

腎移植慢性拒絶反応の病態と治療： 非免疫学的因子，免疫抑制剤による腎毒性

大阪市立大学大学院医学研究科泌尿器病態学

仲谷 達也，浅井 利大

NON-IMMUNOLOGIC FACTOR: IMMUNOSUPPRESSIVE DRUG-INDUCED NEPHROTOXICITY

Tatsuya NAKATANI and Toshihiro ASAI

From the Department of Urology, Osaka City University Graduate School of Medicine

Immunosuppressant-induced nephrotoxicity contributes to kidney graft loss in the long-term as one of the non-immunologic factors. We previously reported that correction of cyclosporine A (CsA)-induced hypomagnesemia reduced chronic CsA nephrotoxicity. This study was conducted to elucidate the mechanism of the beneficial effects of magnesium (Mg) on CsA nephrotoxicity and examine the role of the renin-angiotensin system in this mechanism. We particularly focused on CsA-induced interstitial mononuclear cell infiltration. CsA (15 mg/kg/day, s.c.) was administered daily to rats maintained on low sodium diets for 7, 14 and 28 days. The inhibitory effects of Mg supplementation and those of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) were compared for renal function, renal histology, mononuclear cell infiltration and gene expression profile.

CsA lowered creatinine clearance and developed characteristic tubulointerstitial fibrosis that were mostly evident at day 28. CsA-induced impairment of renal function was ameliorated by Mg supplementation but not by ACEI. Monocyte/macrophage infiltration preceded the renal fibrosis and increased progressively with the duration of CsA administration. CsA markedly upregulated the expression of chemoattractant proteins, osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1, concomitantly. These changes were markedly attenuated by Mg but only slightly by ACEI. CsA also promoted expression of fibrogenic molecules and extracellular matrices that were markedly attenuated by Mg but only slightly by ACEI. Similarly, CsA-induced tubulointerstitial fibrosis was almost completely abolished by Mg supplementation but only partially attenuated by ACEI. These results suggested that Mg supplementation abolished CsA-induced precedent inflammatory cell influx possibly via inhibition of expression of chemoattractants and consequently suppressed tubulointerstitial fibrosis. In this beneficial mechanism, factors independent of renin-angiotensin system seem to be mainly involved.

(Acta Urol. Jpn. 48 : 699-705, 2002)

Key words: Cyclosporine A, Nephrotoxicity, Magnesium, Renin-angiotensin system

緒 言

カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A (CsA) の臨床応用は，腎移植後の急性拒絶反応発症率を著明に低下させ，短期生着率の改善をもたらした。しかしながら長期成績については期待したような改善効果のないことが明らかになってきた。長期成績にもっとも影響するのは非可逆的で緩徐な機能低下を特徴とする慢性拒絶反応である。一方，非免疫学的因子も慢性拒絶反応の発症と進展に関与し，そのため慢性拒絶反応は最近では慢性移植腎症 (chronic allograft nephropathy) と名を改めつつある。CsA 導入後の慢性移植腎症の一因子として CsA の副作用である腎毒性が注目を集めている¹⁾。そこで，われわれ

は，CsA 腎毒性の進展抑制に関して実験学的アプローチを試み，その発症メカニズムを分子生物学的に検討する基礎実験を行った。CsA 腎毒性は急性ならびに慢性に分類され，前者は CsA の血管収縮作用により糸球体濾過率の低下をきたす可逆的な変化であり，後者は尿細管間質の線維化として現れる非可逆的な組織学的変化である。これまで CsA 慢性腎毒性の進展には renin-angiotensin 系 (RAS) が関与しており，アンギオテンシン変換酵素阻害剤 (ACEI) やアンギオテンシン II 受容体拮抗薬によりその進展が抑制されると報告されている²⁻⁵⁾。今回，われわれは，CsA の副作用の 1 つである低 Mg 血症に注目し，Mg 補給による CsA 腎毒性に対する効果を，ACEI のそれと比較検討した。

対象と方法

実験動物は6週齢の雄性SD ratを用い、CsA 慢性腎毒性を促進する目的で低ナトリウム食 (Na 0.05%) にて飼育し、オリーブ油に溶解したCsAを15 mg/kg/dayを連日皮下注した。ラットはCsA単独投与群 (CsA), CsA投与+高Mg食投与群 (CsA+Mg), CsA投与+ACEI投与群 (CsA+ACEI), vehicle投与群 (Vh) の4群に分けた。通常食中のMgは0.05%, 高Mg食として0.6% Mgを与え、ACEIはbenazepril 4 mg/kg/dayを投与した。7, 14, 28日目に血圧測定, 採血, 採尿および腎摘出を行い、血液尿生化学検査, 組織学的検討ならびに遺伝子発現の検討を行った。

