

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08919

研究課題名(和文)横紋筋融解症後腎傷害に対する細胞保護蛋白ヘムオキシゲナーゼ誘導による治療法の開発

研究課題名(英文)Protective effect of tin chloride on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats

研究代表者

清水 裕子(Shimizu, Hiroko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80423284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋融解症とそれに伴う急性腎傷害には、筋ミオグロビン由来の遊離ヘムが重要な役割を果たしている。ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1はヘム分解系の律速酵素で細胞保護作用があるとされている。本研究ではグリセロール(Gly)筋肉注射によるRM-AKIラットモデルを用い、腎特異的HO-1誘導剤である塩化スズSnCl<sub>2</sub>前投与が腎保護効果を持つかどうかを検討した。塩化スズ前投与は腎にHO-1を誘導し、酸化ストレスを引き起こすとされる遊離ヘムの上昇を抑制することで、RM-AKIに対して腎保護作用を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

横紋筋融解症に伴う急性腎傷害(RM-AKI)では、筋ミオグロビン由来の遊離ヘムがその病態形成に関わっていることが報告されている。塩化スズは腎特異的に、ヘム代謝の律速酵素であるHO-1を誘導する薬剤である。グリセロール筋肉注射によるRM-AKIラットモデルを用い、塩化スズによる腎保護作用と症機序を、その作解明することは、災害現場でも利用可能なRM-AKIに対する治療法の開発につながり、さらには早期治療開始により腎傷害の重症化予防、救命率の向上などに大いに貢献できると考える。本研究は、塩化スズによるRM-AKIの治療法の開発を進める上で重要な基礎研究と考える。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated for the first time that SnCl<sub>2</sub> pretreatment ameliorates RM-AKI induced upon injecting glycerol into the hind limbs of rats. This could be attributed to the early, enhanced, and persistent induction of HO-1 expression by SnCl<sub>2</sub> in the kidney as SnCl<sub>2</sub> is a kidney-specific inducer of HO-1. We also showed that renal expression of ALAS1 and Bach1 in SnCl<sub>2</sub>-pretreated animals was maintained almost to the same extent as that in normal animals, while this expression was significantly suppressed in saline-pretreated animals. ALAS1 is downregulated by heme, and Bach1 is exported from the nucleus in complexes that contain increased intracellular heme content. Thus, our findings suggest that overexpression of HO-1, the rate-limiting enzyme in heme catabolism, by SnCl<sub>2</sub> pretreatment confers protection against rat RM-AKI as it degrades the excess amount of intracellular free heme, a pro-oxidant released from myoglobin.

研究分野：救急医学

キーワード：急性腎不全 横紋筋融解症 ヘムオキシゲナーゼ-1 塩化スズ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 横紋筋融解症後の腎傷害に対する積極的治療法の必要性。

災害時に、建物などの崩壊による圧挫性筋壊死によりひきおこされる横紋筋融解症は、腎不全を発症することが多く、災害・救急医療現場では致死的状态に陥る疾患として注目されている。横紋筋融解症後腎傷害(RM-AKI)に対する治療法は、早期大量輸液、強制利尿、血液浄化法などがなされているが、いずれも腎機能回復までの期間、生体の恒常性を維持するための保存的療法である。災害現場では血液浄化等の医療が困難な場面も想定されるなか、RM-AKI に対する積極的な細胞保護療法はいまだないのが現状である。

### (2) ラット横紋筋融解症後腎傷害(RM-AKI)モデルでは、細胞保護作用を持つヘムオキシゲナーゼ(HO)-1が誘導される。

横紋筋融解症では、崩壊した筋細胞から血中に流出したミオグロビン由来の遊離ヘムが、細胞膜リン脂質へ作用しフリーラジカルを発生させ、尿細管細胞傷害を引き起こす一因と考えられている(Fig.1)[1]。HO-1はヘム分解系の律速酵素であるが、酸化ストレス下でも誘導され、細胞保護的に働くことが知られている[2]。申請者らは、ラットRM-AKIモデルの腎で、ミオグロビン由来の遊離ヘムを感知した転写調節因子BTB Domain and CNC Homolog1 (Bach1)が核内から細胞質へ局在が変化し、HO-1の転写抑制が解除されることでHO-1が誘導されること(ヘム-Bach1系)を *in vivo* で初めて示唆した[3]。

