

Treatment with anti-TGF- β antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- β signaling

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 深澤, 洋敬 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1267

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 1 4 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	深 澤 洋 敬		
論文題目	Treatment with anti-TGF-β antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-β signaling (抗 TGF-β 抗体を用いた治療は Smad/TGF-β シグナルを抑制することにより慢性進行性腎炎を改善する)		

論文題目

Treatment with anti-TGF- β antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- β signaling

(抗 TGF- β 抗体を用いた治療は Smad/TGF- β シグナルを抑制することにより慢性進行性腎炎を改善する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Transforming growth factor- β (TGF- β) は腎炎の進展過程において重要な役割を果たすことが知られており、TGF- β の細胞内シグナル伝達物質として Smad が報告されている。しかし、腎炎における Smad の関与は十分解明されていない。また、TGF- β に対する中和抗体 (抗 TGF- β 抗体) の投与により腎障害が軽減することが、可逆性の腎炎モデルで報告されているが、進行性の腎炎モデルにおける抗 TGF- β 抗体投与の効果は明らかとなっていない。今回、ラット慢性進行性腎炎モデルを作製し抗 TGF- β 抗体投与による腎障害の軽減効果および TGF- β シグナル伝達の検討をおこなった。

[材料ならびに方法]

雄性 Wistar ラットにヒツジ由来抗ラット胸腺血清 (1.5ml) を 2 回 (第 0 および第 7 病日) 尾静脈より投与し進行性腎炎を惹起した。また同量のリン酸緩衝液を投与したラットを非腎炎群とした。第 7 病日からマウスモノクローナル抗 TGF- β 抗体または型の一致したマウスモノクローナル免疫グロブリン (IgG) を、週 2 回の投与回数で 4 週間 (第 7 病日から第 35 病日まで) 腹腔内投与した。各々の群において第 14、28、56 病日に体重を測定、血清採取後に屠殺し、腎臓を摘出、一部を 4% パラホルムアルデヒドで固定、残りの腎臓を凍結保存して以後の検討をおこなった。

尿蛋白: ピロガールレッド法で測定。

血清尿素窒素: 自動酵素分析器で測定。

腎組織障害: Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い、障害の程度を 0~3 の 4 段階評価でスコア化し半定量した。

免疫組織染色: I 型コラーゲン、リン酸化 Smad2/3、TGF- β II 型受容体。

ウェスタンブロット法: 腎臓の蛋白抽出液を用いてプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1)、TGF- β II 型受容体、Smad2、Smad3、Smad4 の検討を行った。更に腎臓の核蛋白抽出液を用いてリン酸化 Smad2/3 も検討した。

定量的 PCR: 腎臓より mRNA を抽出し逆転写後、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、I 型コラーゲン、PAI-1 及び内部標準として GAPDH をリアルタイム PCR 法で検討した。

ゲルシフトアッセイ法: 腎臓より核蛋白を抽出し、標的遺伝子である PAI-1 のプロモーター領域に存在する Smad 結合部位に対応するオリゴヌクレオチドを放射線ラベルし、腎臓核蛋白との結合を検討した。

[結果]

IgG 投与腎炎群では、腎内の TGF- β 1 および TGF- β 2 mRNA 発現が IgG 投与非腎炎群に

比し有意に増加していた（それぞれ 2.3 倍、2.7 倍）が、抗 TGF- β 抗体投与腎炎群ではそれらの発現増加が有意に抑制されていた。腎内 TGF- β 3 mRNA 発現は各群で差を認めなかった。尿蛋白は腎炎惹起後、徐々に増加傾向を示したが抗 TGF- β 抗体投与腎炎群では第 28 病日以後、有意に尿蛋白は抑制された（第 56 病日の尿蛋白排泄量は IgG 投与腎炎群: 142 ± 9 mg/日、抗 TGF- β 抗体投与腎炎群: 38 ± 8 mg/日、 $p < 0.05$ ）。また、腎炎群における組織障害度、腎内 I 型コラーゲン沈着、PAI-1 産生は抗 TGF- β 抗体投与によりそれぞれ減弱した。腎炎群ではウェスタンブロット法、免疫組織染色による検討でリン酸化 Smad2/3 の核への分布が増加していたが、抗 TGF- β 抗体投与により減少した。さらにゲルシフトアッセイ法により、腎炎群では非腎炎群に比し Smad 結合領域への核蛋白結合能は亢進しており、抗 TGF- β 抗体投与により減弱した。

[考察]