1. 組織学的検討

PAS染色にて尿細管障害および間質の線維化について検討した。尿細管障害は, score 0: 尿細管障害なし, 1: 尿細管障害<10%, 2: 10~25%, 3: 25~50%, 4: 50~75%, 5: >75%, 間質の線維化はscore 0: 正常間質, 1: 尿細管間質の軽度の線維化, 2: 尿細管間の中等度の間質の拡張を伴う中等度の線維化, 3: 尿細管間の重度の間質の拡張を伴う重度の線維化としてscore化した。

2. Northern blot analysis

腎皮質からRNAを抽出し⁶⁾, ナイロンメンブレンにtransferした後, 以下のcDNA probeとhybridizeさせ, 定量化した。

Monocyte/macrophage (M ϕ) の遊走因子 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ならびに osteopontin (OPN), 線維化促進遺伝子である plate-

let derived growth factor B-chain (PDGF-B) および transforming growth factor- β (TGF- β), 細胞外基質分解抑制系遺伝子である plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) と tissue inhibitor of metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) 細胞外基質の type I collagen および type IV collagen, 血管収縮物質である endothelin-1 (ET-1) について, その遺伝子発現を検討した。すべての mRNA 発現は house keeping gene である GAPDH の発現量により補正した。

3. Immunohistochemistry

カルノア固定した腎組織にて mouse monoclonal antibody to the rat monocyte/M ϕ (ED-1; Serotec, Oxford, UK.) および mouse monoclonal antibody to the rat OPN (MPIIB10; developmental studies hybridoma bank Iowa city, Iowa) を用い, immunohistochemistry を施行した。Monocyte/M ϕ 浸潤は腎皮質 1.0 $\times$ 1.0 mm 範囲20箇所の ED-1 陽性細胞数を, OPN 発現は腎皮質 1.0 $\times$ 1.0 mm 範囲20箇所の OPN 陽性尿細管数をそれぞれカウントし, 定量化した。

4. 統計学的解析

データを mean $\pm$ SE で示す。ANOVA を用いて解析し, 群間の比較には Duncan's multiple range test を使用し, P<0.05 をもって有意差ありとした。

結 果

1 生化学検査 (Table 1)

CsA による血中 Mg 濃度の進行的な低下は, Mg 補給により改善された。CsA, Mg により血圧は影響を受けなかったが, ACEI では進行的に低下し, 28

Table 1. Changes in systolic blood pressure, plasma Mg, plasma creatinine and creatinine clearance

Parameters	Treatment	Days		
		7	14	28
Systolic BP (mmHg)	CsA	127.7 $\pm$ 4.3	131.2 $\pm$ 2.9	130.8 $\pm$ 3.2
	CsA+Mg	130.6 $\pm$ 2.5	119.5 $\pm$ 2.8	128.0 $\pm$ 4.9
	CsA+ACEI	93.4 $\pm$ 5.5 **	94.9 $\pm$ 6.3 **	76.4 $\pm$ 9.5 **
	Vh	128.5 $\pm$ 3.8	126.5 $\pm$ 4.1	129.7 $\pm$ 2.0
Plasma Mg (mEq/l)	CsA	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1 *	1.0 $\pm$ 0.2
	CsA+Mg	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.0 #	1.6 $\pm$ 0.1
	CsA+ACEI	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3
	Vh	1.4 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.1
Plasma creatinine (mg/dl)	CsA	0.39 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.09*	0.84 $\pm$ 0.1 *
	CsA+Mg	0.37 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.03#
	CsA+ACEI	0.50 $\pm$ 0.1 *	0.60 $\pm$ 0.1 *	0.90 $\pm$ 0.2 *
	Vh	0.30 $\pm$ 0.0	0.30 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.0
Creatinine clearance/kidney weight (ml/min/g)	CsA	0.55 $\pm$ 0.11*	0.27 $\pm$ 0.06*	0.20 $\pm$ 0.03*
	CsA+Mg	0.53 $\pm$ 0.08*	0.41 $\pm$ 0.01**	0.52 $\pm$ 0.03#
	CsA+ACEI	0.33 $\pm$ 0.04*	0.24 $\pm$ 0.04*	0.14 $\pm$ 0.03*
	Vh	0.81 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.06

Data are shown as the mean $\pm$ S.E.. * p<0.05 compared to Vh (vehicle) group. # p<0.05 compared to CsA group.

