



Renoprotective immunosuppression by pioglitazone with low-dose cyclosporine in rat heart transplantation

田中, 陽介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4721

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004721>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	田中 陽介
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4721 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Renoprotective immunosuppression by pioglitazone with low-dose cyclosporine in rat heart transplantation（ラット異所性心移植モデルにおける低用量サイクロスポリン併用下ピオグリタゾンによる腎保護免疫抑制効果についての検討）

審 査 委 員

主 査	教 授	林 祥剛
	教 授	藤澤 正人
	准教授	深川 雅史

学位論文の内容要旨

**Renoprotective immunosuppression by pioglitazone with low-dose cyclosporine
in rat heart transplantation**

ラット異所性心移植モデルにおける低用量サイクロスポリン併用下
ピオグリタゾンによる腎保護免疫抑制効果についての検討

神戸大学大学院医学系研究科 医科学専攻
心臓血管外科学
(指導教員：大北 裕教授)

田中 陽介

【背景】最新の免疫抑制剤によって心移植グラフトおよびレシピエントにおける急性拒絶反応の抑制は良好な結果を得ている。特にサイクロスポリンのようなカルシニューリンインヒビターは第一選択薬として移植後の免疫抑制に重要な役割を果たしている。

しかしながらサイクロスポリンの副作用である腎機能障害は依然重大な問題として存在し、かかる症例に対し腎機能を評価しつつ、安全でかつ効果的な最小量の投与を余儀なくされているのが現状である。臨床においては mycophenolate mofetil (MMF)、ステロイド、sirolimus、everolimus などの薬剤と少量のサイクロスポリンを用いて多剤併用の免疫抑制療法が行われている。

ピオグリタゾンを含むチアゾリン誘導体は PPAR γ の受容体活性化薬としてインシュリン刺激による糖尿病治療薬として知られている。特に最近では抗炎症作用に加え実験レベルにて多面発現性の心保護作用、腎保護作用が報告されている。

心移植においてピオグリタゾンによる移植片生存率を改善する報告はマウスモデルにて行われているが、そのメカニズムや腎保護作用については十分議論されていない。また non-surgical model においてサイクロスポリンによる腎障害に対しピオグリタゾンが腎保護作用を発揮する報告がなされているが、心移植モデルにおける減量サイクロスポリンとピオグリタゾンを併用した検討は未だ報告されていない。

本実験の目的は心移植におけるピオグリタゾンによる免疫抑制効果と腎保護作用および、サイクロスポリンの減量である。

【方法】

【実験動物】Rat (雄、生後 16 週、280g から 300g)

種：Lewis (RT¹), Brown-Norway (RTⁿ)

【薬】pioglitazone (経口投与)、cyclosporine (皮下注射)

【移植方法】腹部異所性心移植 (Ono and Lindsey 法)

【実験群】

Group I : Lewis Brown-Norway no treated (control)
Group II : Lewis Brown-Norway low-dose CsA (2mg/kg)
Group III : Lewis Brown-Norway high-dose CsA (5mg/kg)
Group IV : Lewis Brown-Norway low-dose CsA (2mg/kg)+pioglitazone (3mg/kg)
各 group n = 6 とし上記の実験群を 2 セット

※ graft survival (触診) 群 と一週間後を end-point とし移植心、レシピエント腎を摘出した群により腎障害および急性拒絶の評価を行った

※ 移植 3 日前よりピオグリタゾンは内服開始

【評価方法】

- ・急性拒絶反応：H E 染色 international society for Heart and lung transplantation (ISHLT)により0から4の5段階評価
：免疫染色 (CD4, CD8) 10 視野の陽性細胞数をカウント
- ・サイトカイン：IL-2, INF- γ , TGF β の定量化 (ELISA)
- ・腎機能：BUN, Cre, Cre clearance
：アポトーシスなど TUNEL 染色、蛍光抗体法 (TGF- β 1, Bax, PPAR γ)