今回、抗 TGF- β 抗体の投与による進行性腎障害の軽減効果を示した。また、腎炎群では活性型であるリン酸化 Smad2/3 の核への分布が増加しており、更に標的遺伝子の Smad 結合領域への核蛋白結合能も亢進していた。つまり腎炎群では腎内 Smad/TGF- β シグナル伝達が増加していることが示唆されたが、抗 TGF- β 抗体の投与によりいずれも低下したため、腎障害の軽減機序に Smad/TGF- β シグナルの抑制が関与していると推察された。

[結論]

ラット進行性抗胸腺血清腎炎において、Smad を介した TGF- β 細胞内シグナル伝達は増加していた。また、抗 TGF- β 抗体の投与により腎障害は軽減した。腎炎の改善機序として、Smad を介したシグナル伝達の抑制が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Transforming growth factor- β (TGF- β) は腎炎の進展過程において重要な役割を果たすことが知られており、TGF- β の細胞内シグナル伝達物質として Smad が報告されている。しかし、腎炎における Smad の関与は十分解明されていない。また、可逆性の腎炎モデルで TGF- β に対する中和抗体（抗 TGF- β 抗体）の投与により腎障害が軽減するという報告がされている。申請者はこれらを背景とし、新たに進行性の腎炎モデルにおける抗 TGF- β 抗体投与効果を明らかにしようと以下の実験を行った。

[材料ならびに方法]

雄性 Wistar ラットにヒツジ由来抗ラット胸腺血清 (1.5ml) を 2 回（第 0 および第 7 病日）尾静脈より投与し進行性腎炎を惹起した。また同量のリン酸緩衝液を投与したラットを非腎炎群とした。第 7 病日からマウスモノクローナル抗 TGF- β 抗体又は型の一致したマウスモノクローナル免疫グロブリン (IgG) を、週 2 回、4 週間（第 7 病日から第 35 病日まで）腹腔内投与した。各々の群において第 14、28、56 病日に体重を測定、血清採取後に屠殺し腎臓を摘出、一部 4% パラホルムアルデヒドで固定、残りの腎臓を凍結保存して以後の検討をした。

尿蛋白: ピロガールレッド法で測定。

血清尿素窒素: 自動酵素分析器で測定。

腎組織障害: Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い、障害の程度を 0~3 の 4 段階評価でス

コア化し半定量した。

免疫組織染色: I 型コラーゲン、リン酸化 Smad2/3、TGF- β II 型受容体。

ウェスタンブロット法: 腎臓の蛋白抽出液を用いてプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1)、TGF- β II 型受容体、Smad2、Smad3、Smad4 の検討を行った。更に腎臓の核蛋白抽出液を用いてリン酸化 Smad2/3 も検討した。

定量的 PCR: 腎臓より mRNA を抽出し逆転写後、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、I 型コラーゲン、PAI-1 及び内部標準として GAPDH をリアルタイム PCR 法で検討した。

ゲルシフトアッセイ法: 腎臓より核蛋白を抽出し、標的遺伝子である PAI-1 のプロモーター領域に存在する Smad 結合部位に対応するオリゴヌクレオチドを放射線ラベルし、腎臓核蛋白との結合を検討した。

[考察]

これらの結果をふまえて、申請者は、抗 TGF- β 抗体の投与は進行性腎障害の軽減効果があること、また、その機序としては腎炎群では活性型であるリン酸化 Smad2/3 の核への分布が増加しており、更に標的遺伝子の Smad 結合領域への核蛋白結合能も亢進している。つまり腎炎群では腎内 Smad/TGF- β シグナル伝達が増加しているが、抗 TGF- β 抗体の投与によりいずれも低下することと考察し、腎障害の軽減機序に Smad/TGF- β シグナルの抑制が関与していると推察した。

[結論]

申請者は、結論として、ラット進行性抗胸腺血清腎炎における Smad を介した TGF- β 細胞内シグナル伝達は増加と抗 TGF- β 抗体の投与による腎障害は軽減を示し、腎炎の改善機序として、Smad を介したシグナル伝達の抑制が関与していることを示唆した。

本研究について審査委員会では以下の試問を行った。

- 1) 種々の腎炎モデルと本モデルとの異同について
- 2) 糖尿病腎症モデルラットとの異同について
- 3) IgG にして 2mg という抗体の投与量をどうやってきめたのか
- 4) 抗体投与ラットの体重減少の理由はなにか、食餌量の測定をしたか
- 5) 計測した指標の経時的変化はどうか
- 6) Autoinduction の機構をどのように想定しているか
- 7) 用いた組織学的腎炎評価のシステムはヒトでも実用的なものか
- 8) DNA 結合によるゲルシフトをみたときの細胞核の分離方法について
- 9) TGF- β 抗体の効果はどのくらいの期間追跡したか
- 10) TGF- β 値は血中、尿中どうであったか

これらに対し、申請者の回答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶 村 春 彦

副査 中 村 浩 淑 副査 鈴 木 和 雄