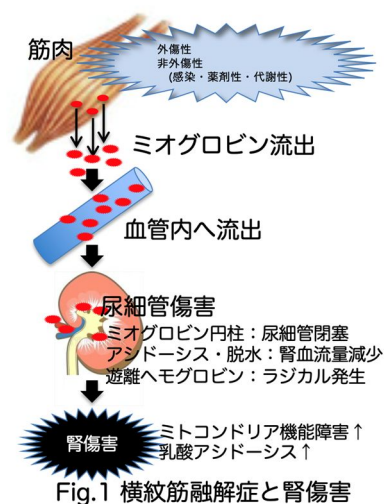


Fig.1 横紋筋融解症と腎傷害

(3) しかし、ラットRM-AKIモデルでは、腎に細胞保護作用を持つHO-1が誘導されているにもかかわらず、腎機能は低下している。ヘム-Bach1系を介した内因性のHO-1誘導は、遊離ヘムによる酸化ストレスに対する生体反応の一つであり、遊離ヘムを減少させるという観点では有用だが、本症において積極的に腎細胞を保護するには不十分であるのかもしれない。そこで、RM-AKIに対し、安全で積極的細胞保護療法として、ヘム-Bach1系を介さないHO-1誘導剤による治療戦略の開発が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

HO-1誘導機序には、ヘム-Bach1系のほか、metal response element、heat shock response elementなどが関与する系が知られている[4]。ラット腎虚血再還流腎傷害モデルに腎特異的HO-1誘導剤である塩化スズ(SnCl<sub>2</sub>)を前投与すると、腎傷害が軽減するが[5]、塩化スズによるHO-1の誘導機序は未だ明らかではない。そこで、本研究の目的は、1)腎特異的HO-1誘導剤塩化スズのRM-AKIに対する腎保護効果を確認し、2)塩化スズによるHO-1誘導機序を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1)RM-AKIモデルに対する塩化スズ投与は腎機能かを改善するか?

雄性Sprague-Dawleyラットを用い24時間絶飲後、後肢への50%グリセロール(Gly)筋注によるRM-AKIモデルに対して、HO-1誘導剤である塩化スズを前投与し、腎保護効果の程度を確認する。

腎特異的 HO-1 誘導剤塩化スズを前投与後絶飲し、Gly 筋注によるラット RM-AKI モデルを作成する。

塩化スズ投与による腎保護効果が HO-1 発現によることを確認するため、HO 活性阻害剤スズメゾポリリン(SnMP)投与実験も行い、腎機能を血液生化学検査、組織学的に評価する。塩化スズ投与による、RM-AKI に対する腎保護作用の機序の検討。

ヘム-Bach1 系を介した HO-1 誘導では、遊離ヘムを感知した Bach1 が核から細胞質へ移動し、HO-1 の転写抑制が解除されることで HO-1 が誘導される。塩化スズ投与または塩化スズ前投与後 Gly 投与ラットにおける腎 HO-1、5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS)1、Bach1 の動態を遺伝子発現で、Bach1 タンパクの局在を Western Blot 法により測定し、塩化スズの腎保護作用の機序について検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) RM-AKI の腎臓における HO-1 発現に及ぼす塩化スズ前投与の影響

