原　　著

Thy-1腎炎におけるギャップ結合阻害剤（heptanol）の局所投与による影響

佐藤綾子

新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設機能制御学分野

（主任：追手　巍教授）

新潟大学大学院医歯学総合研究科医科学専攻（修士課程）

The Effect of Gap-junctional Inhibitor, Heptanol, Administered Locally, in Anti-Thy-1 Antibody-induced Glomerulonephritis

Ayako SATO

Department of Cellular Physiology, Institute of Nephrology

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Takashi OITE)

Master course, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

要　旨

進行性糸球体腎炎の発症と進展に関与するとされる腎微小循環系の関連について，ギャップ結合に注目し，抗Thy-1腎炎における腎微小血管血行動態に対するギャップ結合阻害剤の影響について検討した．Munich Wistarラットに抗Thy-1抗体を静注し，メサンギウム傷害性腎炎モデルを作製した．腎炎惹起後7日目にギャップ結合阻害剤であるヘプタノール（Hp）(0.5mM, 50μl) またはPBSを含むコラーゲン・スポンジを左腎被膜下に移植し，その2，7日後の腎の微小血管血行動態を共焦点レーザー顕微鏡・ビデオ撮影装置により実時間的に解析した．糸球体，近位尿細管およびその他の尿細管周囲の血流速度を測定したが，糸球体では腎炎惹起後Hp投与した2日後の左腎では，右腎およびPBS投与群に比べ血流速度が低下していたが，近位尿細管以外の尿細管周囲における血流速度は有意に増加していた．また，各時期の尿蛋白測定において腎炎惹起した2群間で比較すると，移植後7日目の尿蛋白量はHp投与群で低値を示した．腎組織学的検討について，光学顕微鏡によるPAS染色所見では同一固体内における左右の腎組織に差は認められず，コネキシン（Cx）40，43の蛍光抗体法所見では腎炎惹起後の

Reprint requests to: Ayako SATO
Department of Cellular Physiology
Institute of Nephrology
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510　新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設機能制御学分野　佐藤綾子

糸球体内Cx40が著明に減少したが，Hp投与群とPBS投与群の間に差を認めることは出来なかった．本研究により，腎微小循環でギャップ結合能阻害作用が影響していることが判明した．

キーワード：腎微小循環，実時間型生体内共焦点レーザー顕微鏡，ギャップ結合，抗Thy-1腎炎

緒　　言

進行性糸球体硬化を呈し，腎死に至る機構には腎糸球体をはじめとした腎微小循環系の異常が関連していると考えられている[1)2)]．また，腎微小循環系の調節には血管構成細胞である内皮細胞や，血管平滑筋を含めた周皮細胞間の相互作用が必須であることも明らかになってきているが，その分子・細胞レベルでの解析はいまだ不十分である．本研究では細胞間相互作用において重要な役割を持つギャップ結合に注目し，抗Thy-1腎炎における糸球体構築傷害後における腎微小血管血行動態に対するギャップ結合機能の役割を検索する目的で，腎局所へのギャップ結合阻害剤投与後の腎微小循環血行動態について解析した．

材料と方法

実験動物

実験動物はMunich Wistar rat（Simonsen Laboratories Inc., Day Road, Gilroy, CA, USAより購入），6から7週齢，雄を用いた．動物実験は新潟大学における動物実験の指針・規則に従い行われた．

腎炎惹起性モノクローナル抗体

抗Thy-1抗体（ATS）モデルの作製に用いた単クローン抗体（mAb）1-22-3（IgG）はラットの糸球体で免疫したマウス脾臓リンパ球と骨髄腫細胞の細胞融合により得た目的クローンを腹水型として作製された[3)]．腹水を50％飽和硫安液で沈殿させ，2日間リン酸緩衝液（PBS）で透析し，得られたImmunoglobulin-rich fractionを用いた．

移植材料と腎被膜下への移植

I型コラーゲン・スポンジは田畑泰彦教授（京都大学再生医科学研究所生体組織工学）らが開発し，市販されている製品（Nitta gelatin Inc., Osaka, Japan）を用いた[4)]．このスポンジを10×5mm^2，厚さ1.5mm（重量約50mg）に切り，対照群として50μlのphosphate buffered saline（PBS），あるいは0.5mMヘプタノール（Hp）を各々浸潤後，凍結乾燥させ，以下の如く実験に供した．

