

論文の要旨

申請者 升 永 綾 子

研究論文題目

閉塞性腎症におけるニコランジルの効果に関する検討

1 目 的

閉塞性腎症（Unilateral Ureteral Obstruction; UUO）とは、尿管閉塞による水腎症が原因で腎線維化をきたす病態である。我々は冠血管拡張薬として臨床的に使用されているニコランジルを用い、UUO の腎障害に与える影響について検討した。

2 対象並びに方法

（実験 1）SD/SPF ラットを用い、DMSO 腹腔内投与群（コントロール群）、ニコランジル腹腔内投与群（ニコランジル群）、ニコランジル腹腔内投与＋L-NAME 皮下投与群（NL 群）の 3 群で、3 日間薬剤を投与し最終日に 24 時間尿を採取した。（実験 2）上述の 3 群で検討した。ラットの左尿管を結紮し、結紮 2 日前から 13 日目まで薬剤を連日投与した。14 日目に両側腎の摘出を行い、腎組織の保存とパラフィン包埋切片の作成を行った。尿中 NO の測定は Griess 反応を用い測定した。組織 TGF- β 1 の測定は ELISA 法で行った。組織標本を用い、腎の線維化、尿細管アポトーシス、マクロファージの浸潤、NOS の発現を免疫組織染色で評価した。また、腎組織中の酸化ストレスマーカーの発現を組織標本およびウエスタンブロット法を用いて評価した。

3 成 績

実験 1 では、ニコランジル投与による尿中 NO の上昇、L-NAME による NO の減少を確認した。実験 2 においては UUO モデルで検討を行った。コントロール群と比較しニコランジル群では間質線維化の減少（Masson's trichrome 染色で評価）及び線維芽細胞（FSP-1 染色で評価）の有意な減少を認めた（Masson: 59.9 ± 0.2 vs. $36.3 \pm 3.2\%$, FSP-1: 98.6 ± 9.3 vs. 67.0 ± 5.3 cells/hpf）。NL 群ではニコランジル群と比較し、これらの間質線維化の指標は増加した（Masson: $63.1 \pm 3.0\%$, FSP-1: 83.9 ± 3.8 cells/hpf）。尿細管アポトーシス（ssDNA 染色で評価）は、コントロール群と比較しニコランジル群で有意に低値であった（ 217.7 ± 7.8 vs. 26.5 ± 3.0 nuclei/hpf）。NL 群ではニコランジル群と比較し有意に高値であった（ 67.3 ± 9.0 nuclei/hpf）。マクロファージの浸潤（CD68 陽性細胞数で評価）は、コントロール群と比較しニコランジル群では低値であった（ 56.7 ± 0.4 vs. 28.6 ± 4.1 cells/hpf）。NL 群ではニコランジル群と比較し有意に高値であった（ 67.5 ± 3.4 cells/hpf）。NOS の発現を検

討したところ、コントロール群と比較しニコランジル群では血管内皮細胞に endothelial NOS(eNOS)発現の亢進を認めた。次に、本モデルにおいてニコランジルが腎組織中の TGF- β 1 に与える影響について検討した。閉塞腎組織中の TGF- β 1 量は、コントロール群と比較しニコランジル群において有意に低値であった (11.3 ± 1.62 vs. 6.31 ± 1.79 pg/mg tissue)。さらに、本モデルにおいてニコランジルの抗酸化作用について検討した。DNA 酸化ストレスマーカー (8-OHdG 染色) は、コントロール群と比較しニコランジル群で有意に低値であった (348.1 ± 32.1 vs. 11.6 ± 3.8 nuclei/hpf)。また、閉塞腎組織のウエスタンブロット法において、コントロール群と比較してニコランジル群では酸化ストレス反応酵素である hemeoxygenase (HO)-1 の発現の低下を認めた。また、同様にタンパク質酸化マーカーであるジチロシンの発現の低下を認めた。

4 考 察

本研究では、ニコランジル投与により尿中 NO の産生が増加した。その機序については、実験 2 の免疫染色において、ニコランジル投与群の血管内皮における eNOS の発現が上昇しており、ニコランジルが血管内皮細胞の eNOS 発現を上昇させることにより腎 NO 産生を増加させる可能性が示された。

ニコランジルは抗線維化作用、抗アポトーシス作用、抗マクロファージ浸潤作用を有することが確認された。ニコランジルによるこれらの効果が NOS 阻害薬である L-NAME によって減弱されたため、ニコランジルの腎保護作用の機序の一部は NO 産生を介した作用であると考えられた。NL 群のデータからは、ニコランジルの抗線維化作用や炎症細胞浸潤抑制作用における NO の作用は比較的大きい可能性があると思われた。一方、抗アポトーシス作用についてはニコランジルによる効果は著明であり、NO 産生を介した作用だけでは説明できない。NO 産生を介した作用以外にも、TGF- β 1 産生抑制作用や抗酸化作用などによる腎保護作用が影響しているものと推察された。

5 結 論

ニコランジルは、腎 NO 産生増加作用、腎 TGF- β 1 産生抑制作用、抗酸化作用を有し、腎間質の線維化、尿細管アポトーシス、マクロファージの浸潤を抑制した。ニコランジルによる NO 産生の起源として、血管内皮細胞における eNOS 発現上昇が関与しているものと考えられた。ニコランジルはこれらの作用を介した腎保護作用を有し、閉塞性腎症の治療薬として有望と考えられた。