まず、腎における、ヘム分解の律速酵素 HO-1 発現に対する塩化スズ前投与の影響を、Gly 処理後 1、3、6 時間で検討した。SnCl<sub>2</sub>+Gly 群では、Gly 投与 1 時間後で HO-1 タンパクレベルが顕著に上昇し、その高いレベルは投与 6 時間後でも維持されていた (Fig.2)。次に、塩化スズ前投与ラットにおける HO-1 タンパクの発現亢進が、腎における HO-1 のデノボ合成によるものであることを確認するため、Gly 投与後の最も発現量の高い時期である投与後 6 時間の SnCl<sub>2</sub>+Gly 群と Saline+Gly 群で HO-1 mRNA 発現を比較した。ノーザンブロット解析の結果、SnCl<sub>2</sub>+Gly 群の腎 HO-1 mRNA レベルは、Saline+Gly 群よりも有意に高かった (Fig.3) これらの結果は、

塩化スズ前投与により、Gly 投与後の初期段階において、Saline+Gly 群に比べ、腎 HO-1 発現が高いレベルで維持されていることを示す。

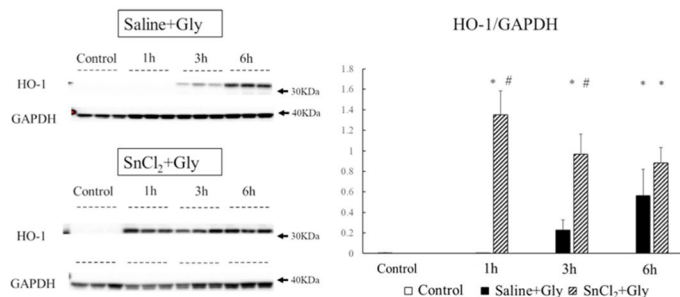


Fig 2. Changes in renal HO-1 protein expression after Gly treatment.

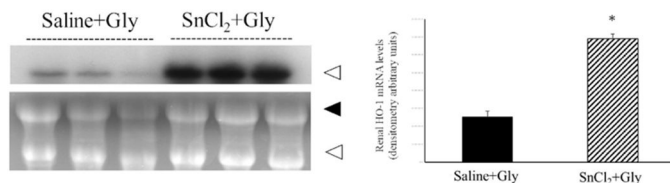


Fig 3. Expression of renal HO-1 mRNA 6 h after Gly treatment.

##### (2) RM-AKI の腎臓機能に対する塩化スズ前投与の影響

次に、塩化スズ前投与が、ラットの HO-1 誘導を介して、グリセロール投与により誘導された RM-AKI を改善できるかどうかを検討した。生理食塩水 (Saline+Gly 群) または塩化スズ投与 (SnCl<sub>2</sub>+Gly 群) 塩化スズ投与後に HO 活性の競合拮抗阻害剤 SnMP (SnCl<sub>2</sub>+SnMP+Gly) を投与した 3 群のモデルを作成し、Gly 投与後の血清 BUN およびクレアチニン (Cre) 値を経時的に測定した。Gly 投与 12 時間後、各群の BUN と Cre 値は無処置の対照動物と同程度であった。しかし、

Gly 投与 24 時間後には、Saline+Gly 群では対照群に比べ血清 BUN および Cre 値の有意な増加が認められた。一方、SnCl<sub>2</sub>+Gly 群は、Saline+Gly 群に比べ、血清 BUN および Cre 値は有意に低かった。しかし、HO 拮抗阻害剤

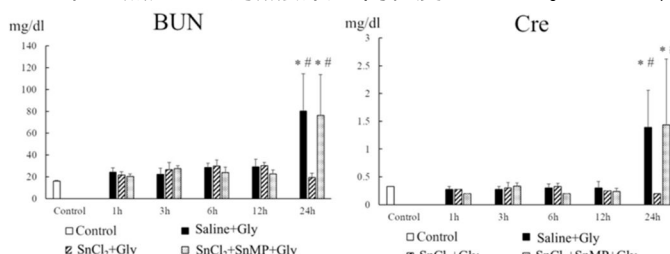


Fig 4. Effect of SnCl<sub>2</sub> pretreatment on changes in serum BUN and Cre levels after glycerol treatment.