ラットをthiobutabarbital sodium salt（100mg/体重Kg）腹腔内投与により麻酔し，腹部切開して左腎を露出，小ヘラで腎被膜に小孔を開け，一部剥離してスペースを作り，そこへPBSまたはヘプタノールを含ませたコラーゲン・スポンジを移植した[4)]．ギャップ結合阻害剤であるヘプタノールはSigma（St.Louis, MO）より購入した．

実験プロトコール

実験群は大きく，4群に分けられる．ラットに1.0mg（0.5ml），mAb 1-22-3（ATS）を静注し，抗Thy-1腎炎を作製した．静注7日後，腎被膜下にHpを含ませたコラーゲン・スポンジ（ATS＋Hp群）またはPBSを含ませたコラーゲン・スポンジ（ATS＋PBS群）を移植した．対照群として，正常ラットの左腎にPBSまたはHpを含ませたコラーゲン・スポンジの移植を行った群をそれぞれcont.＋PBS群，cont.＋Hp群とした．実験動物は静注後9日目，14日目（コラーゲン・スポンジ移植後2, 7日目）に屠殺した．

組織化学的検査

ラットはmAb 1-22-3を静注後9日目と14日目に屠殺した．パラフィン切片（2～3μm）を作製し，PAS染色，PAM染色を施した．また，

PAS染色標本を用い，メサンギウムの増殖と糸球体硬化の程度を0～4のスケールで表した．

尿蛋白量検査

牛血清アルブミン（Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA）を標準としてビウレット法により尿蛋白量を測定した．

血液生化学的検査

採血して得られた血清より，総蛋白，アルブミン，総コレステロール，尿素窒素（BUN），クレアチニンを測定した．

腎微小循環系の実時間生体内観察

生体内の微小循環血流の観察は生体顕微鏡による実時間的観察法により行った．これは共焦点レーザー顕微鏡（CSU-10：横河電機，東京）と，高速冷却CCDビデオカメラ（Model C9100-02, 浜松フォトニクス，静岡）を連結させたシステムである[5]．

Munich Wistar ratを thiobutabarbital sodium salt（100mg/体重Kg）腹腔内注射し麻酔した．ラットの体温はホットパッドで37℃に保った．ポリエチレンカテーテル（PE50）を血圧測定のため頚動脈に挿入した．血管造影のために fluorescein isothiocyanate（FITC）ラベルデキストラン（分子量150 000; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA）を注入，あるいはFITC標識自己赤血球を投与し血流測定するために大腿静脈へ同様にPE50を挿入した．腎表層の微小血管観察のため，左背側部を切開し，腎臓を露出させて顕微鏡下に静置した．37℃に加温した生理食塩水を滴下した状態で水浸式対物レンズを腎表面に接近させ腎尿細管間質および糸球体の血流を観察した．また，腎表面下に糸球体を観察できない場合は腎表面を薄く削いで止血後に糸球体の観察を行った．あらかじめ採取した自己赤血球を1mg/ml FITC（ICN Pharmaceutical Inc., Cleveland, OH, USA）を含むPBS（137mM NaCl, 6.4mM Na2HPO4, 2.7mM KCl, 1.5mM KH2PO4, pH 7.8）中で37℃，1時間反応させて蛍光標識した．洗浄して非標識のFITCを除去後，標識赤血球浮遊溶液，1 mlを作製し大腿静脈から注入した．

免疫組織化学的検査

各時期における腎微小循環検索後，ラットの左右腎臓を採取，液体窒素中で急速凍結して凍結切片を作製した．コネキシンに対する一次抗体としてウサギ抗ラットコネキシン40抗体（Chemicon International, Inc, Temecula, CA, USA），ウサギ抗ラットコネキシン43抗体（Sigma, St.Louis, MO, USA）を用いた．

統計学的処理

この実験結果は平均値±標準偏差（SD）で表した．尿蛋白量および血清生化学データの比較はStudent unpaired t-testを用いた．糸球体硬化指数，メサンギウム増殖指数および赤血球の流速（血流速度）の比較はMann-Whitney U-testを用いた．全ての統計処理において，$p < 0.05$は有意差があるとみなした．

結　果

コネキシン40，43の腎内局在

ギャップ結合蛋白であるコネキシン40，43のcont.＋PBS群における発現は，コネキシン40がメサンギウムに一致して優位に存在し，コネキシン43は傍糸球体領域にもメサンギウム細胞とは関係なく存在していた（**図1**）．腎炎惹起後3日目では糸球体内のコネキシン40はほぼ消失していた（**図2**）．cont.＋Hp群においても両コネキシンの局在に質的，量的の明らかな変化は認められなかった．また腎炎を惹起したATS＋PBS，ATS＋Hp群における両コネキシンの局在についても明らかな差は認められなかった．

