

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

令和 5 年 3 月

近畿大学大学院

医学研究科

学位論文審査結果の報告書

氏 名 李 進海

生 年 月 日 1982年 9月 24日

本 籍 (国 籍) 中国

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 1405 号

学位授与の条件
(博士の学位) 学位規定第5条

論 文 題 目

Deletion of Antigen-Presenting Cells in Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury (AKI) Affects the Exacerbation and Repair in AKI

リポ多糖による急性腎障害 (AKI) における抗原提示細胞の欠失はAKIの増悪と修復に影響する

学位論文受理日 2022年 11月 14日

学位論文審査終了日 2023年 1月 26日

審 査 委 員 (主 査) 杉本 圭 相

(副主査) 角田 郁生

(副主査) 高橋 英夫

指 導 教 員 松村 到

論文内容の要旨

【目的】

急性腎障害(AKI)の病態は複雑であり、様々な免疫・炎症反応が関与しており、最近では、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が急性腎障害において病態や病期によって多様な機能を持つことが報告されている。特に、敗血症性腎障害における抗原提示細胞の役割の解明が、有効な治療法の開発に有効と考えられる。本研究では、AKIの急性期および回復期における組織傷害と修復において炎症細胞浸潤の動態を明らかにすることを目的とし、リポ多糖(lipopolysaccharide, LPS)投与によるAKI発症のマウスモデルでリポソームクロドロンート(liposomal clodronate, LC)の事前投与によりマクロファージと樹状細胞を枯渇させ、LPS投与後の腎機能の推移、病理学的変化、サイトカイン産生の変化を評価することとした。

【方法】

6-8週齢のC57BL/6マウスに、LCまたは生理食塩水を投与し(各群 n=20)、48時間後に全マウスに30mg/kgのLPSを腹腔内投与した。18時間後(各群 n=10)、120時間後(各群 n=10)にマウスから血液および腎臓組織を採取した。

【結果】

LPS+LC群は、LPS群と比較してLPS注入後120時間後に高い生存率(50.0% vs, 16.1%, $p<0.01$)を示した。LC投与自体はBUN値に影響せず、LPS投与18時間後のBUN値は、LPS+LC群ではLPS群と比較して有意に低値(81.7 vs. 89.6 mg/dL, $p<0.05$)であり、120時間後では逆に高値であった(37.2 vs. 30.7 mg/dL, $p<0.005$)。急性尿管壊死(ATN)スコアも、LPS+LC群ではLPS群と比較して18時間後に低値(1.2% vs. 1.5%, $p<0.05$)、120時間後に高値(0.8% vs. 0.3%, $p<0.01$)であった。フローサイトメトリーを用いた解析では、18時間後における腎臓へのマクロファージ(F4/80⁺CD11b⁺細胞)、樹状細胞(F4/80⁺CD11c⁺細胞)の浸潤は、LPS+LC群でLPS群に比し、有意に減少していた(マクロファージ: 3.2% vs. 5.0%; 樹状細胞: 1.4% vs. 3.1% [共に $p<0.005$])。120時間後では、逆にマクロファージ(1.4% vs. 2.7%)、樹状細胞(0.4% vs. 1.0%)ともにLPS+LC群で増加を示した(共に $p<0.001$)。免疫組織染色においても、18時間後のLPS+LC群では糸球体および間質でのF4/80⁺, CD68⁺, 尿管障害マーカーTubular kidney injury molecule-1(KIM-1)⁺細胞数が有意に減少し、120時間後では逆に有意な増加を示した。一方、CD4⁺, CD8⁺のT細胞数は、18、120時間後で両群に差はなかった。血清中のIL-18/IFN- γ /TNF値は、18時間後ではLPS+LC群ではLPS群と比較して有意に低値であったが、120時間後ではIL-18/TNF値が有意に高く、IFN- γ 値も高い傾向を示した。腎細胞を用いたリアルタイムPCRでは、LPS+LC群で18時間後にサイトカイン(IFN- γ /TNF/IL-6/IL-18)、ケモカイン(CCL2/MCP-1)、KIM-1、Th細胞サブセット転写因子T-bet、白血球接着分子ICAM-1が有意に低発現であり、120時間後ではIL-6/MCP-1/KIM-1が高発現していた。

【考察】

LC投与が急性腎障害における組織傷害を抑制し、回復期において組織修復の遅延に影響を与えることを示唆している。本研究では他の細胞の識別が行えていないこと、細胞特異的な機能の評価が出来ていない点などについてはさらなる実験が必要と考えるが、今後の敗血症性急性腎障害への治療戦略への一助になることが考えられた。

【結論】

この実験からLPSによるAKIにおいて、マクロファージと樹状細胞は、炎症性サイトカインやケモカインの産生を介して、組織損傷とそれに伴う修復に異なる役割を担っていることを明らかにした。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類および名称
	2022年11月14日 公表 (DOI : https://doi.org/10.3390/cimb44110383)	博士学位論文 Current Issues in Molecular Biology
	全 文	Deletion of Antigen-Presenting Cells in Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury (AKI) Affects the Exacerbation and Repair in AKI

論文審査結果の要旨

1) 論文内容の要旨

【目的】

急性腎障害 (AKI) の病態は複雑であり、様々な免疫・炎症反応が関与しており、最近では、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が AKI において病態や病期によって多様な機能を持つことが報告されている。特に、敗血症性腎障害における抗原提示細胞の役割の解明が、有効な治療法の開発に有効と考えられる。本研究では、AKI の急性期および回復期における組織傷害と修復において炎症細胞浸潤の動態を明らかにすることを目的とし、リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 投与による AKI 発症のマウスモデルでリポソームクロドロンート (liposomal clodronate, LC) の事前投与によりマクロファージと樹状細胞を枯渇させ、LPS 投与後の腎機能の推移、病理学的変化、サイトカイン産生の変化を評価することとした。