日目には 76.4 ± 9.5 mmHg であった. Creatinine clearance は CsA 単独および ACEI との併用にて有意に低下していた. 一方, CsA+Mg 群では7日目に有意な低下を認めたものの, その後 CsA, CsA+ACEI 群より有意に上昇し, 28日目には Vh 群と有意差を認めないレベルまで改善した.

2. 組織学的検討 (Fig. 1)

CsA 群で28日目にヒト慢性 CsA 腎毒性と同様の, 特徴的な組織像が認められた (Fig. 1A). 28日目には Mg, ACEI により尿細管障害, 間質の線維化とも有意に抑制されていた (Fig. 1D). Mg 補給によりこの両者はほぼ完全に抑制された (Fig. 1B, D) のに対し, CsA+ACEI では尿細管障害, 間質の線維化とも約半分の抑制であった (Fig. 1C, D).

3. Northern blot analysis

OPN, MCP-1 mRNA (Fig. 2)

OPN mRNA は CsA により早くも7日目から劇的に発現亢進しており (14.6 ± 5.0 倍), その後進行的に上昇した (76.3 ± 12.1 倍, 28日目). Mg 補給により

この上昇はほぼ完全に抑制されたが, ACEI では28日目に部分的な抑制を認めたのみであった. CsA 群で MCP-1 は14日目に著明に発現が亢進しており, その上昇は28日目にも認められた. この発現亢進は高 Mg 食投与により有意に抑制されたが, ACEI では抑制効果が認められなかった.

4. TGF- β , PDGF-B, PAI-1 and TIMP-1 mRNA (Fig. 3)

CsA 群での皮質 TGF- β mRNA 発現は14日目より上昇し, 28日目には約4倍まで増加していた. 28日目には, Mg 補給によりほぼ完全に, 一方 ACEI では部分的にのみこの増加が抑制された. CsA による PDGF-B mRNA 発現亢進は14, 28日目にみられた. この変化は Mg により有意に抑制された. ACEI によっても14日目には抑制効果を認めたが, 28日目には抑制は認められなくなっていた. PAI-1 遺伝子発現は CsA により14, 28日目に上昇しており, 28日目には Mg により有意に抑制されていた. ACEI でも28日目の抑制効果を認めたが, Mg の効果と比較すると