SnMP の追加投与により、塩化スズの腎保護効果は打ち消された (Fig.4)。

また、塩化スズ前投与の影響を、Gly 投与 24 時間後に組織学的に評価した。Saline+Gly 投与群では、尿細管上皮細胞の膨潤、空胞変性、壊死、落屑などの組織学的損傷が観察された。しかし、これらの組織学的変化は塩化スズ処理により顕著に改善されたが、SnMP 投与によりこれらの改善は消失した。組織学的所見と同様に、Saline+Gly 群の尿細管損傷スコアは、対照群よりも有意に高かったが、塩化スズ処理により、スコアは有意に減少した。SnMP の追加投与により、スコアは Saline+Gly 群と同レベルまで上昇し、塩化スズによる腎保護効果は減弱した。

さらに、塩化スズの保護効果が H0 の酵素活性に起因するかどうかを確認するため、各群の Gly 投与 24 時間後の腎 H0 活性を測定した。Saline+Gly 群では、対照群と比較して、腎 H0 活性が有意に上昇した。さらに塩化スズを処理すると、Saline+Gly 群と比較して、H0 活性は有意に上昇した。一方、SnMP を追加投与すると、H0 活性は抑制された。

### (3) RM-AKI における 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS)1 mRNA の発現に及ぼす塩化スズ前投与の影響

塩化スズ前投与による H0-1 の腎保護作用のメカニズムをさらに明らかにするために、ヘムの増加により発現が低下することが知られているヘム合成系の律速酵素 ALAS1 の発現に対する塩化スズ投与の影響について検討した。我々は以前、Gly 投与ラットの腎 ALAS1 mRNA 量が投与後 1~3 時間で有意に低下することを報告したが、これは Gly 投与による細胞内ヘム濃度の上昇を示唆していた[3]。そこで、Gly 投与 3 時間後の腎 ALAS1 mRNA の発現量に対する塩化スズ前投与の影響を検討した。腎 ALAS1 mRNA は、対照群で有意に発現していたが、Saline+Gly 群では、予想通り対照群に比べ顕著に低下していた。しかし、SnCl<sub>2</sub>+Gly 群では、ALAS1 mRNA の有意な低下は見られなかった(Fig.5)。これらの結果は、塩化スズ前投与が Gly 投与による細胞内ヘム濃度の上昇を抑制したことを示唆している。

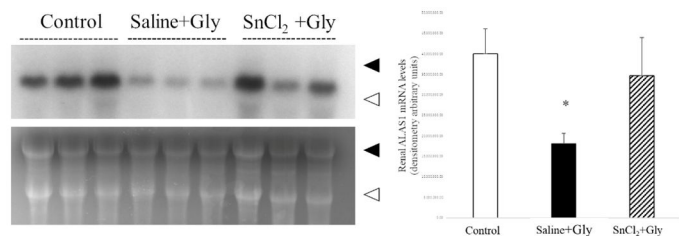


Fig 5. Expression of renal ALAS1 mRNA levels 3 h after Gly treatment.

### (4) RM-AKI における核内 Bach1 タンパク質の発現に対する塩化スズ前投与の影響

細胞内ヘム濃度上昇に対する塩化スズ前投与の影響を明らかにするために、ヘムが結合すると核外に排出され H0-1 の発現を制御している、転写抑制因子 Bach1 タンパクの局在を評価した。我々は以前、ラットに Gly を投与すると、腎の核内 Bach1 タンパクレベルが急速に低下し、3 時間で最低値となることを示したが、これは Gly 投与後にヘム濃度が上昇することを示唆していた[3]。そこで、Gly 投与 3 時間後の腎核内 Bach1 タンパクレベルの発現に及ぼす塩化スズ前投与の影響を評価した。対照群では腎核内 Bach1 が有意に発現していたが、Saline+Gly 群では対照群に比べ有意に低下していた。一方、SnCl<sub>2</sub>+Gly 群の腎核内 Bach1 レベルは、対照群とほぼ同じであった (Fig.6)。これらのことから、塩化スズが核内ヘム濃度の上昇を抑制したことが示唆された。

