

## 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23年 5月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591787

研究課題名（和文）心臓大血管周術期腎障害の機序解明と新たな腎保護ストラテジーの確立

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of perioperative kidney injury and establishment of the new strategy of kidney protection in Cardiovascular surgery.

## 研究代表者

本吉 直孝（MOTOYOSHI NAOTAKA）

東北大学・病院・講師

研究者番号：40375093

## 研究成果の概要（和文）：

大動物(ブタ)を用いた両側腎動脈遮断による腎虚血再灌流モデルを確立し、コントロール群と PPAR- $\gamma$  agonist (pioglitazon) 投与群での腎障害度、PPAR- $\gamma$  及びその標的遺伝子である LXR- $\alpha$  の発現を比較評価した。ブタ腎においては PPAR- $\gamma$  及び LXR- $\alpha$  は糸球体近傍の血管内皮細胞及び近位尿細管上皮に発現し局在はほぼ一致したことが示された。両群とも血清 Cr 値は再灌流後 4 時間まで時間経過に沿って上昇を認め、病理学的には概ね再灌流後 2 時間をピークに回復してくる所見を認めた。さらに定量評価を進め、比較検討を予定している。

## 研究成果の概要（英文）：

We have established the porcine renal ischemia-reperfusion injury model clamping bilateral renal arteries. Then, we assessed the degrees of kidney damage and expression of PPAR- $\gamma$  and LXR- $\alpha$  (PPAR- $\gamma$ 's target gene) in the kidney comparing the PPAR- $\gamma$  agonists administration group with control group. Both PPAR- $\gamma$  and LXR- $\alpha$  are expressed in juxtaglomerular vascular endothelial cells and proximal tubule epithelial cells in both groups. Serum creatinine are increased until 4 hours after reperfusion. Pathological damage was peaked at about 2 hours after reperfusion and recovered after that. Now, we are proceeding the quantitative assessment in both groups.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科、腎障害、腎保護

## 1. 研究開始当初の背景

心臓大血管手術における周術期腎障害は、術後の合併症や死亡率上昇に強く関連するこ

とが知られている。特に、最も手術侵襲が大きい手技を必要とする胸腹部大動脈瘤手術においては、術中の腎虚血・再灌流障害が術

後腎機能障害を惹起させる危険因子とされる。術中の腎保護法として晶質液間歇投与法の有用性が報告されており、当施設でも臨床応用することで術後経過において改善傾向を認めている。しかしながら現在も尚、術後腎機能障害が、術後 ICU 滞在期間の延長、感染合併率の上昇、退院後再入院の危険因子となっている。そこで、腎虚血再灌流障害過程におけるピボットの役割を果たす物質を追求することで、新たな腎保護ストラテジーの確立が必要となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓大血管周術期腎障害の根幹的なピボットの反応に関する仮説を打ち立て、実験モデルを用いて統合的に証明する。解明した機序に基づき、新たな腎保護ストラテジーを確立することで、手術成績のさらなる向上と予後の改善を目指すことである。

近年、nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  ligands が糖尿病性腎症を改善するだけでなく、腎虚血再灌流障害も軽減する可能性が示唆されている (Doi et al. Transplantation, 2007, Sommer et al. Am J Nephrol, 2007)。さらに PPAR- $\gamma$  は、心筋・肺・腸管での虚血再灌流障害やショックを抑制する最上流の物質である可能性が想定されている。

一方、心不全治療薬として臨床使用されている atrial natriuretic peptide (ANP) は、血圧と体液量調節作用が主であるが、それに加えて新たな作用として抗炎症作用、心筋保護作用が示されている。この生理活性物質に腎保護作用があることについては以前より報

告があり、実地臨床の間でも使用されているが、その作用機序に関しては、renin-angiotensin-aldosterone 系の抑制を介する以外のことは現在も尚解明されていない。