【方法】

6-8 週齢の C57BL/6 マウスに、LC または生理食塩水を投与し (各群 n=20)、48 時間後に全マウスに 30 mg/kg の LPS を腹腔内投与した。18 時間後 (各群 n=10)、120 時間後 (各群 n=10) にマウスから血液および腎臓組織を採取した。

【結果】

LPS+LC 群は、LPS 群と比較して LPS 注入後 120 時間後に高い生存率 (50% vs. 16.1%, $p < 0.01$) を示した。LC 投与自体は BUN 値に影響せず、LPS 投与 18 時間後の BUN 値は、LPS+LC 群では LPS 群と比較して有意に低値 (81.7 vs. 89.6 mg/dL, $p < 0.05$) であり、120 時間後では逆に高値であった (37.2 vs. 30.7 mg/dL, $p < 0.005$)。急性尿管壊死 (ATN) スコアも、LPS+LC 群では LPS 群と比較して 18 時間後に低値 (1.2% vs. 1.5%, $p < 0.05$)、120 時間後に高値 (0.8% vs. 0.3%, $p < 0.01$) であった。フローサイトメトリーを用いた解析では、18 時間後における腎臓へのマクロファージ (F4/80+CD11b+細胞)、樹状細胞 (F4/80+CD11c+細胞) の浸潤は、LPS+LC 群で LPS 群に比し、有意に減少していた (マクロファージ: 3.2% vs. 5.0%; 樹状細胞: 1.4% vs. 3.1% [共に $p < 0.005$])。120 時間後では、逆にマクロファージ (1.4% vs. 2.7%)、樹状細胞 (0.4% vs. 1.0%) ともに LPS+LC 群で増加を示した (共に $p < 0.001$)。免疫組織染色においても、18 時間後の LPS+LC 群では糸球体および間質での F4/80+, CD68+, 尿管障害マーカー tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1)+細胞数が有意に減少し、120 時間後では逆に有意な増加を示した。一方、CD4+, CD8+ の T 細胞数は、18、120 時間後で両群に差はなかった。血清中の interleukin (IL)-18/interferon (IFN) γ /tumor necrosis factor (TNF) 値は、18 時間後では LPS+LC 群では LPS 群と比較して有意に低値であったが、120 時間後では IL-18/TNF 値が有意に高く、IFN- γ 値も高い傾向を示した。腎細胞を用いたリアルタイム PCR では、LPS+LC 群で 18 時間後にサイトカイン (IFN- γ /TNF/IL-6/IL-18)、ケモカイン [CCL2/monocyte chemoattractant protein (MCP)-1]、KIM-1、ヘルパー T 細胞サブセット転写因子 T-bet、白血球接着分子 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 が有意に低発現であり、120 時間後では IL-6/MCP-1/KIM-1 が高発現していた。

【考察】

LC 投与が AKI における組織傷害を抑制し、回復期において組織修復の遅延に影響を与えることを示唆している。本研究では他の細胞の識別が行えていないこと、細胞特異的な機能の評価が出来ていない点などについてはさらなる実験が必要と考えるが、今後の敗血症性 AKI への治療戦略への一助になることが考えられた。

【結論】

この実験から LPS による AKI において、マクロファージと樹状細胞は、炎症性サイトカインやケモカインの産生を介して、組織損傷とそれに伴う修復に異なる役割を担っていることを明らかにした。

2) 審査結果の要旨

李進海氏の博士学位論文に対する最終試験は、令和4年12月26日の17時から小講堂で実施された。申請者は、極めて多忙な血液膠原病内科医として診療を行うばかりでなく、臨床で生じた根源的な問いに対して適切な研究デザインにより詳細に解明する有意義な研究を行ったと認められた。

まず、李氏が本研究を行なうに至った背景、対象と方法、結果と考察を口頭で発表し、それに対し、主査である杉本、副主査である角田、高橋両教授がいくつかの疑問点を質問した。

角田教授からは、実臨床では敗血症を起こす前からマクロファージを枯渇させることはできない。そこで臨床に即した実験として、LPS 投与後の超急性期にマクロファージを枯渇させた場合はどんな結果が予想されるか、LC 投与によるマクロファージの枯渇はどの程度続くものか、LC 投与群で慢性期にAKIの回復が遅れるのはリバウンドである可能性があるのではLPS投与後4~5日でマクロファージを再枯渇させたらどのような結果となるかが予想されるのか、などが質問された。高橋教授からは、相転移はいつ、どのように起こっているのか、LC 投与によるマクロファージの viability の変化はどうか、臨床にはどのようにフィードバックするのか、などについて質問があった。さらに、杉本からは、化学療法中で免疫不全状態になった患者における AKI を想定するものなのか、マクロファージの枯渇による全身への影響はどうか、病理組織評価において糸球体変化はどうであったか、組織評価においてマクロファージ浸潤部位の意義、そして KIM-1 との関連性などに関して質問した。

これらの質問に対し李氏は具体的な過去の報告や自教室の基礎実験結果を挙げながら的確に応答した。最終試験の内容および論文内容から、学位論文が AKI の病態に関する独創的で有意義な研究であることが確認された。また李氏が専門分野に関して十分な専門的知識・能力を持っていることが確認された。さらに、李氏が優れた研究の計画、遂行、データ解析、論文執筆能力を有し、今後、研究者として独立して、自ら研究を遂行し、新たな研究者を指導する能力を有することが確認された。したがって、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が確かに李進海氏の研究成果であること、学位授与にふさわしい人格、学識と研究能力、研究指導能力を持つことを確認し、最終試験を合格とした。

3) 最終試験の結果：
合格

4) 学位授与の可否：
可