

氏 名	藤井 裕子
(ふりがな)	(ふじい ゆうこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1176号
学位審査年月日	令和2年7月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Efficacy of a mitochondrion-targeting agent for reducing the level of urinary protein in rats with puromycin aminonucleoside-induced minimal-change nephrotic syndrome (ピューロマイシン腎症ラットにおけるミトコンド リア特異的抗酸化剤による蛋白尿減少効果)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 森 龍彦 教授 矢野 貴人

学位論文内容の要旨

《背景》

微小変化型ネフローゼ症候群 minimal-change nephrotic syndrome (MCNS) は小児に好発し、発症要因として糸球体ポドサイトにおける酸化ストレスの関与が示唆されている。しかしながら、ミトコンドリアに限局した酸化ストレスとの関連は明らかではない。MCNSのモデルラットを用いて、ポドサイト内のミトコンドリア障害の評価を行った。また、ミトコンドリアを標的としたラジカルスカベンジャー (MitoTEMPO) による蛋白尿減少効果について検討した。

《方法》

6週齢の雄の Wistar ラット (n=30) を、①生理食塩水 (NS) のみ投与群 (NS 群: n=7)、

②ピューロマイシンアミノヌクレオシド puromycin aminonucleoside (PAN) のみ投与群 (P 群: n=12)、③PAN 投与+MitoTEMPO 投与群 (PT 群: n=11) の 3 群に分けた。PAN 50 mg/kg を day 1 に単回皮下投与し、MCNS のモデルラットを作製した。また、ミトコンドリア特異的なラジカルスカベンジャーである MitoTEMPO を day 0、1 に 5 mg/kg ずつ、day 2~9 に 0.7 mg/kg ずつ腹腔内投与を行い、投与しない群にはプラセボとして NS を投与した。day 3、9 に 24 時間蓄尿を行い、day 10 に安楽死させる際に、腹部大動脈より血漿を採取し、平衡塩類溶液を灌流しながら両腎を採取した。各種検体を用いて蛋白・クレアチニン・酸化ストレスマーカーを測定した。抗 4-hydroxynonenal (4HNE) 抗体による免疫染色法を用いて、腎組織標本での酸化ストレスの局在を確認した。また、電子顕微鏡を用いて、ランダムに選択した糸球体のポドサイトを観察し、ミトコンドリアを障害スコアを用いて評価した。結果は、JMP Pro 13 software を用い、各群間で比較した。p 値<0.05 を有意とし、中央値と四分位範囲で示した。

本研究は、本学研究支援センター動物実験委員会の承認を得て、動物実験規程に則り施行した (承認番号: 28054、29057)。

《結 果》

PAN 投与後 9 日目の尿蛋白は NS 群 20.5 (16.2–35.7) mg/day、P 群 265.3 (144.0–371.7) mg/day、PT 群 87.5 (76.1–138.7) mg/day と PT 群が P 群に比して有意に低値であった。腎機能の評価としてクレアチニンクリアランスを算出し、各群間で有意差を認めなかった。

糸球体・尿中チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)、血漿 4HNE を酸化ストレスマーカーとして測定した。糸球体・尿中 TBARS、血漿 4HNE は PT 群が P 群に比して有意に低値であった。糸球体 TBARS: P 群 1.8 (1.6–1.9) $\times 10^2$ nmol/mg protein、PT 群 1.6 (1.5–1.7) $\times 10^2$ nmol/mg protein、尿中 TBARS: P 群 12.5 (11.4–15.5) nmol/mgCr、PT 群 8.3 (6.1–11.5) nmol/mgCr、血漿 4HNE: P 群 12.0 (11.0–16.0) nmol/L、PT 群 6.8 (3.0–8.9) nmol/L。抗 4HNE 抗体による免疫染色法では、P 群でポドサイトが強く染色され、PT 群では染色性が減弱していた。光学顕微鏡像では糸球体と尿細管間質に明らかな

