

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09141

研究課題名(和文) 遠隔虚血プレコンディショニングを用いた造影剤腎症への総合的治療法の開発

研究課題名(英文) The role of remote ischemic preconditioning in contrast induced nephropathy

研究代表者

伊藤 浩 (ITO, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90446047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性心疾患の診断・治療においては心臓カテーテル検査が必要となる場合があるが、一部の患者において合併疾患としての腎機能低下により、検査後の造影剤腎症を発症することがある。遠隔虚血プレコンディショニングにその予防効果があることが臨床的に示されているが、本研究ではそのメカニズムを検討した。血液中に循環するエクソソームという粒子の中身が遠隔プレコンディショニングにより変化することが明らかとなり、とくにマイクロRNAの変化が重要であることが明らかとなった。この結果は、造影剤腎症の新たな治療戦略の基盤となる情報を提供すると考えている。

研究成果の概要(英文)：Remote ischemic preconditioning (RIPC) is the phenomenon whereby brief episodes of ischemia-reperfusion applied in distant tissues or organs render the myocardial reperfusion injury. Recent clinical data showed RIPC is effective to contract induced nephropathy. This study evaluated the underlying mechanism on RIPC and found that circulating exosome was important for a mediator of RIPC. The microRNAs in exosomes were changed after RIPC. These finding suggest that further analysis of exosomes may provide novel therapy for contrast induced nephropathy.

研究分野：虚血性心疾患における再灌流障害の予防・治療

キーワード：虚血プレコンディショニング 造影剤腎症

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな臨床の領域において遠隔虚血プレコンディショニング(RIPC)が注目されている。例えば虚血性心疾患を対象とした冠動脈バイパス術や経皮的冠動脈形成術前に上腕部 200mmHg 駆血(虚血)-解放(解除)を3回くりかえすと、術後の心筋障害マーカーであるトロポニンTの増加が抑制されるという報告がなされている。さらに、心筋保護のみならず、脳、肺、肝臓や腎臓での再灌流障害に対しても保護効果があることも報告されている。一方、心臓カテーテルによる診断や治療の増加とともに、造影剤によって造影剤腎症が増加している。造影剤腎症を発症した患者では入院中に透析が必要になるだけでなく、退院後の長期予後も不良であることが報告されている。しかしながら、造影剤腎症の予防法はいまだ確立されていない。我々は最近、急性心筋梗塞患者にて緊急カテーテル検査を行う患者に対して、カテーテル前にRIPCを行うと、造影剤腎症の発症を予防できることを報告した(Yamanaka T, Ito H et al. Int J Cardiol 2014.)。しかし、RIPCの基礎的機序は未だ十分明らかでない。最近、RIPC後の血清からエクソソーム顆粒を取り除くとその効果が消失するという興味深い実験報告があった。エクソソーム内にはmicroRNAが多く含まれており、遠隔臓器の細胞に入ることによって、遺伝子発現レベルの調節を行うことができる。以上の背景から、RIPCの臓器保護効果にエクソソーム-microRNAネットワークを介した分子機序を着想するに至った。

2. 研究の目的

具体的には以下の3つの目標を設定する。

1) ラット造影剤腎症モデルにおけるRIPC後のエクソソームの質的・量的変化と腎での分子動態を明らかにする。: ラット造影剤腎症モデルにて、RIPC手技後の血液中のエク

ソソームの量的・質的(マイクロRNA)変化を解析し、腎臓でのRIPC関連マイクロRNA、遺伝子発現との比較を行いRIPCの主要な経路を明らかにする。

2) 慢性腎臓病合併冠動脈疾患患者でのRIPC後の血液中のエクソソームの質的・量的変化を明らかにする。: PCIを行う前に慢性腎臓病合併冠動脈疾患患者にRIPCを行い、ヒトのエクソソーム量的・質的变化を解析し、ラットでの基礎実験データとの比較検討から、ヒトに応用できるRIPC関連マイクロRNAネットワークを明らかにする。

3) RIPC関連microRNAの造影剤腎症に対する実験的効果を明らかにする。: ラット造影剤腎症モデルを用いて、RIPC関連microRNAを封入できるナノ粒子を応用した薬物送達システムを開発し、その効果を検証する。