【結果】

- ・graft survival：(Fig1) low-dose サイクロスポリンのみでは十分な Graft survival を得ることが出来ず、ピオグリタゾンが付加することにより劇的に改善され graft survival の有意な延長を確認した。
- ・急性拒絶：(Fig 2A, B) HE, CD4, CD8 共に Group I にて最も急性拒絶の程度が強く、Group II (low-dose サイクロスポリンのみ) では免疫抑制効果は十分ではない。Group IV (ピオグリタゾンと low-dose サイクロスポリン) は Group III (high-dose サイクロスポリン) と同程度であった。
- ・サイトカイン：(Fig 3) サイクロスポリンにより INF γ および IL-2 は用量依存性に抑制されている。ピオグリタゾンの付加により Group III (high-dose サイクロスポリン) と同程度に (有意差なし) 抑制することが出来た。
- ・腎機能：(Fig 4) サイクロスポリンにより BUN, Cre, Cre clearance の値は用量依存性に腎障害を示す値を認めるがピオグリタゾンの付加により有意に改善されている
- ・腎細胞アポトーシス：(Fig 5A, B) TUNEL 染色および Bax 蛍光抗体法にてサイクロスポリン用量依存性にアポトーシスの進行を認めるが、ピオグリタゾンの付加により有意に改善されている。
- ・腎臓における PPAR γ 、TGF- β 1 の発現：(Fig 6A,B) ピオグリタゾンの付加により PPAR γ の発現が強くなり、TGF- β 1 はサイクロスポリンの用量依存性に発現が強い。ピオグリタゾンの付加により TGF- β 1 の発現は有意に抑制されている。

【考察】今回我々は PPAR γ の作動薬であるピオグリタゾンがラットの心移植モデルにおいてサイクロスポリンの腎障害に対し免疫抑制効果と腎保護効果によるサイクロスポリンの減量を証明した。これまで Pereira らのラットによる実験 (non-surgical setting) にて、サイクロスポリンがもたらす腎障害に対しピオグリタゾンの腎保護と免疫抑制効果を示した報告は存在するが、その際 28 日目の慢性腎障害に対する検討であった。

今回我々の報告は 7 日目の急性拒絶に対する検討を行い、ラット心移植モデルの実験において①ピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは high dose

サイクロスポリンと同等の graft survival 延長をもたらした。②サイクロスポリンによる腎障害を有意に抑えた。移植後にサイクロスポリン使用により腎機能障害を来すことは重大な問題の1つであるので、ピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンの併用は心移植患者においても有用である。

レシピエントの腎臓においてピオグリタゾンが PPAR γ の発現を増強させる事は不思議ではない。これまでの報告にて腎細胞における mRNA および PPAR γ の活性をピオグリタゾンが増強させた報告があり、チアゾリン誘導体である PPAR γ 活性化薬が抗炎症作用や 抗増殖作用をもって、心臓と腎臓の両方を保護する事を証明した報告もある。よって PPAR γ 活性化薬であるピオグリタゾンには潜在的に graft 保護作用や腎保護作用を兼ね備えていることは明らかである。

今回の検討にてサイクロスポリンは用量依存性に腎機能障害を来し、その指標として移植後 1 週間目の BUN やクレアチニン値の上昇、クレアチニン・クリアランス値の低下を認めた。病理組織学的所見では glomerular 細胞や tubular epithelial 細胞のアポトーシスとして確認された。

最近では腎細胞のアポトーシスは腎壊死を含む慢性腎機能障害の進展の元となる最も根源的な病態であり。今回の報告にてピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンはレシピエントの腎臓に対し有意に機能的および組織学的障害の両方を抑制した、以上よりピオグリタゾンはサイクロスポリンによる腎障害に対し良好な腎保護作用を発揮することが示された。