異常所見を認めなかった。電子顕微鏡像では P 群で糸球体のポドサイト足突起の消失所見を認め、PT 群でも一部に消失が見られた。ポドサイトあたりのミトコンドリア障害スコアの平均は P 群で 1.8 (1.6–2.0) に対し、PT 群で 1.2 (1.1–1.4) と有意に低値であった。

《考 察》

P 群の光学顕微鏡と電子顕微鏡の所見は、MCNS として矛盾しなかった。蛋白尿と糸球体・尿中・血漿の酸化ストレスマーカーは、P 群に比して PT 群で有意に低値であった。また、抗 4HNE 抗体による免疫染色法で、P 群に比して PT 群でポドサイトの染色性が減弱しており、酸化ストレスが抑制されていた。ミトコンドリア特異的なラジカルスカベンジャーの投与により、糸球体ポドサイトの酸化ストレスが軽減され、尿蛋白が減少したことが示唆された。

さらに、電子顕微鏡像による糸球体ポドサイト内のミトコンドリア障害の評価では、P 群に比して PT 群の方が、ミトコンドリア障害スコアは低値であった。ミトコンドリア特異的なラジカルスカベンジャーによる、糸球体ポドサイト内のミトコンドリア障害の軽減が示された。

したがって、MCNS モデルラットにおいて、ミトコンドリア特異的なラジカルスカベンジャーにより、①糸球体ポドサイト内のミトコンドリアの酸化ストレスが低下し、②ミトコンドリア障害が軽減され、③ポドサイトの足突起の消失が改善し、④蛋白尿が減少したことが推察された。

《結 論》

MCNS モデルラットにおいて、ミトコンドリア特異的なラジカルスカベンジャーの投与により、糸球体ポドサイト内のミトコンドリア障害が抑制され、蛋白尿が減少した。

ミトコンドリア特異的なラジカルスカベンジャーは、MCNS の治療薬となる可能性がある。

論文審査結果の要旨

小児に好発する微小変化型ネフローゼ症候群 minimal-change nephrotic syndrome (MCNS) の発症要因として、糸球体ポドサイトにおける酸化ストレスの関与が示唆されている。しかしながら、*in vivo*でのミトコンドリアに局限した酸化ストレスに関する詳細な報告はなかった。申請者らは、MCNS のモデルラットを用いて、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤による蛋白尿減少効果について検討し、電子顕微鏡上でポドサイト内のミトコンドリア障害の評価を行った。

6 週齢の雄の Wistar ラットを用い、①生理食塩水のみ投与群 (NS 群)、②puromycin aminonucleoside (PAN) のみ投与群 (P 群)、③PAN 投与+ミトコンドリア特異的抗酸化剤投与群 (PT 群) の 3 群として、血漿・尿・糸球体などの検体を用いて蛋白・酸化ストレスマーカーを測定し、腎組織標本の光学顕微鏡による免疫染色法と電子顕微鏡像の評価を行った。

P 群に比して PT 群において、蛋白尿と酸化ストレスマーカーは有意に低下していた。免疫染色法で、P 群に比して PT 群でポドサイトの酸化ストレスの抑制が示された。ミトコンドリア特異的抗酸化剤により、糸球体ポドサイトの酸化ストレスが軽減され、尿蛋白が減少したことが示唆された。電子顕微鏡像による糸球体ポドサイト内のミトコンドリア障害の評価では、P 群に比して PT 群のミトコンドリア障害スコアが低値であった。ミトコンドリア特異的な抗酸化剤による、糸球体ポドサイト内のミトコンドリア障害の軽減が示された。MCNS の病因にミトコンドリア障害が密接に関与しており、ミトコンドリア特異的な抗酸化剤が治療薬となる可能性が示され、治療法の確立に重要な知見であるといえる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

PLoS ONE 15(1): e0227414, 2020 Jan <オンライン掲載>

doi: 10.1371/journal.pone.0227414