尿蛋白測定

腎炎惹起した両群は正常群に比べて，特に腎炎惹起3日後の尿蛋白量が著明に増加していた．腎炎惹起群のうち，PBS投与群とHp投与群で比較すると，コラーゲン・スポンジ移植後2日目では

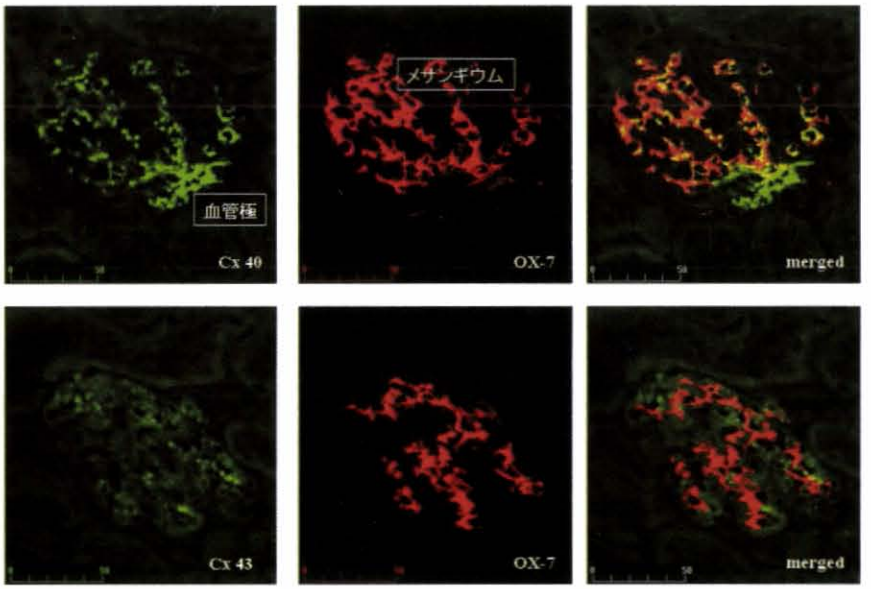


図1　糸球体を中心としたCx40，Cx43の局在（cont.＋PBS群）
上段：Cx40，下段：Cx43を示す2重蛍光抗体法所見．緑色はコネキシン，赤色はメサンギウムの局在を示す．右端が両像の重ね合わせ写真を示す．

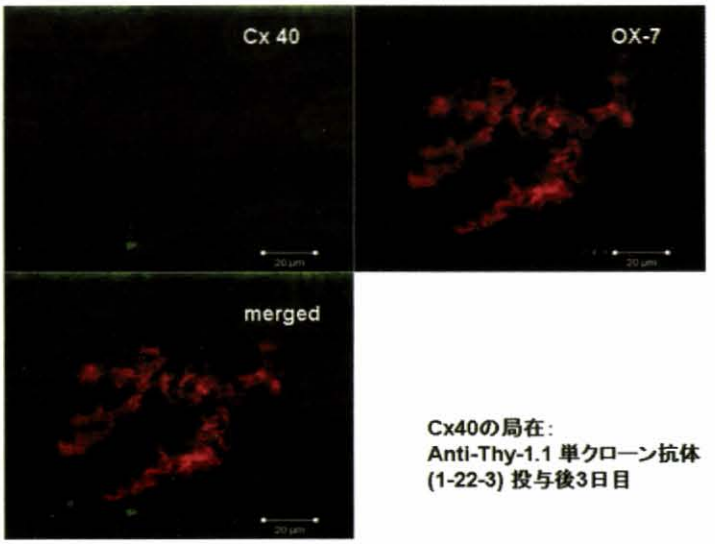


図2　糸球体を中心としたCx40の局在（ATS＋PBS群，3日目）
緑色はコネキシン，赤色はメサンギウムの局在を示す．左下が両像の重ね合わせ写真を示す．微小血管瘤を形成する腎炎惹起後3日目では，糸球体内コネキシン40発現が極めて少ない．