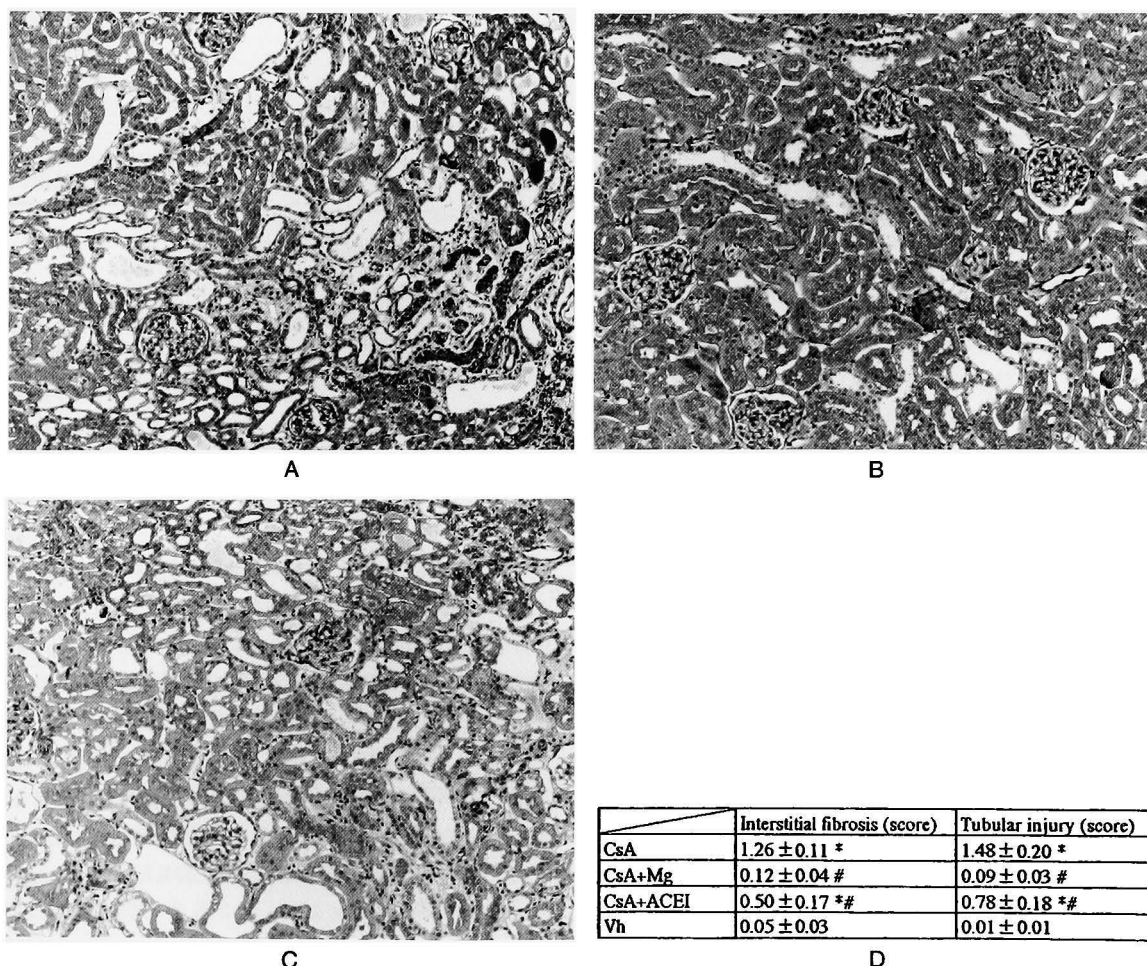


Fig. 1. Effect of Mg supplementation and angiotensin converting enzyme inhibitor on CsA-induced chronic nephropathy. Photomicrographs show the renal cortex of salt-depleted rats given CsA (A), a combination of CsA and Mg (B) and a combination of CsA and benazepril (C) at day 28. Tubular injury and interstitial fibrosis at day 28 are scored semiquantitatively (D). * $p < 0.05$ compared to Vh (vehicle) group. # $p < 0.05$ compared to CsA group.

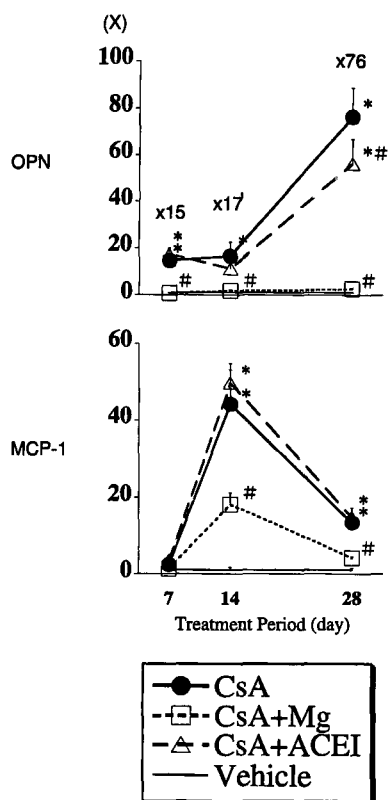


Fig. 2. Effects of Mg supplementation and angiotensin converting enzyme inhibitor on renal cortical mRNA of chemoattractants in cyclosporine A-treated rats. * $p < 0.05$ compared to Vehicle group. # $p < 0.05$ compared to CsA group.

軽度であった。CsA による TIMP-1 mRNA の上昇は実験期間を通じて Mg により著明に抑制されていたが、ACEI は抑制効果を示さなかった。

5. Collagen I, IV mRNA (Fig. 3)

CsA により collagen I mRNA 発現は14, 28日目まで有意に上昇していた。この上昇はともに Mg によりほぼ完全に抑制されていた。ACEI も14日目には Mg と同様の効果を示したが、28日目には抑制効果を認めなかった。Collagen IV mRNA は CsA により7, 28日目に上昇しており、Mg のみにより抑制された。

6. ET-1 mRNA (Fig. 3)

CsA により腎皮質での ET-1 遺伝子発現は徐々に上昇し、28日目には有意な上昇を認めた。Mg はこの発現亢進を著明に抑制していたが、それに対して ACEI は ET-1 発現を抑制しなかったばかりではなく、14日目には逆に遺伝子発現は増強された。Mg, ACEI の ET-1 遺伝子発現に与える影響が両者の急性 CsA 腎毒性に対する効果の相違につながったと考えられた。

