

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09711

研究課題名(和文) PDE5阻害薬タダラフィルは腎虚血再灌流障害の革新的治療となるか？

研究課題名(英文) Is the PDE5 inhibitor tadalafil an innovative treatment for renal ischemia reperfusion injury?

研究代表者

荒木 元朗 (Motoo, Araki)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：90467746

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)：WT、eNOS-KOマウス共に、タダラフィル投与により有意な尿細管障害の軽減を認めた。腎臓内のフローサイトメトリーでは、タダラフィル投与群で腎組織内の好中球の割合がWT、eNOS-KOマウス共に有意に減少していた。in vivo イメージングにおいて糸球体へ流入する好中球は1時間時点でWTよりeNOS-KOマウスで強く集積し、3時間時点でより多くの好中球の尿細管への移行を認めた。タダラフィルの内服は糸球体への好中球流入を軽減し、eNOS-KOにおいてより顕著であった。さらに、再灌流後1時間での糸球体内の好中球陽性体積の割合はWTよりeNOS-KOで有意に高く、双方ともにタダラフィルで減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎虚血再灌流障害の新たな研究手法として2光子レーザー顕微鏡を用いたイメージング技術を駆使することで、世界に先駆けて生体マウス腎において好中球in vivo イメージングに成功した。これにより、好中球の糸球体への流入・血管内rollingを捉える事が可能となり、さらなる病態解明に寄与できる。今回、局所での好中球浸潤がタダラフィルにより抑制されることが確認できた。腎組織内の微小環境の変化をダイナミックに直接可視化できるこのイメージング技術は、腎臓に留まらない、様々な臓器における疾患の病態基盤の解明に有用であると考えられる。本研究の成果から、tadalafilが治療候補となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Both WT and eNOS-KO mice showed significant reduction of tubular damage after tadalafil treatment. Flow cytometry in the kidneys showed that the percentage of neutrophils in renal tissue was significantly reduced in tadalafil-treated mice, both WT and eNOS-KO mice; in vivo imaging showed a stronger accumulation of neutrophils entering the glomeruli at 1 hour in eNOS-KO mice than in WT mice, and a greater number of neutrophils migrating into the tubules at 3 hours. Oral tadalafil reduced neutrophil influx into the glomerulus, more pronounced in eNOS-KO. In addition, the percentage of neutrophil-positive volume in the glomerulus at 1 hour after reperfusion was significantly higher in eNOS-KO than in WT, and both were reduced with tadalafil.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 腎虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

○腎移植は患者を救い、日本も救う医療であり、その学術的意義も大きい。

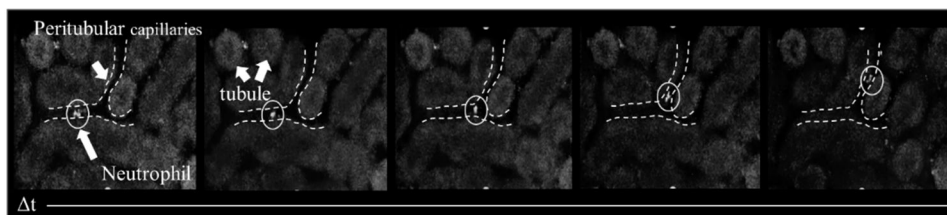
日本では透析患者約 32 万人に対して約 1600 例/年(2016 年)の腎移植しか行われていない。透析患者の年間医療費は 600 万円/人であるが、腎移植によりこの 70%が削減できる。腎移植の平均生着率が 20 年であり、その間に削減できる医療費は 600 万円 x 20 年 x 70% = 8400 万円となる。1 例の腎移植で 1 億円近くの医療費が削減できる計算になる。数少ない腎提供を最大限に生かす研究が社会的に求められている。