TGF- β は腎疾患において fibrotic change における重要な役割を果たす多機能性サイトカインの一つであり、サイクロスポリンの投与による腎臓の機能的、組織学的変化に伴い TGF- β も増加するとの報告がある。今回の検討にて腎臓の TGF- β 1 はサイクロスポリンの用量に依存して増加を示した。しかしながらピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは High dose や low dose サイクロスポリン単独に比べ TGF- β 1 の増殖を有意に抑制した。最近の報告では TGF- β の発現抑制に PPAR γ 活性化薬が関与し、結果として新生内膜形成を抑制していると述べられ、さらに TGF- β は腎細胞においてアポトーシスの指標であるとの報告がある。TGF- β 1 の発現抑制はサイクロスポリンによる腎障害に対しピオグリタゾンが関与する腎保護作用の重要なメカニズムの1つかも知れない。

これまでカルシニューリンインヒビターであるサイクロスポリンは用量依存性に IL-2 および INF γ を抑制することは知られている。IL-2 および INF γ は拒絶反応により産生されるサイトカインでありサイクロスポリンの薬学的免疫抑制機能を評価するうえで重要な指標となっている。またチアゾリン誘導体は IL-2 または INF γ の分泌の中間抑制を行う報告がある。移植後の免疫抑制を成功させる上でサイクロスポリンによる腎機能障害を最小限にし、graft の拒絶反応

を抑えることは重要である。この点においてピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは心移植において免疫抑制効果を発揮する際①high dose サイクロスポリンと同等の免疫抑制効果があり②high dose サイクロスポリンよりも腎障害が少なく、特に low dose サイクロスポリン単独よりも腎機能障害を軽減できたことは注目に値する。我々はピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは相乗効果を持って graft 保護作用とサイクロスポリンによる腎機能障害を保護すると確信している。

またピオグリタゾンは心嚢液貯留、心不全、骨折、肝細胞障害などの副作用を有すると報告されているが、ピオグリタゾンは様々な advantage を有する優秀な薬剤であり、また以前の報告として我々と同じ用量 (3mg/kg/day) で本実験と異なった報告をした論文は存在する。また臨床において low dose サイクロスポリンと他の薬との併用は移植術後の免疫抑制療法として確立している。例えば、ステロイドもまた臓器移植においてサイクロスポリンと同程度の重要な免疫抑制剤として認識されている。しかしながらステロイドは術後の冠動脈病変を増加させる可能性があるとの報告もあり、ピオグリタゾンはステロイドと薬理学的同位体であるためステロイドに取って代わる役割を果たすかも知れない。

今回の検討における limitation は、第一に心移植モデルが異所性の non-working モデルであること。これについては以前より心移植モデルとして確立しており様々な報告がなされている。しかしながら臨床における心移植とはいくつかの点で相違が存在することは否定できない。第二に今回の検討ではピオグリタゾンとサイクロスポリンについて dose-response および time-response についての評価が出来ていない。最後にピオグリタゾン治療中における発現経路を real-time PCR などを用いて m-RNA について検討していない。

結論、ピオグリタゾンは low dose サイクロスポリンとの併用にて心移植片およびレシピエントの腎臓に対し相乗的な保護効果を有する。ピオグリタゾンは low dose サイクロスポリンとの併用により免疫抑制効果を有し、かつサイクロスポリンによる腎機能障害を最小限に抑える効果を有する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2042号	氏 名	田中 陽介
論文題目 Title of Dissertation	Renoprotective immunosuppression by pioglitazone with low-dose cyclosporine in rat heart transplantation ラット異所性心移植モデルにおける低用量サイクロスポリン併用下ピオグリタゾンによる腎保護免疫抑制効果についての検討		
審査委員 Examiner	主 査 林 祥岡 Chief Examiner 副 査 蔭澤 一人 Vice-examiner 副 査 浮川 雅史 Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

