

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08252

研究課題名(和文) エンドセリンとエストロゲンによる虚血性臓器障害の制御と性差

研究課題名(英文) Regulation of ischemic organ injury by endothelin and estrogen and sex difference

研究代表者

大喜多 守 (Ohkita, Mamoru)

大阪薬科大学・薬学部・准教授(移行)

研究者番号：60449824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性急性腎障害には性差が存在すること、また本病態に対しては選択的エンドセリン(ET)A受容体拮抗薬が奏功すること、その一方で、雌性ラットの虚血性急性腎障害においては女性ホルモンの有無によって選択的ETA受容体拮抗薬の効果に明らかな差が生じることを認め、本病態の発症とその雌雄差発現にはET-1/ETA受容体システムが密接に関わる可能性が示唆された。さらにETB受容体遺伝子欠損ラットを用いた検討から、虚血性急性腎障害の性差発現にはETB受容体も重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：There are significant sex difference in ischemic acute kidney injury (AKI). A selective endothelin (ET) A receptor antagonist showed renoprotective effects in male but not female AKI rats. In addition, there was a clear difference in the effects of selective ETA receptor antagonist depending on the presence or absence of female sex hormones, suggesting that ET-1/ETA receptor system is closely involved in the pathogenesis of AKI and sex difference in AKI. Furthermore, from the studies using ETB receptor-deficient rats, it became clear that ETB receptor also plays an important role in gender difference of AKI.

研究分野：基礎医学・薬学(薬理学)

キーワード：エンドセリン エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

エンドセリン(ET) - 1 の発見以来二十数年が経過し、この間の精力的な研究により ET-1 の生理学的および病態生理学的役割が数多く解明され、現在は肺動脈性肺高血圧症の治療に ET 受容体拮抗薬(非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬・選択的 ET_A 受容体拮抗薬)が臨床応用されている。

虚血性急性腎障害は、一時的な腎臓への血流遮断とそれに引き続く再灌流によって発症し、虚血再灌流を受けた臓器では、深刻な臓器不全や組織障害が引き起こされることが知られている。我々はこれまでに、ラットおよびマウス虚血性急性腎障害モデルを用いた検討から、本病態発症・進展に腎 ET-1 や腎交感神経系が重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、本病態に対して ET 受容体拮抗薬、転写因子 NF- κ B 活性化阻害薬並びに自発性一酸化窒素(NO)放出薬が有効である可能性を示唆してきた。

一方、我々はこれまでに虚血再灌流処置による腎機能障害の程度は、雄と比較して雌では極めて軽度であり、雌雄差があることを明らかにしている。また、女性ホルモンであるエストロゲンは NO 産生を亢進させ、動脈硬化や虚血性心疾患などに代表される心・血管系の疾病に対して保護的に働くことが知られており、本病態に対しても腎保護効果をもたらす可能性が示唆された。実際、雄性ラットおよびマウス虚血性急性腎障害モデルを用いて 17 β -estradiol (E2) の病態改善効果について検討したところ、E2 による顕著な腎保護効果を認め、この効果は E2 のエストロゲン受容体(ER)を介する PI3K/Akt 経路の活性化と、それに引き続く eNOS 活性化による NO 産生増大作用に基づくことを明らかにしている。またこの E2 による NO 産生の増大が、再灌流後に生じる腎 ET-1 産生増大の抑制に密接に関与していることも報告している。これらのことから、本病態で認められる性差発現が eNOS 由来の NO 産生能に由来する可能性が示唆された。しかしながら、eNOS ノックアウトマウスの腎虚血再灌流障害時においても依然性差が生じることから、本病態の性差発現には NO とは全く無関係の因子が関わる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

虚血性急性腎障害の発症と進展に関しては、これまでに多くの生理活性物質の関与が報告されており、障害を改善する薬剤も多岐にわたる。また本病態には、エストロゲンの作用に基づく性差が存在することも明らかにされている。一方ごく最近我々は、虚血性急性腎障害には女性ホルモンの有無に依存した異なる病態発症のメカニズムが存在する可能性を見出した。