○腎虚血再灌流障害は腎移植の成績に大きな影響を及ぼす。

腎虚血再灌流障害は、虚血状態にある腎が再灌流によって反応性に産生される酸素派生物質によって引き起こされる**重大な組織障害**を指す。レシピエントが初めてドナーの大量の抗原にさらされる最も初期の抗原提示の現場でもある。再灌流によって虚血に陥っていた血管内皮細胞は TNF-a や IL-1 などのサイトカインを数分間の間に数多く産生し、引き続き好中球やマクロファージの遊走因子である IL-8, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CCL2/MCP-1 を産生する。こうして浸潤した好中球やマクロファージによって細胞障害性サイトカインや酸素派生物質が産生され組織障害を引き起こし、**移植腎機能遅延**につながる。また組織障害から生まれた抗原は急性/慢性拒絶反応の発現増加に關与する。移植腎の最初の組織障害となる**腎虚血再灌流障害を軽減することは腎移植の成績向上に大きく貢献する。**

本研究代表者の荒木はヒトにおいて腎移植時の虚血時間と好中球走化因子である IL-8 が相関関係にあることを明らかにした (Araki M et al. Transplantation, 81: 783, 2006)。また動物モデルにおいてこの好中球浸潤を阻害することによって組織障害が緩和されることを証明した (Araki M et al., Cur Opin in Organ transplantation, Jun; 9, 2004)。

血管内皮/血管平滑筋細胞には、**内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)**が発現し、NO 産生により血管内皮を保護している。NO には**活性酸素種と反応しその毒性を打ち消す役割、また血管壁への炎症性細胞接着を抑制する作用をもつ**。今回我々は好中球浸潤を軽減させ、虚血再灌流障害の新しい治療薬となり得る**タダラフィルの血管内皮保護作用**に着目した。タダラフィルは、ホスホジエステラーゼ type5 (PDE5)阻害薬であり、血管内皮/血管平滑筋細胞において cGMP の分解を防ぎ、逆行性に一酸化窒素(NO)を増加させる。我々は腎臓では困難とされていた**多光子レーザー顕微鏡を用いた好中球の in vivo リアルタイムイメージング(iRI)**に成功した。**尿細管への好中球浸潤および腎尿細管上皮での好中球のローリングの様子は、これまでに報告のない革新的なもの**である(下図)。予備実験の in vivo リアルタイムイメージングでタダラフィル内服により好中球浸潤が軽減されることを確認している。



2. 研究の目的

本研究の目的は“腎虚血再灌流障害の新しい治療の確立”である。また我々の仮説は“**タダラフィルは腎虚血再灌流障害において好中球浸潤を抑制し腎保護作用を示す**”である。本研究は以下の独自性を有する研究として行う。

- I. **タダラフィルという新しい腎虚血再灌流障害の治療法の確立**
- II. **腎臓では困難といわれていた多光子レーザー顕微鏡による、虚血再灌流後の好中球の in vivo リアルタイムイメージング**
- III. **eNOS-ノックアウト(KO)マウスによるタダラフィルの好中球浸潤抑制効果のメカニズムの解明**

本研究ではすでに臨床応用されている**タダラフィル**に着目している。タダラフィルは、泌尿器科領域では前立腺肥大症、ED 治療薬として一般的に使用されており、安全性が確認済である。よって臨床応用までのハードルが非常に低い。治療が有効であることが

証明されれば生着率の向上に貢献する。また腎虚血再灌流障害は腎移植のみならず腎癌の腎部分切除術における腎虚血、急性腎不全と同一の病態である。腎移植以外の他疾患への応用・発展も可能である。

3. 研究の方法

腎虚血再灌流障害におけるタダラフィルの腎保護作用を明らかにする。下記の項目で比較検討を行った。腎臓内好中球浸潤の比較（凍結切片の免疫染色、フローサイトメトリー）

組織障害の比較（HE染色切片）

好中球in vivo リアルタイムイメージング

血管内皮保護効果の確認（リアルタイムPCRによるICAM、VCAM発現の比較）

マウス腎虚血再灌流モデル

5-8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスと eNOS-ノックアウト (KO) マウスを用いる。手術は、吸入麻酔下に開腹し、左右腎動静脈を一括クランプする。45 分間のクランプ後に両腎動静脈を開放(unclamp)する。処置の間は、電灯・heatpad を用いて腹腔内温度を 37 に保つ。処置後は閉創しケージで最大 24 時間経過観察をする。