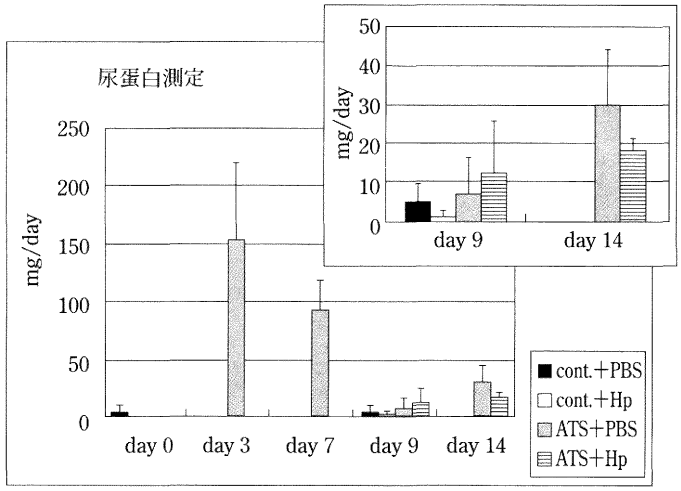


図3　尿蛋白量の推移

Day 0は正常ラットの腎被膜下にPBSを含むコラーゲン・スポンジを移植した群の尿蛋白量で無処置ラット，およびcont.＋Hp群でも低値を示し，3群間で有意の差は認められない．

Dayは抗体静注後（腎炎惹起後）の病日を示す．右上の挿入図は病日9日目，14日目（コラーゲン・スポンジ移植後，それぞれ2, 7日目）の尿蛋白量を示す部位の拡大図．

Hp投与群の方で高値，移植後7日目は逆にPBS群で高値を示したが，いずれも有意の差を示さなかった（**図3**）．

血液生化学的検査

血液生化学的検査では，血清総蛋白，アルブミン，総コレステロール，BUN，クレアチニンを各々測定した．移植後7日目で比較したところ，ATS＋Hp群でATS＋PBS群と比較して，クレアチニン値が有意に減少していた．その他の測定結果について有意差を認めるものはなかった．

組織化学的検査

コラーゲンを腎被膜下に移植しただけでは，その部位における細胞浸潤，滲出病変等の炎症所見は認められなかった．腎炎を惹起して腎被膜下にコラーゲンを移植し，PBSないしHpを局所投与した左腎と移植していない右腎との同一個体内の比較では，いずれも腎炎惹起後，3日目で腎糸球体における局所的なメサンギウム融解，および14日目にメサンギウム増殖病変が従来の報告[3)6)]通り観察されたが，両者に明らかな差を認めなかった．また，個体が異なる腎病変も同一の処置をした腎臓間で明らかな相違を認めなかった．

腎微小循環血流速度

コラーゲン移植後2日目，7日目の糸球体血流速度を，腎炎惹起した2群間で比較すると，Hp投与した群の速度はPBS投与群に比べ低下していたが有意差は認められなかった（**図4**）．近位尿細管以外の尿細管周囲における血流速度では，腎炎惹起したATS＋Hp群で移植後2日目に，ATS＋PBS群に比して有意に増加していたが，この現象は7日目には消失していた．またcont.両群との移植後2日目での比較では，腎炎惹起群，両群で有意に速度が減少していた（**図5**）．近位尿細管周

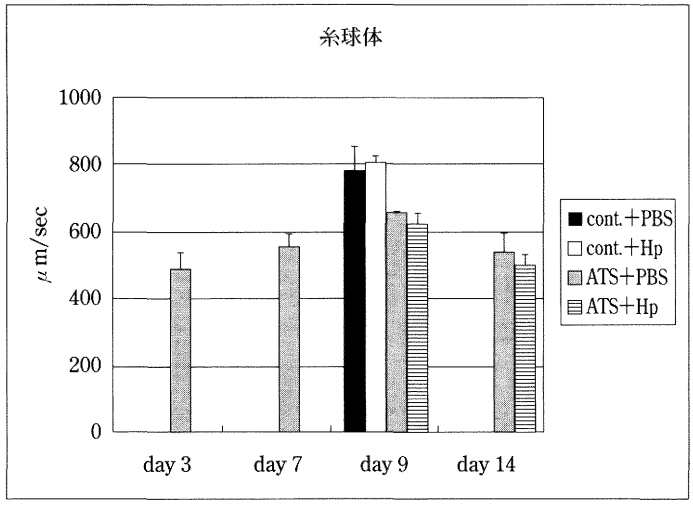


図4　糸球体内の血流速度（自己赤血球流速）の推移
横軸は腎炎惹起後の病日を示している．腎被膜下にコラーゲン・スポンジ（PBSあるいはHpを含有）をDay 7に移植し，その2日後（Day 9）および7日後（Day14）に血流速度を測定した．Hpの局所投与により血流速度が低下していた．$p < 0.05$を示したのはDay 9とDay14における，cont.+ PBS群，あるいはcont.+ Hp群 vs ATS + PBS群，ATS + Hp群．