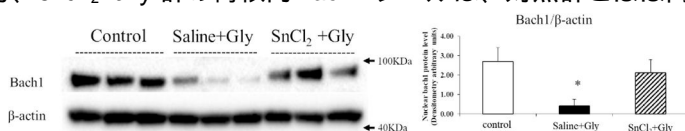


Fig 6. Renal nuclear Bach1 protein expression levels 3 h after Gly treatment.

### (5) 塩化スズ投与が血清クレアチニン、CPK、ALT 値、腎臓の H0-1、ALAS1、Bach1 発現に及ぼす影響

ラットに塩化スズを皮下投与し、経時的に腎機能の指標であるクレアチニン、筋損傷の指標であるCPK、肝機能の指標であるALTの血清レベルの経時変化を調べた。いずれの指標も、経時的に有意な変化は見られなかった。また、塩化スズ投与が、腎H0-1 mRNAおよびタンパク、ALAS1 mRNA、および核内Bach1タンパクの発現に及ぼす影響も評価した。塩化スズ投与12時間後の腎H0-1 mRNAレベルは対照群と比較して著しく増加した。H0-1タンパクレベルは、3時間後に増加し始め、時間依存的に徐々に増加し、投与後12時間で最大となり、24時間まで維持された。ALAS1 mRNAおよび核内Bach1タンパクレベルは、塩化スズ投与後1、3、6、12、および24時間では有意な影響を受けなかった。これらの結果は、塩化スズ投与自体が、少なくとも部分的には、ラットに大きな副作用を引き起こすことなく、ヘム-Bach1系以外のメカニズムを介して、腎にH0-1を誘導することを示唆している。

我々は、ラットの後肢へのグリセロール筋注によるRM-AKIを塩化スズ前投与で改善することを初めて証明した。これは、塩化スズが腎特異的なH0-1誘導物質であることから、塩化スズが腎臓でH0-1の発現を早期に、持続的に誘導することに起因していると考えられる[7]。この仮説を実証するために、H0活性阻害剤であるSnMPによって腎臓のH0活性を阻害すると、H0-1誘導の有益な腎保護効果が完全に消失することが示された。また、塩化スズ前投与ラットにおける腎ALAS1 mRNAおよび核内Bach1タンパクの発現は、正常ラットとほぼ同程度に維持されていたのに対し、Saline+Gly群では有意に抑制されていることが示された。ALAS1はヘム増加により発現が低下し[8]、Bach1は細胞内の増加したヘムと複合体を形成して核から排出される[9]。このことから、ヘム分解の律速酵素であるH0-1を塩化スズ前投与により過剰発現させると、ミオグロビンから放出される過剰量の細胞内遊離ヘムを分解するため、ラットRM-AKIに対する保護効果が得られることが示唆された。

我々は、塩化スズが腎臓特異的にH0-1を誘導し、過剰な細胞内ヘムを分解することで虚血性急性腎傷害を予防することも報告した[5]。さらに、先に述べたように、塩化スズは、一過性の細胞内ヘム量の増加をもたらすことなく、おそらくmetal response elementなどを介して、H0-1の発現を誘導すると考えられる。このように、塩化スズはRM-AKIにおけるH0-1の薬理的誘導剤として応用可能な特性を有している。しかし、塩化スズはヒトに対して毒性があることが知られている。したがって、このような良好な特性を示し、かつ副作用のない薬理的H0-1誘導剤を、将来の臨床応用のために追求する必要がある。