7 Immunohistochemistry

ED-1

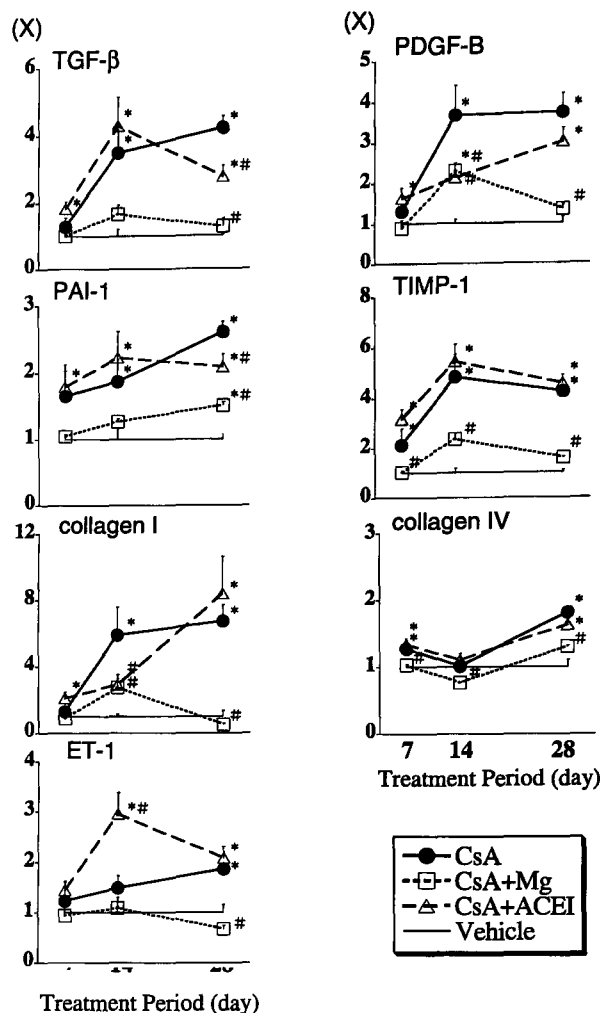


Fig. 3. Effects of Mg supplementation and angiotensin converting enzyme inhibitor on renal cortical mRNA of TGF- β , PDGF-B, PAI-1, TIMP-1, collagen I, collagen IV and ET-1 in cyclosporine A-treated rats. * $p < 0.05$ compared to Vehicle group. # $p < 0.05$ compared to CsA group.

CsA 群では ED-1 陽性細胞の皮質への浸潤は早くも7日目から観察され、浸潤細胞数は CsA 投与に伴い、さらに増加した (Fig. 4A, D)。CsA+Mg 群では monocyte/M ϕ 浸潤は著明に抑制されており、実験期間を通じて Vh 群と有意差を認めなかった (Fig. 4B, D)。ACEI は CsA による単核球の浸潤を14日目まで抑制しなかったが、28日目には有意な抑制を認めた。しかし、CsA+Mg 群と比較するとその抑制の度合いは軽度であった (Fig. 4C, D)。

8. Osteopontin

OPN タンパク発現はその遺伝子発現と同様であった。CsA により7日目から、尿管管障害がわずかに認められる領域に染色が見られた。その後、進行性に増加し、28日目には線維化をきたした間質領域の拡張した尿管上皮細胞に認められた。また、Bowman