囲の血流速度の解析結果について，各腎炎惹起両群間でコラーゲン・スポンジ移植後，2，7日目，いずれも有意差を認めなかった．

考　　察

腎臓は尿細管系と血管系が密接に連関し，生体内の内部環境維持には欠かせない臓器であることは良く知られている．近年，腎臓の循環器としての役割が注目されているが，糸球体，及び尿細管周囲の微小血管における循環動態に関しては解析技法の問題等で研究の進歩が遅れてきた．本研究では新規のバイオイメージング法として実時間型共焦点レーザー顕微鏡を導入[5]，腎炎惹起時の生体内における腎微小循環系の血行動態を観察・解析した．更に微小血管の血行動態調節に大きく関与していると推測されるギャップ結合機能との関連についても検討を加えた．

今回用いたラット腎炎モデルは，所属した教室で長年に渡り成果を挙げてきた再現性のあるモデルであり，基礎データが整っている[3)6)-9)]．バイオマテリアルであるコラーゲン・スポンジをATS腎炎発症後，7日目に腎被膜下に移植して，それに含まれる薬剤を局所投与する方法もアンギオテンシンII受容体阻害剤を同様に投与して，明らかな治療効果が得られた[4]ことを参考にした．しかも，この発症後7日目から14日目までの1週間は糸球体微小循環，傷害後の糸球体毛細血管の再生の観点から見て病態の転換期と考えられる[6]．この時期を選んでギャップ結合阻害剤を腎局所に投与して，腎間質から血管・尿細管側へ同薬剤を分配させ，その機能阻害を計り，腎炎時における統合機能としての各部位における血行動態を解析し，ギャップ結合能との連関を検索するの

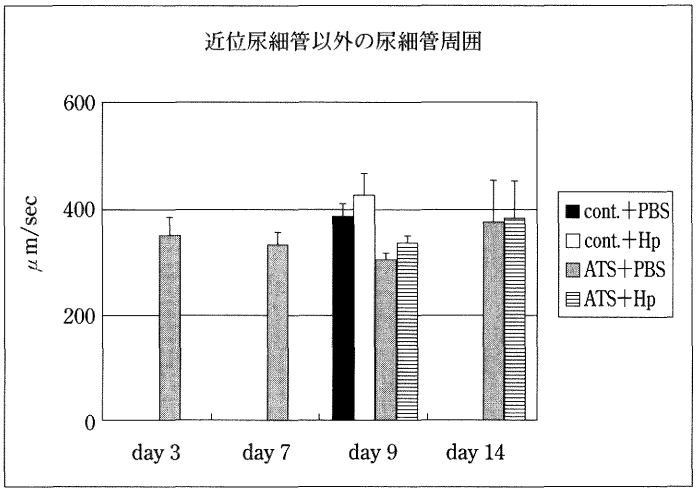


図5　近位尿細管以外の尿細管周囲の微小血管血流速度（自己赤血球流速）の推移

Day 9（コラーゲン・スポンジを移植してから2日後）で腎炎惹起群はいずれも2つの対照群に比して有意に血流速度の低下が認められた．腎炎惹起群間ではHp局所投与した群がPBSを投与した擬似処置群に比して，投与後2日（Day 9）の時点で有意（$p < 0.05$）に血流速度の増加を認めた．

が本研究の主旨である．

in vitro におけるメサンギウム細胞のギャップ結合能に関する当該教室の研究から，ギャップ結合が細胞間の Ca^{++} シグナル伝達，協調した細胞収縮に関与していて，一種の細胞合胞体を形成，機能していることも明らかになっている．この収縮を含めた細胞協調作用が生体内でも稼動しているかの検討の一環として本研究は成された．結論として，メサンギウム傷害・再生時においてHpによるギャップ結合能阻害作用により，腎糸球体血流，及び近位尿細管以外の尿細管周囲の血流速度に有意の変化が生じることが確認された．腎炎を起こさない生理的条件下ではギャップ結合阻害剤の局所投与で腎微小血管系の血行動態に変化が認められないことから，また，同剤を投与した時期は腎炎の急性増殖期を過ぎ，修復期に向かっている時期に一致していることから，糸球体を主体とした微小循環系の修復・再生の時期の血流が正常状態に修復されるまでの過程にギャップ結合が何らかの役割を果たしていることが示唆される．Hpのギャップ結合阻害作用は非特異的で短時間であることから蛋白発現の程度というよりは一過性の機能抑制によると考えられ，コネキシン40，43の蛍光抗体法による蛋白発現の程度，および局在についてもHpの投与による影響が認められなかった．

