

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590603

研究課題名（和文）

腎障害進展における腎カテコラミンの意義

研究課題名（英文）

The role of renal catecholamine in the progression on acute kidney injury in rats

研究代表者

雪村時人 (YUKIMURA TOKIHITO)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：10145774

研究成果の概要（和文）：虚血性腎障害の発症に腎ノルエピネフリン（NE）が重要な役割を果たす。NE の代謝代謝酵素である monoamine oxidase (MAO) の内因性阻害因子 isatin および MAO_A 阻害薬 moclobemide は、腎静脈血漿中 NE 量を増加させ、腎障害をさらに悪化させたが、MAO_B 阻害薬 selegiline は影響を及ぼさなかった。いずれの阻害薬も O₂⁻ 産生量増加を抑制した。以上、isatin による腎障害の悪化は、MAO_A 阻害を介した腎静脈血漿中 NE 濃度の増大が寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have found that increases in renal sympathetic nerve activity during ischemic period and renal venous norepinephrine (NE) level after reperfusion play important roles in the development of ischemia/reperfusion (I/R)-induced acute kidney injury. In the present study, we examined the effect of isatin, an endogenous monoamine oxidase (MAO) inhibitor, moclobemide, a selective MAO_A inhibitor, and selegiline, a selective MAO_B inhibitor, on renal venous NE levels, superoxide (O₂⁻) production after reperfusion and I/R-induced acute kidney injury. I/R-induced acute kidney injury was made by clamping the left renal artery and vein for 45 min followed by reperfusion, 2 weeks after the contralateral nephrectomy. Injection of isatin or moclobemide before ischemia increased the renal venous plasma NE level after reperfusion and aggravated I/R-induced renal injury, but not selegiline administration. The excessive O₂⁻ production after reperfusion was significantly suppressed by injection of all drugs, indicating that the inhibition of oxidative deamination effectively suppressed O₂⁻ production. Therefore, the aggravation effect of isatin seems to be mediated through increased NE levels in the kidney after reperfusion on I/R-induced acute kidney injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：薬物治療学

1. 研究開始当初の背景

腎不全においては水・電解質バランスの調節や老廃物の排泄が適切になされない状態であり、原因はさまざまであるが、やがては透析療法が導入され生命が脅かされることとなる。利尿薬、イオン交換樹脂製剤、活性型ビタミン D3 製剤などが対症療法的に使用され、一部の腎疾患では、レニン・アンジオテンシン系抑制薬、ステロイド剤、免疫抑制剤などが用いられる。このような薬物療法にもかかわらず、わが国の透析導入患者数は増加の一途をたどっており、腎疾患治療薬の更なる開発が望まれる。腎不全治療の大きな目標の一つは、腎障害の進展に対処して透析療法への移行を少しでも遅らせることである。

これまでの研究で、一般的に、障害した腎においては残存ネフロンを過剰な適応反応によりさらに病変が進行し腎障害が進展し、やがて腎全体の機能が損なわれるものである。原疾患にかかわらず腎障害が進展する、“common pathway”という考え方がなされている。過剰な適応反応の結果として数多くの因子が関係するが、腎の肥大が特徴的であり、また糸球体高血圧は機械的な刺激となり障害を引き起こす。糸球体ろ過の異常などにより蛋白尿がもたらされる。TGF- β および細胞外基質の発現は糸球体硬化と尿細管間質の線維化を引き起こす。

申請者らは、最近、尿管閉塞による実験腎不全モデルにおいて、遊走したマクロファージにヘムオキシゲナーゼ-1 が誘導され、TGF- β および細胞外基質が抑制された結果、腎の線維化が防がれることを報告した。また、レニン・アンジオテンシン系の活性化の役割は大きく、アンジオテンシン II による TGF- β や細胞外基質の増加やアルドステロンの分泌亢進も腎障害に至る。マクロファージなどの細胞浸潤はサイトカイン産生を伴い、炎症反応は尿細管間質の線維化をきたす。