#### <参考文献>

- [1] Nath K, et al. (other 6 authors). J Clin Invest. 90(1): pp267-270, (1992)
- [2] Morimatsu H (1<sup>st</sup>), Takahashi T (2<sup>nd</sup>), Shimizu H (3<sup>rd</sup>), et al. (other 3 authors). Chapter 6: Heme Proteins, Heme Oxygenase-1 and Oxidative Stress. InTech, pp109-124, (2012).
- [3] Yamaoka M, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Morimatsu H. PLoS One. 2017 Jul 13;12(7):e0180934. doi: 10.1371/journal.pone.0180934. (2017).
- [4] Alam J and Cook JL. Am J Respir Cell Mol Biol. 36(2):pp166-74, (2007)
- [5] Toda N, Takahashi T, et al. (other 8 authors). Crit Care Med. 30(7): pp1512-22, (2000).
- [6] Morimatsu H (1<sup>st</sup>), Takahashi T (2<sup>nd</sup>), Shimizu H (6<sup>th</sup>), et al. (other 5 authors). J Breath Res. Vol.4 (4), p047103, (2010)
- [7] Arimori Y, Takahashi T (2<sup>nd</sup>), Inoue K (4<sup>th</sup>), Shimizu H (5<sup>th</sup>), Omori E (6<sup>th</sup>), Morimatsu H (9<sup>th</sup>), et al. (other 4 authors). Int J Mol Med. Vol.26 (1), pp27-32, (2010).
- [8] Takahashi T (1<sup>st</sup>), Shimizu H (2<sup>nd</sup>), Morimatsu H (4<sup>th</sup>), Omori E (7<sup>th</sup>), et al. (other 4 authors). Nihon Yakurigaku Zasshi. 130(4), pp252-6, (2007)
- [9] Takahashi T (1<sup>st</sup>), Shimizu H (2<sup>nd</sup>), et al. (other 3 authors). Drug Dev. Res. vol.67, pp130-153, (2006)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shinkichi Ohtani, Hiroko Shimizu, Masakazu Yamaoka, Toru Takahashi, Emiko Omori, Hiroshi Morimatsu	4. 巻 17(3)
2. 論文標題 Protective effect of tin chloride on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265512	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nohito Tanioka, Hiroko Shimizu, Emiko Omori, Toru Takahashi, Masakazu Yamaoka, Hiroshi Morimatsu	4. 巻 75(3)
2. 論文標題 Role of the Transcription Factor BTB and CNC Homology 1 in a Rat Model of Acute Liver Injury Induced by Experimental Endotoxemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama .	6. 最初と最後の頁 363-372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/62232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YUTA KUMADA, TORU TAKAHASHI, HIROKO SHIMIZU, RYU NAKAMURA, EMIKO OMORI, KAZUYOSHI INOUE and HIROSHI MORIMATSU	4. 巻 17
2. 論文標題 Therapeutic effect of carbon monoxide releasing molecule 3 on acute lung injury after hemorrhagic shock and resuscitation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE	6. 最初と最後の頁 3429-3440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinkichi Ohtani, Hiroko Shimizu, Emiko Omori, Toru Takahashi, Hiroshi Morimatsu
2. 発表標題 Protective effect of SnCl2 on rhabdomyolysis- induced acute kidney injury in rats
3. 学会等名 International Anesthesia Research Society 2020 ANNUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森松 博史 (Morimatsu Hiroshi)  (30379797)	岡山大学・医歯薬学域・教授  (15301)	
研究分担者	井上 一由 (Inoue Kazuyoshi)  (10624413)	岡山大学・医学部・客員研究員  (15301)	削除：2020年3月9日
研究分担者	高橋 徹 (Takahashi Toru)  (40252952)	岡山県立大学・保健福祉学部・教授  (25301)	追加：2019年4月11日 削除：2022年5月10日

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大谷 晋吉 (Ohtani Shinkichi)		
研究協力者	山岡 正和 (Yamaoka Masakazu)		
研究協力者	大森 恵美子 (Omori Emiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------