微小血管の血流回復に関与するコネキシンの種類，担当コネキシンが発現している細胞の同定，そして各種細胞間のシグナル伝達などが未だ明らかでない点も多く，本研究を基礎にした更なる研究蓄積が必要であろう．将来，各コネキシンに特異的な機能阻害剤，例えば一種のデコイ（擬似ペプチド）[13]，microRNAsの投与，細胞選択的なコネキシン阻害など，微小循環動態調節についての

研究が更に進展し，腎疾患進展機序の解明，治療法の開発に資する研究が望まれる．

謝 辞

本研究を行うにあたり，終始，ご指導ご協力を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科腎研究施設機能制御学分野 追手巍教授，ならびに教室の諸先生に心より感謝申し上げます．また，本研究の一部は平成20年度，第51回日本腎臓学会学術総会（福岡）で発表した．

文 献

1）Oite T, Yao J and Morioka T: Disturbance of syn-cytial cell function in glomerular mesangial cells involved in the progressive glomerular diseases. Contr Nephrol 139: 12-19, 2003.
2）Oite T and Yao J: Disturbance of glomerular hemodynamics: a risk factor determining pro-gression of glomerular disease? J Nephrol in press, 2009.
3）Wada Y, Morioka T, Oyanagi-Tanaka Y, Yao J, Suzuki Y, Gejyo F, Arakawa M and Oite T: Impairment of vascular regeneration proceeds progressive glomerulosclerosis in anti-Thy 1 glomerulonephritis. Kidney Int 61: 432-443, 2002.
4）Mahmood J, Khan F, Okada S, Kumagai N, Morioka T and Oite T: Local delivery of ARB in the kidney ameliorated the experimental pro-gressive glomerulosclerosis. Kidney Int 70: 1591-1598, 2006.
5）Oyanagi-Tanaka Y, Yao J, Wada Y, Morioka T, Suzuki Y, Gejyo F, Arakawa M and Oite T: Real-time observation of hemodynamic changes in glomerular aneurysms induced by anti-Thy-1 antibody. Kidney Int 59: 252-259, 2001.
6）Kawamura K, Okada S, Li B, Suwa M, Yao J, Morioka T, Gejyo F and Oite T: Tubulence of glomerular hemodynamics involved in progres-sive glomerulosclerosis. Kidney Int 69: 1792-1798, 2006.
7）Li B, Yao J, Kawamura K, Oyanagi-Tanaka Y, Hoshiyama M, Morioka T, Gejyo F, Uchiyama M and Oite T: Real-time observation of renal hemodynamic changes in diabetic rats. Effects of insulin and ARB. 66: 1939-1948, 2004.
8）Ikarashi K, Li B, Suwa M, Kawamura K, Morioka T, Yao J, Khan F, Uchiyama M and Oite T: Bone marrow cells contribute to regeneration of dam-aged glomerular endothelial cells. Kidney Int 67: 1925-1933, 2005.
9）Li B, Morioka T, Uchiyama M and Oite T: Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat mode. Kidney Int 69: 323-330, 2006.
10）Yao J, Morioka T and Oite T: PDGF regulates gap junction and connexin43 phosphorylation by PI 3-kinase in mesangial cells. Kidney Int 57: 1915-1926, 2000.
11）Yao J, Morioka T, Li B and Oite T: Coordination of mesangial cell contraction by gap junction-mediated intercellular Ca++ wave. J Am Soc Nephrol 13: 2018-2026, 2002.
12）Yao J, Hiramatsu N, Zhu Y, Morioka T, Takeda M, Oite T and Kitamura M: Nitric oxide-medi-ated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesan-gial cells. J Am Soc Nephrol 16: 58-67, 2005.
13）Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney KR, Hill CE and Suzuki H: Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. Kidney Int 73: 415-422, 2008.

（平成20年11月20日受付）