3. 研究の方法

1) ラット造影剤腎症モデルにおけるRIPC後のエクソソームの変化と腎での分子動態の解明

ラットにRIPCを行い、血液中のエクソソームをRIPCの前後で回収し、エクソソーム内のmicroRNAのプロファイルをArray解析する。RIPCは血圧計のカフを改良し、覚醒下で後脚に対して(5分加圧+5分解放)×3回の手技を行う。下肢血流の完全な遮断はレーザードップラーで確認する。

ラット造影剤腎症モデルにてRIPCの効果を確認する。さらに造影剤投与後の腎臓でのmicroRNAならびに遺伝子発現プロファイルをRIPCの有無でArray解析する。ラット腎障害モデル作成は、研究連携者(熊本大学丸山徹教授)の協力を得て行う。SDラットにindomethacin (10mg/kg)とL-NMAE (10mg/kg)の投与後に造影剤(8.3 ml ioversol/kg)を投与し、24時間で血清クレアチニンが上昇するモデルを用いる。RIPCによって造影剤腎症の効果が十分得られない

場合は、別の造影剤腎症モデルとして furosemide (10mg/kg) と indomethacin (10mg/kg)の投与後に造影剤を注入する方法も検討する。RIPC にて造影剤腎症を抑制できるモデルが確立した後、腎臓でのプロファイルならびに microRNA 発現プロファイルを GeneChip(R)Array (Affymetrix 社) を用いて調べ RIPC の有無で比較検討する。

RIPC と造影剤腎症で変化する microRNA を統合的に解析することで、RIPC による造影剤腎症予防のターゲットとなる microRNA を絞り込む。microRNA の定量的評価は、リアルタイム PCR にて確認する。また、microRNA が tuning するターゲットの遺伝子についても microRNA のデータベースである mirBase などを用いて解析を進める。まず、炎症、アポトーシス、酸化ストレスなどを中心に検討し、RIPC 関連 microRNA の標的遺伝子の絞り込みを行う。

2) ヒトでの RIPC 後の血液中のエクソソームの質的・量的変化の解明(伊藤、中村、三好): 慢性腎臓病合併冠動脈疾患患者に対して同意取得後 RIPC を行う。すでに岡山大学倫理委員会の承認を得ており、すぐにでも開始できる状況である。血清のエクソソームから microRNA を精製後量的・質的变化を解析する。網羅的解析ではなく、ラットでの解析で絞り込んだ候補 microRNA を中心に解析を行い、ラットでのデータとの比較検討から、RIPC 関連 microRNA ネットワークを明らかにする。ヒト血清からのエクソソームの分離は既に行っており、western blotting にて確認している。RIPC によって量的な変化がある可能性も考えられるため、エクソソームを検出のための CD9 表面抗原を利用した定量的 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay も行う。

3) RIPC 関連マイクロ RNA の造影剤腎症に対する実験的効果の検証: RIPC 関連 microRNA の効果を、造影剤腎症ラットモデルにて検証する。申請者らはナノ粒子を用い

た薬物送達システムとして、ポリ乳酸・グリコール酸 (PGLA)を用いた実験での経験があるため、まずは PGLA に合成 RNA (siRNA と同様)を濃縮して封入し全身投与する方法を用いる。RIPC のもつ腎保護効果の分子動態についても、組織学的ならびにタンパクレベルで確認する。

4. 研究成果

第一にラットに対して RIPC 前後のエクソソームの血清からの分離を行った。さらに、エクソソームから microRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。また、ラット造影剤腎症モデルにおける腎臓でのメッセンジャー RNA の発現を正常腎臓と比較解析することで、腎障害に関連する可能性のあるエクソソーム由来の microRNA を 5 つに絞り込んだ。細胞実験でその効果をまず確認した。過酸化水素によるアポトーシスを抑制する効果のある microRNA を同定した。In vivo での実験を継続して行っており、その生態での効果を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Miyoshi T, Ejiri K, Kohno K, Nakahama M, Doi M, Munemasa M, Murakami M, Takaishi A, Kawai Y, Sato T, Sato K, Oka T, Takahashi N, Sakuragi S, Mima A, Enko K, Hosogi S, Nanba S, Hiramami R, Nakamura K, Ito H; RINC Study Collaborators. Effect of remote ischemia or nicorandil on myocardial injury following percutaneous coronary intervention in patients with stable coronary artery disease: A randomized controlled trial. Int J Cardiol. 2017 Jun 1;236:36-42. doi:

- 10.1016/j.ijcard.2017.02.028. Epub 2017 Feb 10. PMID:28214082
2. Nosaka K, Miyoshi T, Iwamoto M, Kajiya M, Okawa K, Tsukuda S, Yokohama F, Sogo M, Nishibe T, Matsuo N, Hirohata S, Ito H, Doi M. Early initiation of eicosapentaenoic acid and statin treatment is associated with better clinical outcomes than statin alone in patients with acute coronary syndromes: 1-year outcomes of a randomized controlled study. *Int J Cardiol.* 2017 Feb 1;228:173-179. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.105. Epub 2016 Nov 9. PMID:27865182
- [学会発表](計 7 件)
1. T. Yamanaka T. Miyoshi K. Ejiri K. Kohno M. Nakahama M. Doi M. Munemasa M. Murakami A. Takaishi K. Nakamura H. Ito. Comparison of renal outcome with remote ischemic preconditioning versus nicorandil following percutaneous coronary intervention in stable angina patients; results from the RINC trial. ESC2017, 2017/8/26, Fira Barcelona Gran Via (Barcelona, Spain)
 2. K. Ejiri T. Miyoshi K. Kohno M. Nakahama M. Doi M. Munemasa M. Murakami A. Takaishi K. Nakamura H. Ito. Impact of coronary stent length on periprocedural myocardial injury after percutaneous coronary intervention for stable coronary artery disease: from the RINC randomized controlled trial data. ESC2017, 2017/8/26, Fira Barcelona Gran Via (Barcelona, Spain)
 3. 大塚寛昭、三好 亨、江尻健太郎、河野晋久、中濱 一、土井正行、宗政 充、村上正明、高石篤志、中村一文、伊藤 浩. 遠隔虚血プレコンディショニングは安定狭心症の PCI 後の造影剤関連の急性腎障害を予防する：多施設共同ランダム化試験 RINC study. 第 65 回日本心臓病学会学術集会, 2017/9/29, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
 4. 江尻健太郎、三好 亨、中濱 一、宗政 充、中村一文、伊藤 浩. 遠隔臓器プレコンディショニングの待機的 PCI における心筋保護効果は喫煙者で増大する：ランダム化比較試験副次解析. 第 65 回日本心臓病学会学術集会, 2017/9/29, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
 5. Hitoshi Ito. Cardiomyopathies, Diabetes, and Heart Failure: International Perspectives From the British Cardiovascular Society, Japanese College of Cardiology, and American College of Cardiology. ACC2016, 2016/4/2, McCormick Place Convention Center (Chicago USA)
 6. K Ejiri , T Miyoshi , K Kohno , M Nakahama , M Doi , M Munemasa , M Murakami , A Takaishi , Y Kawai , T Sato , K Sato , T Oka , S Sakuragi , H Ito. The effect of remote ischemic preconditioning for myocardial injury following percutaneous coronary intervention in stable angina patients with complex coronary lesion: results of the RINC trial. ESC Congress 2016, 2016/8/27, Fiera di Roma (Roma Itaria)
 7. 三好 亨, 伊藤 浩. 遠隔虚血プレコンディショニングの最前線. 第 80 回日本

循環器学会総会, 2016/3/17, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://okayama-u-cvm.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 浩 (ITO Hiroshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90446047

(2) 研究分担者

中村 一文 (NAKAMURA Kazufumi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10335630

三好 亨 (MIYOSHI Toru)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：70444651

吉田 賢司 (YOSHIDA Masashi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：70532761

(3) 連携研究者

丸山 徹 (MARUYAMA Toru)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号：90423657