再灌流障害を使用し、再灌流時に対側腎の摘出も行うという標準的なモデルを採用している。Trichostatin A 投与後の制御性T細胞数の増減はフローサイトメトリーでCD4(+)Foxp3(+)分画として確認され、コントロール以外に制御性T細胞除去抗体であるPC61(抗CD25抗体)による阻害実験も適切に行われている。虚血再灌流障害に至るまでの経路にある炎症性サイトカイン量の変化、病理所見、CD45免疫染色による炎症性細胞浸潤の程度の評価といった一般的な項目のみならず、腎局所および脾臓（全身）において抗炎症性・炎症性サイトカイン発現量がmRNAレベルで半定量されている。これらに及ぼされる変化がTrichostatin A の直接効果でなく、制御性T細胞の増幅によるものであることを裏付けるために、免疫関連抗原分子である、CD80、CD86、ICAM-1のmRNA・蛋白発現も検討され、Trichostatin A 群でいずれも低下している事が示され、さらには制御性T細胞除去抗体でこれらの分子が通常よりも増加する事も合わせて検討されている。

4) 表現の明瞭さ

研究課題の焦点、解決のための動物モデルの作成法、実験結果、考察が詳細かつ明瞭に、しかも簡潔に述べられている。

したがって、本論文は秋田大学博士（医学）の学位論文として価値あるものと認め

る。なお、本学位授与申請者は、令和3年2月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。