The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Y-27632, a specific inhibitor of ROCK, prevented tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction
Author(s)	長門谷, 克之
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43745
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【16】

氏　　名	長門谷　克　之（ながとや　かつゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16813　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学　位　論　文　名	Y-27632, a specific inhibitor of ROCK, prevented tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction （特異的 ROCK 阻害剤 Y-27632による一側尿管結紮腎モデルマウスにおける腎間質線維化抑制効果の検討）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　堀　　正二 （副査） 教　授　安東　明夫　　教　授　祖父江憲治

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

進行性腎障害の予後規定因子として尿細管・間質の線維化は糸球体障害以上に重要であるとする報告もみられ、間質線維化の機序を解明し、新たな治療法を確立することは重要である。間質の障害に関与するものとしては、これまでTGF-β、PDGFなどの増殖因子、マクロファージの浸潤などが挙げられているが、詳細な分子機序は未解明の部分が多い。我々は平滑筋収縮、細胞接着、細胞質分裂、細胞周期、細胞遊走などに関与するRas関連低分子G蛋白Rho及びその下流のeffector物質のひとつであるRho-associated coiled-coil forming protein kinase（ROCK）が腎線維化過程に関与するとの可能性に着目した。今回我々は特異的なROCK阻害薬であるY-27632を用いてRho-ROCK系のシグナル伝達を遮断することでRho-ROCK系の間質線維化への関与を検討し、その間質線維化治療のターゲットとしての意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】

＜*in vivo* の系＞

代表的な腎間質線維化モデルである一側尿管結紮（UUO）モデルマウスを用いた。オス5週齢のBDF1マウスを未治療群とY-27632治療群に分け、Y-27632治療群には一側尿管結紮術2日前より検体採取時まで、Y-27632を200 mg/lの濃度で飲料水に加え投与した。全マウスに対し左尿管結紮術を施行し術後4、10日後に摘出した腎の一部を用い免疫組織染色（平滑筋αアクチン、F4/80）、マッソントリクロム染色を施行し、腎皮質領域間質の傷害をコンピュータ画像解析にて定量化した。残りの腎よりRNAを抽出し、ノザンブロット（I型コラーゲン、平滑筋αアクチン、TGF-β、オステオポンチン、MCP-1、ICAM-1）を行い、コンピュータ画像解析にて定量化した。

＜*in vitro* の系＞

①培養腎線維芽細胞における平滑筋αアクチンの遺伝子発現をノザン法にて評価しY-27632が直接myofibroblastへの形質変換に関与するか検討した。腎線維芽細胞の採取はMullerらの方法に従った。

②細胞数を評価する方法であるMTT取り込み法によりY-27632の10%fetal calf serum刺激下での培養腎線維芽細胞に対する細胞増殖抑制効果を検討した。

③マウスマクロファージ RAW264.7を用いて Boyden chamber による migration assay にて MCP-1刺激下における Y-27632での24時間の細胞遊走抑制効果を検討した。光学顕微鏡下（400倍）で遊走した細胞の全細胞に対する割合を計数し定量化した。

【成績】

＜*in vivo* の系＞

①myofibroblast に対する Y-27632の影響（平滑筋αアクチンの検出）

平滑筋αアクチンは、細胞増殖や細胞外基質産生に重要な役割を果たす myofibroblast の代表的なマーカである。非結紮腎において、平滑筋αアクチンの発現は血管壁にのみ認められるが、結紮腎においては間質全体に強い発現が認められた。Y-27632治療群において平滑筋αアクチン陽性部分は減少し、コンピュータ画像解析においてその面積率は未治療群の50%に抑制された。