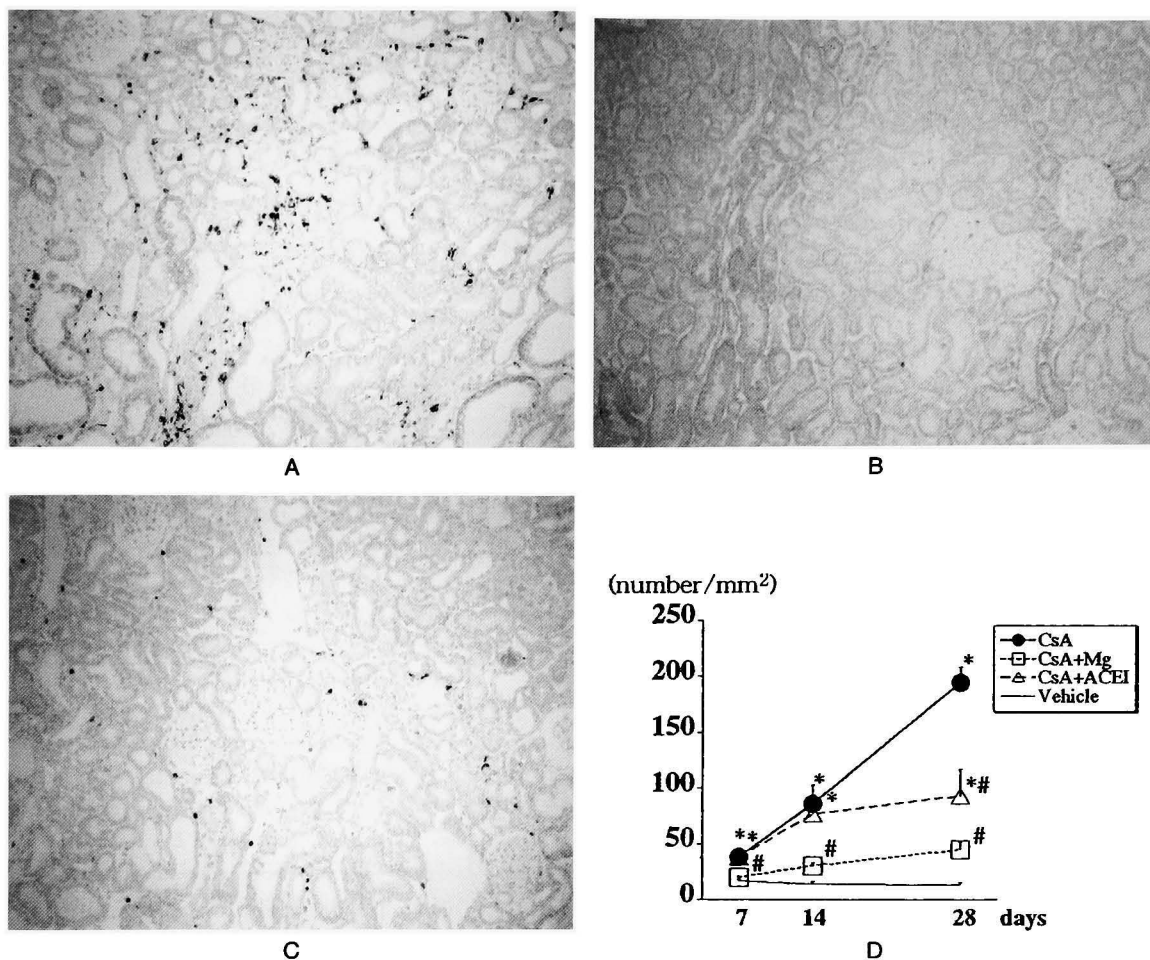


Fig. 4. Effects of Mg supplementation and angiotensin converting enzyme inhibitor on renal cortical infiltration of monocyte/Mφ. CsA-treated rats showed a marked influx of ED-1 positive cells at day 28 (A). It was almost completely abolished with Mg supplementation (B) and partially suppressed with benazepril treatment (C). D. Time course of the number of monocyte/Mφ infiltration among CsA, CsA+Mg, CsA+ACEI and Vehicle group. * $p < 0.05$ compared to Vehicle group. # $p < 0.05$ compared to CsA group.

囊にも軽度の染色が見られた (Fig. 5A, D). Mg 補給により, 実験期間を通じてほぼ完全に OPN 発現は抑制されたが (Fig. 5B, D), ACEI では28日目に部分的な抑制を認めるのみであった (Fig. 5C, D).

考 察

CsA 腎毒性に対して Mg 補給は線維化に関与する様々な遺伝子発現を著明に抑制し, 最終的に CsA 慢性腎毒性の進展をほぼ完全に抑制することが示された. 一方, ACEI による抑制効果はいずれも部分的であるか, 抑制を認めないものもあった.

Monocyte/Mφ 浸潤が尿細管間質線維化に先行し, その進展に関与することは, CsA 腎毒性^{7,8)}を含む様々な実験モデルで報告されている^{9,10)} OPN は Mφ 遊走因子の1つとして知られており¹¹⁾, CsA 腎毒性における炎症細胞浸潤に中心的な役割を果たしていると考えられている⁴⁾ また今回, 別の monocyte/Mφ 遊走因子である MCP-1 の発現亢進とも単核球

の浸潤が付随していることが示され, OPN, MCP-1 両者が協同して monocyte/Mφ の浸潤を誘導することが示唆された. Mg による炎症細胞浸潤の抑制は, この両遊走因子を抑制したことに関係していると考えられ, 遊走因子の抑制による monocyte/Mφ 浸潤の完全な抑制は, Mg 補給による線維化の進展抑制の上流に位置するメカニズムの1つであると考えられた. また, ACEI が CsA による monocyte/Mφ 浸潤および遊走因子の発現を部分的にしか抑制しなかったことより, このメカニズムは大部分 RAS 非依存的であることが強く示唆された.