最新の免疫抑制剤は、心移植グラフトおよびレシピエントにおける急性拒絶反応の抑制において良好な結果を示しているが、サイクロスポリンの副作用である腎機能障害は依然重大な問題として存在している。本研究は PPAR γ の作動薬であるピオグリタゾンによるラット心移植モデルにおけるサイクロスポリンの腎障害に対する免疫抑制効果と腎保護効果について報告したものである。これまで Pereira らのラットによる慢性腎障害に対する検討であった。本研究は、7 日目の急性拒絶に対する検討を行い、ラット心移植モデルの実験において（1）ピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは high dose サイクロスポリンと同等の *graft survival* 延長をもたらした。（2）サイクロスポリンによる腎障害を有意に抑えることを明らかにした。今回の検討において、サイクロスポリンは用量依存性に腎機能障害を来し、その指標として移植後 1 週間目の BUN やクレアチニン値の上昇、クレアチニン・クリアランス値の低下を認めた。病理組織学的所見では glomerular 細胞や tubular epithelial 細胞のアポトーシスとして確認された。ピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンはレシピエントの腎臓に対し有意に機能的および組織学的障害の両方を抑制したことにより、ピオグリタゾンはサイクロスポリンによる腎障害に対し良好な腎保護作用を発揮することが示された。TGF- β 1 は腎疾患の fibrotic change における重要な役割を果たすが、今回の検討で、ピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは high dose や low dose サイクロスポリン単独に比べ TGF- β 1 の増殖を有意に抑制した。TGF- β 1 の発現抑制はサイクロスポリンによる腎障害に対しピオグリタゾンが関与する腎保護作用の重要なメカニズムの 1 つかも知れない。また、カルシニューリンイノヒビターであるサイクロスポリンは用量依存性に IL-2 および INF γ を抑制することは知られている。IL-2 および INF γ は拒絶反応により産生されるサイトカインでありサイクロスポリンの薬力学的免疫抑制機能を評価するうえで重要な指標となっている。またチアゾリン誘導体は IL-2 または INF γ の分泌の中間抑制を行う報告がある。移植後の免疫抑制を成功させる上でサイクロスポリンによる腎機能障害を最小限にし、*graft* の拒絶反応を抑えることは重要である。この点においてピオグリタゾンと low dose サイクロスポリンは心移植において免疫抑制効果を発揮する際、high dose サイクロスポリンと同等の免疫抑制効果があり、high dose サイクロスポリンよりも腎障害が少なく、特に low dose サイクロスポリン単独よりも腎機能障害を軽減できたことは注目に値する。また、ピオグリタゾンは心嚢液貯留、心不全、骨折、肝細胞障害などの副作用を有すると報告されているが、ピオグリタゾンは様々な *advantage* を有する優秀な薬剤である。臨床において low dose サイクロスポリンと他の薬との併用は移植術後の免疫抑制療法として確立している。ステロイドもまた臓器移植においてサイクロスポリンと同程度の重要な免疫抑制剤として認識されているが、ステロイドは術後の冠動脈病変を増加させる可能性があるとの報告もあり、ピオグリタゾンはステロイドと薬理学的同位体であるためステロイドに取って代わる役割を果たすかも知れない。今回の報告では、心移植モデルが異所性の non-working モデルであること、ピオグリタゾンとサイクロスポリンについて dose-response および time-response についての評価が出来ていない、ピオグリ

タゾン治療中における発現経路を real-time PCR などを用いて m-RNA について検討していないなど、今後の課題も存在するが、多くの新しい知見も提示されている。

本研究は、ピオグリタゾンが low dose サイクロスポリンとの併用において心移植片およびレシピエントの腎臓に対し保護効果を有するかどうかを検討した研究であるが、従来明らかではなかったピオグリタゾンの low dose サイクロスポリンとの併用により免疫抑制効果を有していることを示し、かつサイクロスポリンによる腎機能障害を最小限に抑える効果を有することを示した研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。