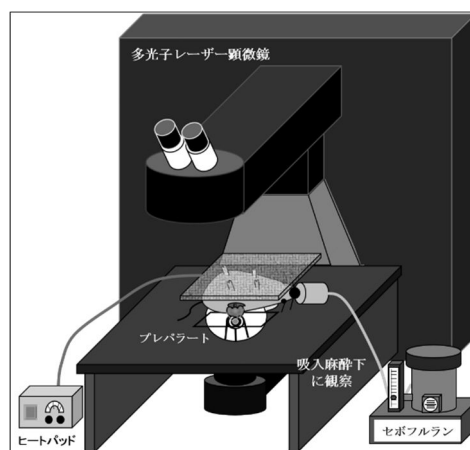
タダラフィルの投与

C57BL/6 マウスと eNOS-KO マウスを各々虚血なし群(control 群)、タダラフィル投与群、非投与群に分ける。タダラフィル投与群に対し、5mg/kg を生食 0.2ml に溶解させ、処置 1 時間前に 1 回経口投与する。タダラフィル非投与群に対しては生食 0.2mg のみを投与する。

多光子レーザー顕微鏡を用いた好中球 in vivo リアルタイムイメージング

(研究分担者の川崎医科大学 城所博士が指導を担当)

各群のマウスに対し、多光子レーザー顕微鏡(TCS SP2 AOBS MP; Leica Microsystems)を用いて、再灌流後急性期の腎臓内での好中球動態イメージングを行う。具体的には、Albumin from Bovine Serum(alexa fluor 594)を用いて血流を可視化し、好中球を Antimouse Ly-6G monoclonal antibody (RB6-8C5)を 1 次抗体として Alexa Fluor 488(funakoshi Lightning-Link Rapid Conjugation System)で蛍光標識する。この手法で我々は、再灌流後の腎臓における好中球の観察に既に成功しており、これまで報告のない革新的なものである。すでに予備実験の in vivo リアルタイムイメージングで C57BL/6J マウスより eNOS-KO マウスで腎虚血により好中球がより多く浸潤し、障害が増強する事、また、両群でタダラフィル投与により好中球集積が軽減する事を確認している。



腎機能の評価

腎機能評価は 1、3、24 時間と、群ごとに血清クレアチンを測定。必要な腎臓組織に関してはその時点でマウスを sacrifice し、PBS で還流した後、標本を保存する。

腎臓の組織学的比較検討

腎臓のパラフィン切片をHE染色し、各群における腎臓組織の障害の違いを判定する。特に腎虚血再灌流障害の中心となる近位尿細管に注目する。障害の程度は尿細管障害スコアを用いて0-5の5段階でスコア化し、比較検討する。

フローサイトメトリーによる腎臓内好中球の検出

採取した腎臓はさらに、gentleMACS(Miltenyi Biotec)を用いてDNaseとCollagenaseにてホモジネートした後、FACS analysisを行う。7-AADにより死細胞の、APC-anti mouse CD45 抗体で陽性細胞のゲーティングを行い、Ly-6G-BV421抗体、CD11b-PE抗体(BD Bioscience)を用いて好中球を検出し、各群の比較を行う。

リアルタイム PCR による ICAM、VCAM 発現の比較

ICAM、VCAM-1は血管細胞接着因子であり、炎症性サイトカインや活性酸素の刺激により血管内皮細胞で数時間以内に発現が増強する。タダラフィル投与により、血管内皮が保護され、それらの発現が低下すると予測でき、リアルタイムPCRを行い、比較・検討を行う。またeNOS-KOマウスにおけるICAM、VCAM-1の発現とも比較する。

4. 研究成果

WT(C57/BL/6J)マウス及び、血管内皮障害モデルとしてeNOS ノックアウト (eNOS-KO) マウスを用いた。直腸温 37 に維持した状態で、両側腎動静脈を 45 分間クランプし腎虚血再灌流モデルとした。タダラフィル投与群には虚血再灌流 1 時間前にタダラフィル 0.2mL(0.5mg/mL)を経口投与した。

