

主論文の要旨

Cardiac Myocyte-Derived Follistatin-Like 1 Prevents Renal Injury in a Subtotal Nephrectomy Model

〔 心筋細胞由来 Follistatin-Like 1 は
腎臓亜全摘モデルにおいて腎障害を予防する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

早川 智子

【背景】

我が国において慢性腎臓病は年々増加しており、今や国民病の一つである。慢性腎臓病は心疾患の危険因子として知られているが、一方で慢性心不全を含む心疾患が慢性腎臓病の発症や進展に関与していることが報告されている。このように心臓病と腎臓病が互いに関連して進行するという病態は「心腎連関」と言われ、近年注目されている。しかしその病態生理や機序は十分には解明されておらず、その有効な予防・治療法は見つかっていない。

これまで我々のグループは Follistatin like 1 (Fstl1) が、心筋の虚血や肥大あるいは心不全状態において発現が増加し、心血管保護作用を発揮するカルディオカインであることを報告してきた。しかし、心筋由来 Fstl1 の腎臓病に対する役割については分かっていない。今回、腎障害に対する心筋細胞由来 Fstl1 の役割をマウス 5/6 腎摘モデルを用いて検討した。

【結果】

5/6 腎摘後の心筋細胞特異的 Fstl1 欠損(cFstl1-KO)マウスにおける尿中アルブミン排泄、糸球体肥大、間質線維化の増悪 (Fig1)

腎臓を 5/6 部分摘出することにより慢性腎不全マウスモデルを作成した。5/6 腎摘後 1 週目において対照マウスでは心臓と血中での Fstl1 が増加していたが、cFstl1-KO マウスでは腎摘後の血中 Fstl1 の上昇はほとんど見られず、5/6 腎摘後において心臓が Fstl1 の主要な産生部位であると考えられた。

cFstl1-KO マウスは対照マウスと比べて、5/6 腎摘後の尿アルブミン値は高値を示した。PAS 染色、マッソン・トリクローム染色による遺残腎での糸球体障害の組織学的評価では、cFstl1-KO マウスは対照マウスに比べて、有意に糸球体サイズと糸球体内の細胞数が増加、尿細管間質の線維化面積はより高値を示した。

cFstl1-KO マウスの遺残腎における炎症性サイトカイン、酸化ストレス、線維化マーカーの上昇 (Fig2)

炎症と酸化ストレスのいずれも、慢性腎臓病の進行に強く関与することが報告されている。Fstl1 の腎保護作用のメカニズムを調べるために、炎症性サイトカイン及び酸化ストレスマーカー、線維化マーカーの遺残腎における mRNA 発現レベルを、定量的 RT-PCR 法により測定したところ、cFstl1-KO マウスの遺残腎ではこれらのマーカーが対照マウスと比較して有意に高値を示した。

Fstl1 全身投与による 5/6 腎摘後の腎障害抑制効果 (Fig3)

Fstl1 の治療効果を検討するために、アデノウイルスベクターを用いて Fstl1 を過剰発現させる検討を行った。5/6 腎摘後、4 週目に Fstl1 のアデノウイルスを野生型マウスに静脈内注射した。Fstl1 投与により、血中濃度は 3 倍近く増加し、5/6 腎摘後の尿中アルブミン排泄量は、対照群と比較して有意に減少していた。

Fstl1 投与群は対照群と比較して、5/6 腎摘後 8 週目において糸球体面積および糸球体細胞数が有意に低値であり、間質の線維化面積も有意に低値を示した。

また、Fstl1 投与群の遺残腎では、対照群と比較して炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーおよび線維化マーカーの mRNA レベルが有意に低値を示した。したがって、Fstl1 投与は遺残腎における、炎症性変化、酸化ストレス応答、間質線維化を抑制することが示唆された。

Fstl1 のヒト培養メサンギウム細胞における AMPK 経路を介した炎症抑制効果 (Fig4,5,6)

Fstl1 による腎保護作用の詳細なメカニズム解明のために、ヒト培養メサンギウム細胞を用いた *in vitro* の検討を行った。メサンギウム細胞にリコンビナント Fstl1 蛋白 (FSTL1) を 1 時間前処理した後、4 時間の TNF- α 刺激による炎症性サイトカインの発現上昇を検討したところ、FSTL1 の前処理は TNF- α 刺激による IL6、TNF- α の mRNA 誘導を濃度依存的に抑制した。

次に FSTL1 の腎保護作用に AMPK シグナルが関与するか検討した。FSTL1 添加により、5 分後をピークにメサンギウム細胞における AMPK のリン酸化レベル及びその下流シグナル分子 ACC のリン酸化が増加した。In vivo においても、AMPK リン酸化は対照マウスの遺残腎の糸球体領域において強く認められたが、cFstl1-KO マウスの遺残腎では AMPK リン酸化シグナルが減弱していた。これらの組織学的所見と一致して、ウェスタンブロット法で評価した遺残腎での AMPK リン酸化は、対照マウスと比較して cFstl1-KO マウスの遺残腎において低値を示した。

Fstl1 の抗炎症作用に AMPK シグナルが関与するか解析するために、メサンギウム細胞において、ドミナントネガティブ型の AMPK (dn-AMPK) を発現するアデノウイルスを用いて、AMPK 活性を阻害する検討を行った。dn-AMPK 投与により、FSTL1 により増強する AMPK の下流シグナル分子 ACC のリン酸化は完全に阻害されており、AMPK 活性の阻害が確認された。dn-AMPK による AMPK 活性の阻害は、FSTL1 による TNF- α 誘導性 IL6 発現上昇の抑制作用を完全にリバースした。これらの所見より FSTL1 はメサンギウム細胞において、AMPK シグナルを介して抗炎症作用を発揮することが明らかになった。

【考察】

今回我々は心筋細胞特異的 Fstl1 欠損マウスに 5/6 腎摘モデルを作成することにより、心筋由来 Fstl1 の慢性腎障害における役割を検討した。心筋由来 Fstl1 欠損は慢性腎障害において、尿中アルブミン排泄量、遺残腎における糸球体障害、間質線維化、炎症反応、酸化ストレス応答を増悪させた。一方 Fstl1 の全身投与は、慢性腎障害時の尿中アルブミン排泄、遺残腎における糸球体障害、間質線維化、炎症反応、酸化ストレス応答を減少させた。炎症と酸化ストレスのいずれも、慢性腎臓病の進行に強く関与することが報告されていることから、心筋由来 Fstl1 は腎障害に対して、抗炎症

作用、抗酸化ストレス作用を介して腎保護作用を発揮することが示唆された。

AMPK シグナルは、心筋細胞を含めた様々な細胞において、抗炎症作用および抗酸化ストレス作用を有することが報告されている。今回の検討でも *in vivo*、*in vitro* のいずれにおいても、Fstl1 投与により、AMPK のリン酸化シグナルが亢進しており、*in vitro* において AMPK シグナル阻害により、Fstl1 の抗炎症作用がリバーズされることより、Fstl1 の腎保護作用は少なくとも一部は AMPK シグナルを介していることが示唆された。

【結論】

心筋細胞由来 Fstl1 は、5/6 腎摘後の腎障害に防御的に作用することが明らかになった。今回の検討により Fstl1 が心腎連関に影響を与える新たなカルディオカインであることが示唆され、慢性腎障害治療の新たな標的分子になり得ることが示された。