今回の研究では、虚血性急性腎障害における性差発現のメカニズムを ET との関連から明らかにするとともに、女性ホルモン(特に

エストロゲン)の有無により生じる病態発症・進展のメカニズムの相違を明らかにし、性差医療の一端を担う学術知見と、女性の閉経・未閉経を考慮した新たな薬物治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1)実験動物および虚血性急性腎障害モデルの作製

8週齢の雌雄ラット(Sprague-Dawley系)を用い、虚血性急性腎障害モデルの作製に関しては既に我々の研究室で確立された方法を用いた(Tanaka et al., Eur. J. Pharmacol., 2012)。すなわち、右腎摘除より2週間後、麻酔下で左側腹部切開を施し、左腎を露出した後、非外傷性クリップを用いて左腎動静脈の血流を遮断し、腎臓を阻血状態にした。45 - 60分後にクリップを除去して血流を再開し、腎臓を腹腔内に戻し切開面を縫合して、これを虚血性急性腎障害モデルとした。虚血再灌流処置終了24時間後より5時間の採尿と、採血、左腎摘出を行い、各種評価に用いた。また、一部の雌性ラットにおいては、麻酔下において両側の卵巣を摘除し、1週間の回復期間を経て、上記と同様に虚血性急性腎障害モデルを作製した。なお、本病態における ET_B 受容体の病態生理学的役割については実験動物として8週齢の雌雄 ET_B 受容体遺伝子欠損(ET_B^{sl/sl})ラット並びにその野生型(ET_B^{+/+})ラットを用い、上記と同様の外科的処置を施した。

(2)腎機能・腎組織化学的評価

腎機能パラメーターとして血中尿素窒素(BUN)、血漿クレアチニン濃度(Pcr)、尿中クレアチニン濃度(Ucr)は、それぞれ市販のキット(和光純薬)を用いて測定した。また尿量(UF)よりクレアチニンクリアランス(Ccr)を算出した。

病理組織学的検討は、ホルマリン固定した腎臓をパラフィン包埋後、それぞれ4 μ mの切片を作製した。各切片はヘマトキシリン・エオシンで染色を施し、顕微鏡下において障害の程度を判定基準により評価した。

(3)PCRおよびELISA

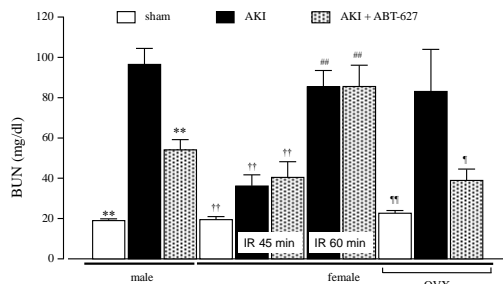
腎組織中の ET-1、ET_Aおよび ET_B 受容体遺伝子それぞれの発現量の変化は real-time RTPCR により測定した。また、腎組織および血液中の ET-1 含量と血中エストロゲン濃度は市販の ELISA キットを用いて測定した。

(4)使用薬物・薬物投与

選択的 ET_A 受容体拮抗薬である ABT-627 を虚血開始5分前に頸静脈より投与し、対照となる群のラットには溶媒(2.5% エタノール、30% ポリエチレングリコール 400 および 67.5% 生理食塩水)を投与した。

4. 研究成果

ET 受容体拮抗薬の一つである選択的 ET_A 受容体拮抗薬 (ABT-627, 1 mg/kg, i.v.) は雄性ラットの腎虚血再灌流処置 (IR) 後の腎機能低下 (血中尿素窒素および血漿クレアチニンの増大、並びにクレアチニンクリアランスの低下) に対して有意な改善効果を示した。また、IR 後の腎組織において顕著な組織障害像 (腎髄質外層外帯における尿細管壊死、内帯における鬱血出血、並びに髄質内層におけるタンパク円柱) を認め、これら組織障害は ABT-627 の投与により明らかに抑制された。一方、雌性ラットの腎機能低下および腎組織



Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. (n=6). **P < 0.01, compared with AKI male rats. #P < 0.01, compared with AKI (IR 45 min) female rats. †P < 0.01, compared with AKI (IR 60 min) female rats. *P < 0.01, †P < 0.05, compared with OVX + AKI female rats. OVX, ovariectomy. AKI, acute kidney injury.