切片標本のPAS染色を用いた評価では、WT、eNOS-KO マウス共に、タダラフィル投与により有意な尿細管障害の軽減を認めた。摘出腎臓内(whole kidney)のフローサイトメトリーでは、タダラフィル投与群で腎組織内(whole kidney)の好中球の割合が WT、eNOS-KO マウス共に有意に減少していた。続いて、好中球 *in vivo* イメージングを用いて、糸球体や尿細管といった、より腎組織内の限局的な組織に着目して解析を行った。糸球体へ流入する好中球は 1 時間時点で WT より eNOS-KO マウスで強く集積し、3 時間時点でより多くの好中球の尿細管への移行を認めた。タダラフィルの内服は糸球体への好中球流入を軽減し、eNOS-KO においてより顕著であった。さらに、再灌流後 1 時間での糸球体内を占める好中球陽性体積を計測した。糸球体内の好中球陽性体積の割合は WT より eNOS-KO で有意に高く、双方ともにタダラフィル内服で減少した。これらの結果により、血管内皮障害を有する場合、虚血への脆弱性から、好中球浸潤・組織障害が増強するものの、タダラフィルは eNOS 欠損下においても腎保護作用を有することが示された。NO/cGMP 経路と密接に関連する作用機序を持つタダラフィルであるが、ミトコンドリア KATP チャンネルの活性化により直接的・間接的にプロテインキナーゼ C や G を活性化するなど、様々なシグナル伝達経路を介しており、cGMP の増加に伴う eNOS 以外の NOS アイソフォームの upregulation だけではなく、NO/cGMP 経路と独立したメカニズムで腎保護的に働くことが示唆された。

好中球は細胞接着分子との結合を介して血管内皮に移行し腎組織へ浸潤する。ICAM-1、VCAM-1 の発現をリアルタイム PCR で測定したところ、VCAM-1 の発現は再灌流 3 時間後の eNOS-KO マウスにおいてタダラフィル内服により抑制されたが、その他の時点では、ICAM-1、VCAM-1 ともに有意な発現軽減を認めなかった。タダラフィルによる両者の発現抑制は限定的なものであったが、血管内皮障害モデルでは WT と比して効果的である可能性が示唆された。リアルタイムイメージングを用いた我々の知見では、好中球が糸球体に捕捉され、尿細管に流出する様が確認できたため、接着因子による保管を介した血管壁内外への好中球の移動の補完する、間質への血管外好中球移動機構の存在が考えられ、微小環境での好中球動態を *in vivo* イメージングで引き続き解析することで、間質への浸潤機構をさらに解明し、治療候補薬としての有用性の検討を重ねる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruyama Y, Araki M, Kidokoro K, Sogawa Y, Yoshinaga K, Mitsui Y, Sadahira T, Wada K, Watanabe M, Watanabe T, Kashiwara N, Nasu Y.	4. 巻 106
2. 論文標題 Evaluation of Neutrophil Dynamics Change by Protective Effect of Tadalafil After Renal Ischemia/Reperfusion Using In Vivo Real-time Imaging. T	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 280-288.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000003803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山 雄樹, 荒木 元朗, 城所 研吾
2. 発表標題 リアルタイムイメージングを用いた腎虚血再灌流後生体マウス腎における好中球動態のタダラフィル投与による変化
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 雄樹, 荒木 元朗, 城所 研吾, 十川 裕史, 吉永 香澄, 光井 洋介, 定平 卓也, 和田 耕一郎, 渡部 昌実, 渡邊 豊彦, 柏原 直樹, 那須 保友
2. 発表標題 新たなin vivoイメージング技術から明らかになった、タダラフィルによる腎虚血/再灌流後好中球浸潤低下(The novel in vivo imaging techniques for visualizing neutrophil infiltration following renal ischemia/reperfusion which was reduced by tadalafil)
3. 学会等名 第72回西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山雄樹 城所研吾 荒木元朗
2. 発表標題 腎虚血再灌流障害における好中球動態の二光子励起顕微鏡を用いた解析
3. 学会等名 日本移植学会総会
4. 発表年 2019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	城所 研吾 (Kidokoro Kengo) (50435020)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

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
---------	---------