近年、細胞浸潤した炎症細胞における組織カテコラミン産生系の重要性が注目されるようになった。Filerlらは急性肺障害モデルにおいて、浸潤した炎症細胞が交感神経系とは別にカテコラミン産生系を持つことを明らかにした (Nature, 499, 721-726, 2007)。さらにこの臓器障害モデルにおける炎症反応が α_2 受容体遮断薬によって抑制されることも報告された。実際、慢性心不全など交感神経系の過剰な緊張状態では、血管壁の α_1 受容体を刺激し、 β_2 受容体を介するレニン・アンジオテンシン系の活性化もあって、腎血管は収縮し血流量が減少するし水・ナトリウムの貯留にはたらく。腎交感神経の電気刺激は腎臓から血中へ大量のノルエピネフリンを放出し、腎血流量および糸球体濾過率を低下させ (Tadano et al., Eur. J. Pharmacol.,

341, 191-199, 1998)、腎動脈にノルエピネフリンを持続注入した場合には、腎循環の異常および腎組織の障害が生じる (Cronin et al., Kidney. Int., 14, 187-190, 1978)。また、交感神経系緊張による腎循環および尿生成の応答はクロニジン、節遮断薬、除神経、 α 遮断薬により抑制される。腎交感神経系は、腎臓の機能を調節する重要な因子であるが、一方でその過剰亢進は腎臓の機能低下のみならず組織障害をもたらす、腎疾患の発症・進展に深く関与することはよく知られた事実である。

2. 研究の目的

今回、カテコラミンの代謝を担う monoamine oxidase (MAO) の内因性阻害因子として知られている isatin を用い、進行性腎障害が顕著に表現される虚血性急性腎不全モデルにおいて、腎障害の発症・進展に腎臓内カテコラミンがどのように関与しているかを調べた。さらに、脳や心臓の虚血再灌流障害には、MAO 由来の活性酸素種が大きく寄与していると考えられているため isatin による虚血再灌流後の腎組織中スーパーオキシド (O_2^-) 産生量に対する影響についても検討を加えた。

3. 研究の方法

実験には、Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (8 週齢) を用いた。ペントバルビタール (50 mg/kg, i. p.) 麻酔下に右側腹切開を加え、右腎を露出後、右腎動静脈並びに輸尿管を剥離・結紮し、右腎を摘除した後、切開面を縫合した。2 週間後、ラットをペントバルビタール麻酔し、左側腹切開を加え、左腎を露出した後、腎動静脈に付着している脂肪を注意深く除去した。次いで、非外傷性クリップを用いて左腎動静脈の血流を遮断し、腎臓を虚血状態にした。45 分後にクリップを除去し、血流を再開させて切開面を縫合した。虚血再灌流処置終了 24 時間後のラットを代謝ケージに入れ、5 時間の採尿を行った。採尿終了後、ペントバルビタール麻酔下で採血及び腎臓の摘出を行った。得られた血液及び尿から腎機能パラメーターとして血中尿素窒素 (BUN)、血漿中クレアチニン (Pcr)、クレアチニンクリアランス (Ccr) を測定し、得られた腎静脈血からは腎静脈血漿中 NE 濃度を測定した。なお、血中尿素窒素は尿素窒素 B-テストワコー (和光純薬工業)、血漿および尿中クレアチニン濃度はクレアチニン-テストワコー (和光純薬工業) を用い、腎静脈血漿中のノルエピネフリン (NE) 濃度は、アルミナ吸着法と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により血漿から NE を分離した後、電気化学検出器を用いて測定した。得ら

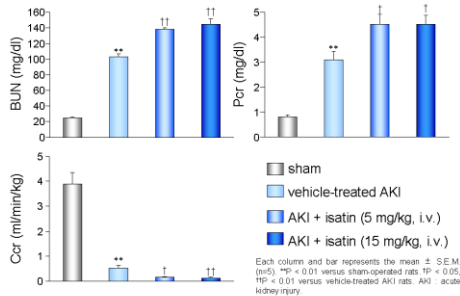
れた腎臓からはルシゲニン化学発光法によって腎組織中 O_2^- 産生量の測定と腎病理組織標本を作製した. isatin は 15 mg/kg の用量で虚血 5 分前に静脈内投与し、対照群には溶媒を投与した. 一部の実験では、虚血 1 時間前に選択的 MAO_A 阻害薬 moclobemide (10 mg/kg) を経口投与あるいは虚血 5 分前に選択的 MAO_B 阻害薬 selegiline (1 mg/kg) を静脈内投与した. なお、右腎摘除のみを施したものを正常群とした.