今回の研究やこれまでの報告^{2,4,5)}で見られる RAS 阻害による線維化促進遺伝子群の発現抑制は常に部分的であるか, 影響を与えない場合すらあり, その一方で Mg はこれらの遺伝子発現をほぼ完全に抑制した. したがって Mg による線維化抑制機序に RAS 非依存的な機序の関与が大きいことが示唆される.

CsA は血管収縮作用により腎臓に虚血を起こし,

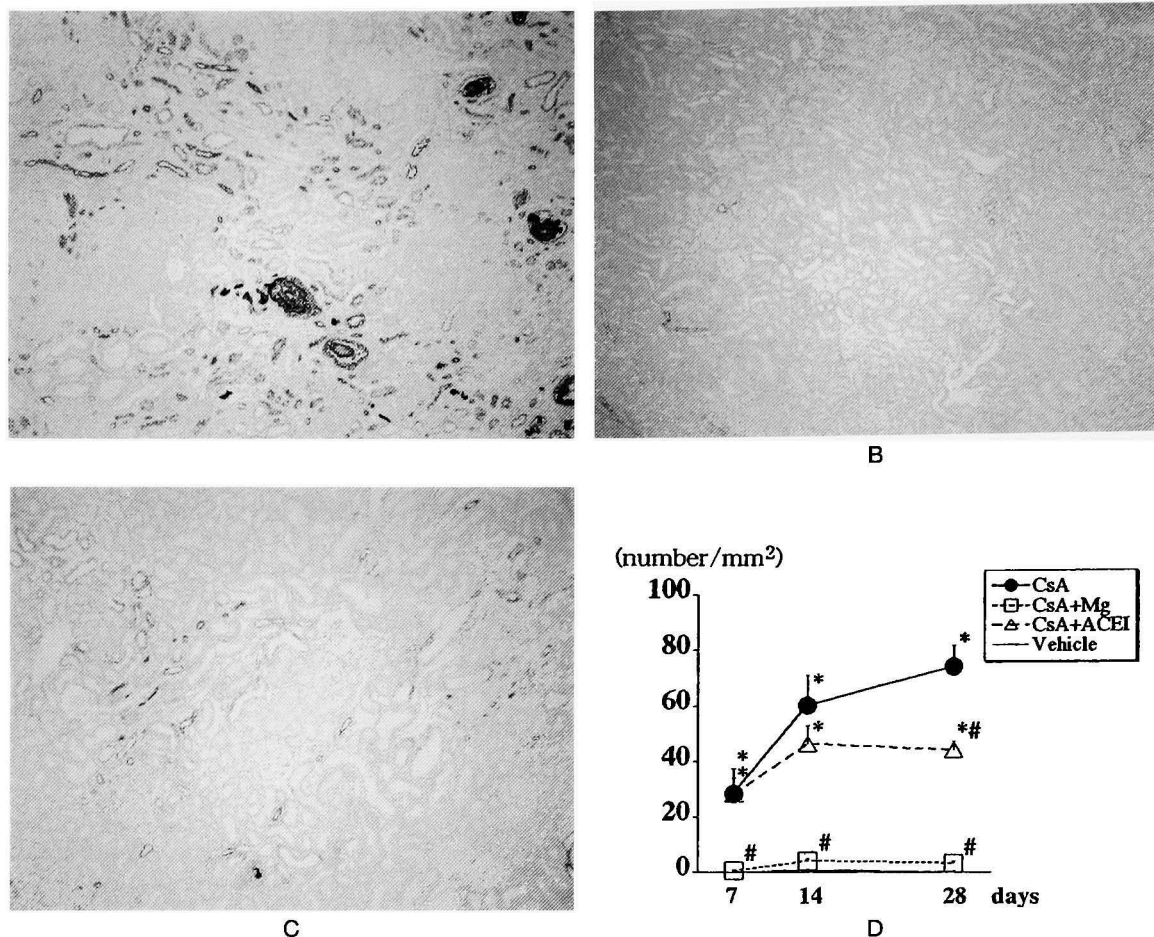


Fig. 5. Effects of Mg supplementation and angiotensin converting enzyme inhibitor on expression of OPN in renal cortex. OPN was significantly increased at day 28 in the cortex of CsA-treated rats (A). It was almost completely abolished with Mg supplementation (B) and partially suppressed with benazepril treatment (C). D. Time course of the number of OPN positive tubules among CsA, CsA+Mg, CsA+ACEI and Vehicle group. * $p < 0.05$ compared to Vehicle group. # $p < 0.05$ compared to CsA group.

