

氏名	原田 達彦
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第 1325 号
学位授与の日付	2023年3月12日
学位論文題名	Effects of recombinant human soluble thrombomodulin on neutrophil extracellular traps in the kidney of a mouse model of endotoxin shock 「エンドトキシシヨックモデルマウスの腎臓における好中球細胞外トラップに対する遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリンの効果」 Fujita Medical Journal. in press
指導教授	西田 修
論文審査委員	主査 教授 長崎 弘 副査 教授 土井 洋平 教授 坪井 直毅

論文内容の要旨

【緒言】

Neutrophil extracellular traps(NETs)は、Lipopolysaccharide (LPS)などの刺激因子が好中球内のヒストンH3(H3)をシトルリン化することにより、好中球から放出される網状構造物のことをいう。LPS投与マウスで、肺と肝臓にNETsが蓄積することが報告されている。肺や肝臓などの外部環境と接している臓器は、必要な物質を取り込み、不要な物質を排泄するが、細菌や毒素などから生体を守るために、免疫機能が備わっていることが報告されている。尿細管では、原尿中の必要な物質を取り込み、免疫機能が発達していることから、尿細管が豊富な腎髄質においても肺や肝臓と同様にNETsが蓄積するのではないかと考えた。遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリン(rTM)は血管内皮細胞表面に存在するトロンボモジュリンを遺伝子組換え技術により作製された抗凝固薬である。腎臓のNETsに対するrTMの効果についてはいくつかの報告があるが、腎皮質と腎髄質を区別して評価した報告はない。

【目的】

本研究では、LPS投与マウスの腎髄質ではNETsが蓄積しており、rTMが有効であるという仮説を立てた。我々は、シトルリン化ヒストンH3(citH3)をNETsのマーカーとして用い、LPS投与マウスの腎皮質と腎髄質におけるcitH3量と、rTM投与によるcitH3量を、免疫組織染色で評価することを目的とした。

【方法】

供試動物としてマウスを用いた。LPS 10mg/kg(または同量の生食)を腹腔内投与した時点を0hとし、1h後にrTM 6mg/kg(または同量の生食)を腹腔内投与、8h後に採血および腎臓の採材をした。control群は0時間と1時間ともに生食を投与し、non-rTM群では0時間にLPS、1時間後に生食を投与した。rTM群では0時間にLPS、1時間後にrTMを投与した。

採材された血清より、クレアチニン(CRE)および血中尿素窒素(BUN)、H3、citH3を測定した。また、腎組織は免疫組織染色を行い、citH3陽性細胞数の定量を行った。

【結果】

血清CRE、BUN、H3値において、non-rTM群はcontrol群より有意に高値を示した。また、血清H3、citH3値において、rTM群はnon-rTM群より有意に低値を示した。免疫組織染色の定量では、腎皮質でcontrol群とnon-rTM群で有意な差が見られなかった。腎髄質ではcontrol群よりもnon-rTM群で有意に高値を示し、non-rTM群よりもrTM群で有意に低値を示した。

【考察】

血清CRE、BUN、H3、citH3値を測定することにより、本研究でどのようなモデルを用いたか確認した。本研究では、免疫組織染色のcitH3定量の結果、腎皮質(糸球体)でcontrol群とnon-rTM群で有意な差が見られなかった。これは、腎皮質が血液の濾過に特化した高圧系であるためと考えられる。肺と肝臓は共に低圧系で免疫機能が発達しているため、好中球と異物との相互作用を促進し、免疫機能を発揮するために低圧系であると考えている。本研究では、腎髄質のcitH3は、control群よりもnon-rTM群で有意に高値を示した。腎髄質ではDAMPsやPAMPsが尿細管から尿細管周囲毛細血管に侵入しないように免疫機能が発達している。腎髄質においても肺や肝臓と同様に、低圧系であり、免疫機能が発達しているため、好中球とLPSの相互作用が促進しているのではないかと考えられる。腎髄質のcitH3は、non-rTM群よりもrTM群で有意に低値を示したのは、rTMが腎髄質のcitH3を何らかの方法で抑制したためと考えられる。

【結語】

LPS投与マウスでは腎髄質にcitH3が蓄積しており、rTMを投与することにより腎髄質でのcitH3量を減少させた。

論文審査結果の要旨

細菌感染症やLPSなどの刺激により好中球から放出されるNETsは、強力な病原体処理能力を示す一方で肝臓や肺に蓄積し組織障害作用を示すこと、rTMの投与により減少することが報告されている。また腎臓のNETsに対するrTMの効果についてはいくつかの報告があるが、その腎組織特異的な効果は不明である。本研究では、LPS投与マウスを用い、血清中のCre、BUN、ヒストンH3、シトルリン化ヒストンH3値の測定および腎臓の免疫組織染色画像のcitH3陽性細胞数の定量を行い、腎臓におけるNETs形成と、NETsに対するrTMの効果を検討した。LPS投与後、NETsのマーカーであるcitH3陽性細胞数は腎髄質>腎皮質であった。特に腎皮質の糸球体領域にcitH3陽性細胞は殆ど存在しなかった。また腎皮質では有意なrTM投与効果は無かったのに対し、腎髄質では治療群においてcitH3の有意な減少を確認した。NETs形成が髄質に多く見られた理由として、腎皮質は血液の濾過に特化した糸球体を多く含む高圧系であるのに対し、腎髄質は低圧系である尿細管を主な構成成分とするため、PAMPsなどの再吸収を阻止する細胞性免疫機能は腎髄質においてより発達しているとの考察が示された。以上より本研究は侵襲制御医学に貢献し、学位論文として十分な価値を持つものと評価された。