4. 研究成果

(1) 再灌流 1 日後の腎機能に対する isatin の影響

Figure 1 に示すように、虚血再灌流処置 29 時間後の対照群では、正常群と比較して、有意な BUN、Pcr の増加と Ccr の低下が認められた. 対照群でみられたこれら腎機能の低下は、isatin の静脈内投与 (5 および 15 mg/kg) により用量依存的かつ顕著に悪化された.

Figure 1



(2) 再灌流 1 日後の腎組織中 O_2^- 産生量に対する isatin の影響

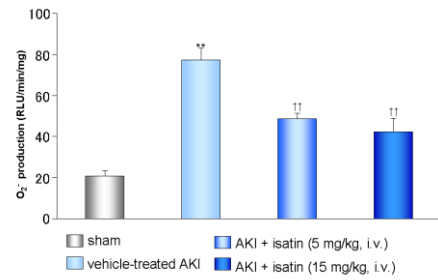
脳や心臓の虚血再灌流障害には、MAO 由来の活性酸素種が大きく寄与していると考えられている. そこで、isatin による虚血再灌流後の腎組織中 O_2^- 産生量を調べた. その結果、対照群における再灌流後の腎組織中 O_2^- 産生量は sham 群と比較して顕著に増加した. この対照群で見られた腎組織中 O_2^- 産生量の増加は、isatin の投与により有意に抑制された (Figure 2).

(3) 再灌流 29 時間後の腎静脈血漿中 NE 濃度に対する isatin の影響

再灌流後の腎臓内カテコラミン濃度を調べる目的で、腎静脈血漿中 NE 濃度を測定した. Figure 3 に示すように、対照群における再灌流 1 日後の腎静脈血漿中 NE 濃度は、sham 群と比較して顕著に上昇した. また、対照群でみられた腎静脈血漿中 NE 濃度の上昇は、

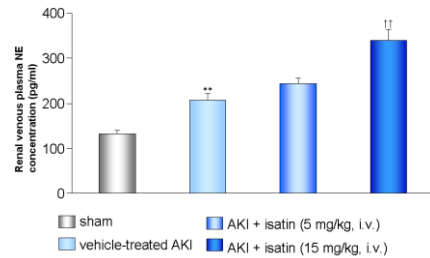
isatin によってさらに増加された.

Figure 2



Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. (n=5). **P < 0.01 versus sham-operated rats. †P < 0.01 versus vehicle-treated AKI. AKI: acute kidney injury.

Figure 3

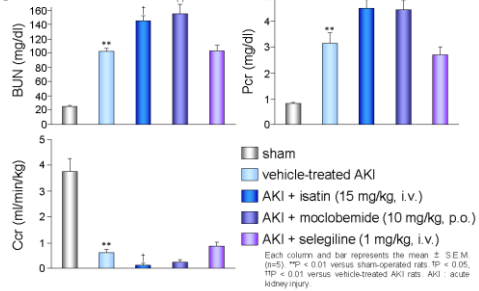


Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. (n=5). **P < 0.01 versus sham-operated rats. †P < 0.01 versus vehicle-treated AKI. AKI: acute kidney injury.

(4) 再灌流 1 日後の腎機能に対する MAO 阻害薬の影響

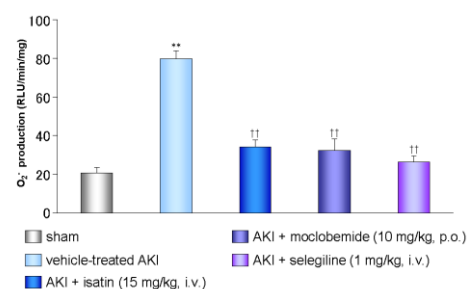
isatin が MAO_A と MAO_B のどちらを阻害することにより、これらの効果を示しているかを検討するため、選択的 MAO_A 阻害薬 moclobemide あるいは選択的 MAO_B 阻害薬 selegiline を用いて検討した. その結果、moclobemide は、isatin と同様、対照群で見られた腎機能障害を顕著に悪化させたが、selegiline は影響を及ぼさなかった (Figure 4).

Figure 4



Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. (n=5). **P < 0.01 versus sham-operated rats. †P < 0.05, ††P < 0.01 versus vehicle-treated AKI rats. AKI: acute kidney injury.

Figure 5



Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. (n=5). **P < 0.01 versus sham-operated rats. †P < 0.01 versus vehicle-treated AKI. AKI: acute kidney injury.