糸球体濾過率が低下する¹²⁾ 低酸素は今回調べたうち、OPN^{4,13)}, MCP-1^{14,15)}, TGF- β ¹⁶⁾, PDGF-B¹⁷⁾, PAI-1¹⁸⁾, TIMP-1¹⁹⁾, そして collagen I¹⁶⁾ といった遺伝子の発現を上昇させる。Mg は CsA による糸球体濾過の低下を改善したことにより、腎血液灌流の改善が、低酸素によるこれらの遊走因子および線維化促進遺伝子発現を抑制したと考えられる。

Mg が糸球体機能を改善した機序の1つに、血管収縮因子である ET-1 の発現抑制が考えられる。興味深いことに、CsA による ET-1 遺伝子の過剰発現は ACEI によりさらに増幅され、このため ACEI は CsA による糸球体濾過率の低下を改善しなかったとも考えられる。ACEI が CsA による ET-1 発現を増幅した理由は明らかではないが、ET-1 もまた低酸素により刺激されることが知られている²⁰⁾。ACEI は著明に血圧を下げたため、低血圧が CsA による低酸素状態を悪化させさらに ET-1 発現を増加させたのではないかと考えられた。

結 語

Mg 補給は、CsA 腎毒性に対して renin-angiotensin system independent と考えられる抑制効果を示した。特に、ACE 阻害剤では認められなかったが、早期から monocyte/M ϕ の浸潤およびその遊走因子に対してほぼ完全な抑制効果を示していたことが、その後の線維化促進遺伝子発現の亢進を著明に抑制し、最終的に CsA 慢性腎毒性の組織学的変化をほぼ完全に抑制したと考えられる。

文 献

- 1) de Mattos AM, Olyaei AJ and Bennett WM: Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* **35**: 333-346, 2000
- 2) Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, et al.: Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol* **269**: F491-499, 1995

- 3) Kon V, Hunley TE and Fogo A: Combined antagonism of endothelin A/B receptors links endothelin to vasoconstriction whereas angiotensin II effects fibrosis. Studies in chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Transplantation* **60**: 89-95, 1995
- 4) Pichler RH, Franceschini N, Young BA, et al.: Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* **6**: 1186-1196, 1995
- 5) Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, et al.: Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* **52**: 660-673, 1997
- 6) Miura K, Nakatani T, Asai T, et al.: Role of hypomagnesemia in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* **73**: 340-347, 2002
- 7) Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, et al.: Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* **48**: 439-448, 1995
- 8) Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, et al.: Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* **59**: 1626-1640, 2001
- 9) Morrissey JJ and Klahr S: Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemo-attractant and adhesion molecule synthesis. *Am J Physiol* **274**: F580-586, 1998
- 10) Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, et al.: Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney Int* **58**: 1664-1676, 2000
- 11) Oldberg A, Franzen A and Heinegard D: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8819-8823, 1986
- 12) Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, et al.: Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol* **275**: F595-604, 1998
- 13) Persy VP, Verstrepen WA, Ysebaert DK, et al.: Differences in osteopontin up-regulation between proximal and distal tubules after renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* **56**: 601-611, 1999
- 14) Ivacko J, Szaflarski J, Malinak C, et al.: Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 759-770, 1997
- 15) Shoskes DA: Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation* **66**: 147-152, 1998
- 16) Orphanides C, Fine LG and Norman JT: Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int* **52**: 637-647, 1997
- 17) Shehata M, el Nahas M, Barkworth E, et al.: Localization of PDGF-BB in the juxtaglomerular cells of cyclosporin-treated rats. *Exp Nephrol* **3**: 173-179, 1995
- 18) Basile DP, Martin DR and Hammerman MR: Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair. *Am J Physiol* **275**: F894-903, 1998
- 19) Norman JT, Clark IM and Garcia PL: Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* **58**: 2351-2366, 2000
- 20) Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, et al.: Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* **88**: 1054-1057, 1991

(Received on June 21, 2002)

(Accepted on July 4, 2002)