②マクロファージ出現に対する Y-27632の影響（F4/80陽性細胞の検出）

マクロファージの浸潤は線維化の進展に重要な役割を果たすと考えられており、マウスマクロファージの代表的なマーカとして F4/80が挙げられる。F4/80の免疫組織染色において未治療群ではボーマン嚢周囲や尿細管周囲に顕著な F4/80陽性部分を認めたが、Y-27632治療群では F4/80陽性部分は軽度であり、コンピュータ画像解析においてその面積率は未治療群の51%に抑制された。

③腎間質繊維化に対する Y-27632の影響（マッソントリクロム染色）

マッソントリクロム染色においてアニリンブルーで染色される部分は膠原線維などの線維成分を表す。非結紮腎において、アニリンブルーで染色される線維化部分はほとんど認めないが、結紮腎においては間質に広範に線維化を認める。Y-27632治療群においては間質線維化病変は軽減し、コンピュータ画像解析においてその面積率は未治療群の47%に抑制された。

④線維化に関与する遺伝子発現に対する Y-27632の影響（Ⅰ型コラーゲン、平滑筋αアクチン、TGF-β、オステオポンチン、MCP-1、ICAM-1のノザンブロット）

ノザンブロットにおいて Y-27632治療群では未治療群に比較しⅠ型コラーゲンの遺伝子発現を一側尿管結紮術後4日で29%、10日で44%、平滑筋αアクチンの発現を一側尿管結紮術後4日で26%、10日で41%、TGF-βの発現を一側尿管結紮術後4日で26%、10日で41%抑制した。しかし、代表的なマクロファージのケモカインであるオステオポンチン、MCP-1、ICAM-1の遺伝子発現は Y-27632治療群においても抑制されなかった。

＜*in vitro* の系＞

①腎線維芽細胞における Y-27632の形質変換抑制効果

培養腎線維芽細胞より抽出した RNA を用いて平滑筋αアクチンのノザンブロットを施行したところ、Y-27632は濃度依存性に平滑筋αアクチンの遺伝子発現を抑制した。

②細胞増殖抑制効果に対する Y-27632の影響

培養腎線維芽細胞を用いた MTT 取り込み法では Y-27632は200μM の濃度においても細胞増殖抑制効果を認めず、2 mM の濃度において細胞毒性を呈した。

③細胞遊走抑制効果に対する Y-27632の影響

24時間の MCP-1（2.5ng/ml 及び25ng/ml）刺激下でのマクロファージの遊走が Y-27632の投与により濃度依存性に抑制された。

【総括】

腎間質線維化病変形成への低分子G蛋白 Rho-ROCK 系の関与が示唆され、この系の制御が腎間質線維化治療の新たなアプローチとなる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

進行性腎障害の予後規定因子のひとつに間質線維化が挙げられ、いかに間質の線維化を抑制するかが重要である。長門谷克之君は、Ras 関連低分子G蛋白 Rho 及びそのエフェクター分子の ROCK に着目し、特異的 ROCK 阻害薬を用いて間質線維化過程における Rho-ROCK 系の意義を明らかにし、更に Rho-ROCK 系が腎障害進展治療のターゲットとなる可能性を検討した。

代表的な腎間質線維化モデルである一側尿管結紮腎マウスを用い特異的 ROCK 阻害剤である Y-27632の投与により腎線維化に密接に関わりのある myofibroblast の出現、マクロファージの浸潤が組織学的に抑制され間質線維化が軽減されること、ノザン法による検討で線維化に密接に関わる1型コラーゲン、平滑筋αアクチン、TGF-βの遺伝子発現が Y-27632の投与により抑制されることを示した。

またマクロファージのケモカインである MCP-1の存在下においても Y-27632がマクロファージの遊走を抑制することから Y-27632のマクロファージ浸潤抑制効果の機序として細胞遊走抑制効果が考えられることを示した。

以上、進行性腎障害における予後規定因子である間質線維化進行における Rho-ROCK 系の意義を解明し、その阻害薬を用いてこの系を制御するという治療への可能性を示した点で、長門谷君の研究は非常に意義深いものであり、学位に値するものと考えられる。