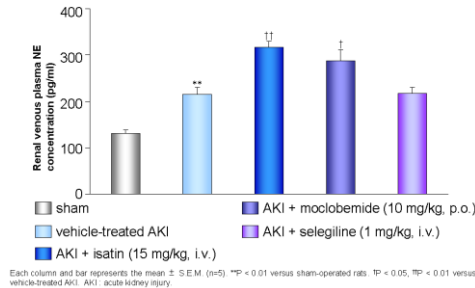
(5) 再灌流 1 日後の腎組織中 O_2^- 産生量に対する MAO 阻害薬の影響

Figure 5 に示すように、対照群で見られた腎組織中 O_2^- 産生量の増加は、isatin と同様、moclobemide あるいは selegiline の投与により有意に抑制された。

(6) 再灌流 29 時間後の腎静脈血漿中 NE 濃度に対する MAO 阻害薬の影響

再灌流後の腎臓内カテコラミン濃度に対する moclobemide あるいは selegiline の影響を調べた。その結果、moclobemide では、isatin と同様、対照群で見られた腎静脈血漿中 NE 濃度の上昇を顕著に増大させたが、selegiline は影響を及ぼさなかった (Figure 6)。

Figure 6



以上の結果より、isatin による腎虚血再灌流障害のさらなる悪化は、MAO_A 阻害を介した腎静脈血漿中 NE 濃度の顕著な増大が大きく寄与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Tanaka R, Tsutsui H, Kobuchi S, Sugiura T, Yamagata M, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Protective effect of 17 β -estradiol on ischemic acute kidney injury through the renal sympathetic nervous system. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 2012, in press.
- ② Tsutsui H, Sugiura T, Hayashi K, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Moxonidine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 603, 73-78, 2009.
- ③ 伊藤勝彦、植田真一郎、熊谷雄治、雪村時人、志賀剛、佐藤岳幸、劉世玉、稲野彰洋、柏木利次、中野重行、千田道雄、塚田秀夫、鳥山裕司、渡邊裕司「治験に求められるバイオマーカーとしての PET を考える勉強会」からの提言、臨床薬理、

査読有、41、233-243、2010

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① Masayo Yamagata. Attenuated megalin expression in hyperfunctioning parathyroid tumor. 第 2 回 IOF/ANZBMS/JSBMR (国際骨粗鬆症財団、オーストラリア・ニュージーランド骨代謝学会・日本骨代謝学会合同学会), 2011 年 9 月 5 日, オーストラリア・ゴールドコースト
- ② 山形雅代、メガリンは病的副甲状腺で発現が低下する、第 29 回日本骨代謝学会年会、2011 年 7 月 30 日、大阪
- ③ 筒居秀伸、腎虚血再灌流障害の性差における腎交感神経系の関与について、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、横浜 (誌上開催)
- ④ 田中亮輔、虚血性急性腎障害に対する 17 β -エストラジオールの腎交感神経系を介した保護効果について、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22 日、横浜 (誌上開催)
- ⑤ 三浦 健、ラット腎虚血再灌流障害に対する内因性モノアミンオキシダーゼ阻害物質イサチンの効果、第 130 年会日本薬学会年会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- ⑥ 筒居秀伸、腎虚血再灌流障害に対するモノアミンオキシターゼ阻害薬の効果、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16 日、大阪
- ⑦ 田中亮輔、腎虚血再灌流障害に対する虚血性プレコンディショニング処置の腎交感神経系を介した保護効果について、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16 日、大阪

〔図書〕 (計 1 件)

岩尾 洋、雪村時人、メディカルサイエンスインターナショナル、循環器の薬理学-薬物による生体機能の修飾と臨床使用 (ベッドサイドの Basic Cardiology)、2009、263

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：腎障害の治療又は予防薬
発明者：筒居秀伸、雪村時人
権利者：学校法人 大谷学園
種類：特願
番号：2011-252450
出願年月日：2011 年 11 月 18 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雪村時人 (YUKIMURA TOKIHITO)

大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：10145774

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
山形雅代 (YAMAGATA MASAYO)
大阪大谷大学・薬学部・講師
研究者番号：50454583

研究協力者
筒居秀伸 (TSUTSUI HIDENOBU)
大阪大谷大学・薬学部・助教
研究者番号：30434806