障害は雄性ラットと同様の処置 (腎動脈虚血 45 分間) では明らかに軽度であり、60 分間虚血時は雄性ラットと同程度の悪化がみられた。大変興味深いことに、ABT-627 は雌性ラットの腎機能低下に対して、いずれの処置時間においても何ら改善効果を示さなかった。さらに、卵巣摘除 (OVX) を施した雌性ラット (腎動脈虚血 45 分間) においては雄ラットと同様の腎機能および組織障害がみられ、これらは ABT-627 投与により顕著に抑制された。なお、実験プロトコルのエンドポイント (IR 後 29 時間) での腎組織中 ET_A および ET_B 受容体遺伝子発現量並びに ET-1 含量、さらに血中 ET-1 濃度に各群間での有意な雌雄差は認められなかった。これらのことをまとめると、雌性ラットの虚血性急性腎障害においては女性ホルモンの有無によって選択的 ET_A 受容体拮抗薬の効果に明らかな差が認められ、本病態の雌雄差に ET-1/ET_A 受容体システムが密接に関わることが示唆された。また、intact な雌性ラットに対する ET_A 受容体拮抗薬投与が有効性を示さなかった理由の一つとして、内因性の女性ホルモンと ET システムをターゲットとした病態改善作用が同一のメカニズムを介している可能性が考えられた。

次に、虚血性急性腎障害における性差発現と ET_B 受容体との関連性を ET_B 受容体遺伝子欠損ラットを用いて評価した。その結果、腎虚血再灌流処置後 1 日における腎機能は野生型および ET_B 受容体遺伝子欠損ラットの雄において顕著に低下したが、genotype 間に有意な差はみられなかった。一方、野生型の雌は雄に比べて腎機能悪化の程度は弱く、統計学

的には有意ではないが、性差を認めた。さらに、ET_B 受容体遺伝子欠損ラットの雌においては、雄と同程度の腎機能の低下がみられ、性差の消失を確認した。なお再灌流 1 週間後においては、野生型の雌雄共に 1 日後と比較して明らかな腎機能の回復を認めたが、ET_B 受容体遺伝子欠損ラットの雄においてのみ依然として腎機能の低下がみられた。また、ET_B 受容体遺伝子欠損ラットの生存率は雌雄共に野生型と比較して低値を示した。以上の結果から、虚血性急性腎障害の性差発現において ET_B 受容体が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Tanaka R, Yazawa M, Morikawa Y, Tsutsui H, Ohkita M, Yukimura T, Matsumura Y. Sex differences in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury depends on the degradation of noradrenaline by monoamine oxidase. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2017 Mar;44(3):371-377.

〔学会発表〕 (計 5 件)

田中亮輔、大喜多守、松村靖夫 虚血性急性腎障害の性差発現におけるエンドセリン ET_A 受容体の役割 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016 年 10 月 (大阪)

梶川和哉、神田将哉、金崎修平、吉村徳子、津田秀俊、田中亮輔、大喜多守、松村靖夫 虚血性急性腎障害モデルラットの内皮依存性血管弛緩反応における性差について 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016 年 10 月 (大阪)

田中亮輔、岡沙佑美、金崎修平、津田秀俊、堀江香那、吉村徳子、大喜多守、松村靖夫 虚血性急性腎障害モデルラットにおける内皮依存性血管弛緩反応に関する検討 第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 (横浜)

Tanaka R, Ohkita M, Matsumura Y. Endothelin receptor antagonist protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in male but not in female rats. 14th International Conference on Endothelin, September 9-5, 2015 (Savannah, Georgia, USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushi/tu/byakuri.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大喜多 守(OHKITA MAMORU)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60449824