この適応領域の異なる PPAR- $\gamma$  と ANP の作用や効果には多くの共通点があることに着眼した。即ち、1) マクロの現象として心筋梗塞後のリモデリング抑制効果が認められている。2) 種々の組織障害モデルにおいて、炎症のパラメーターとなるサイトカインや接着分子を減少させる作用がある。3) 組織障害因子となる angiotensin II の作用を抑制する。4) 炎症反応の上流にありその強弱を決定づけている NF- $\kappa$ -B を抑制する、という共通点がある。しかし、ANP が PPAR- $\gamma$  に直接作用するという報告はこれまで全く見られていない。

本研究においては、周術期腎保護の根幹に PPAR- $\gamma$  を据え、この物質が腎虚血・再灌流障害過程でピボットの役割を果たしていることを証明する。また、PPAR- $\gamma$  と ANP の関連性についても解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 大動物(ブタ)を用いて、両側腎動脈遮断による腎虚血再灌流モデルを確立し、実際の臨床上、胸腹部大動脈瘤手術中に生じる腎虚血再灌流を模倣するモデルとする。虚血再灌流現象に伴う経時的な血行動態(心電図モニター、体血圧、SpO<sub>2</sub>、体温)と、腎生理学上のパラメーター(時間尿量、血清・尿クレアチニン濃度)の推移を捉える。

(2) 確立した大動物腎虚血再灌流モデルをコントロール群と PPAR- $\gamma$  agonists 投与群と

に分け、それぞれの再灌流後時間経過に沿った腎障害度の変化と PPAR- $\gamma$  の発現・活性を病理組織学的に評価、比較する。

(3) 同時に、腎虚血・再灌流障害の時間的推移に沿って、PPAR- $\gamma$  mRNA、タンパクの腎組織内変動を腎生検組織から quantitative RT-PCR 法及び Western blotting を用いて定量する。さらに ANP, PPAR- $\gamma$  blocker、ANP + PPAR- $\gamma$  blocker を腎虚血再灌流障害前から全身投与した場合の、同様の变化を定量評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 大動物(ブタ)腎虚血再灌流モデルの作成  
 体重約 30kg の大動物(ブタ:WL ヨークシャー×ランドレース)を用いて、胸腹部大動脈手術手技中に生じる腎虚血再灌流を模倣するための両側腎動脈遮断による腎虚血再灌流モデルを確立した。全身麻酔下に両側腎動脈を1時間遮断するプロトコルとし、虚血直前、1時間遮断後再灌流直前、再灌流後1時間、2時間、3時間、4時間の6ポイントで全身血、腎静脈血、尿、腎組織を採取し評価を行った(図1)。全身麻酔中は経時的に膀胱温、体血圧及び動脈血酸素飽和度をモニタリングし、膀胱温は37~38°Cを保持するよう管理した。PPAR- $\gamma$  agonists 投与群においては、現在臨床で使用されている pioglitazone を 5mg/kg の用量で実験7日前から連日経口投与した。

腎障害度の血中マーカーによる評価は主に血清 Cr で行っている。腎虚血再灌流後の時間経過に沿って徐々に上昇を認めている(図2)。



図1 虚血再灌流プロトコル

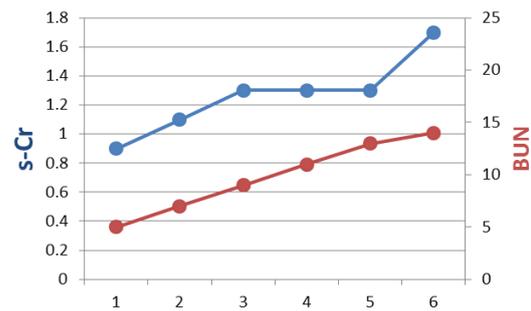


図2 血清Cr推移

#### (2) 腎虚血再灌流による障害度及び PPAR- $\gamma$ 、LXR- $\alpha$ 発現に対する病理学的評価

腎虚血再灌流後の経時的な腎障害度の変化、PPAR- $\gamma$ 、LXR- $\alpha$  の発現については病理学的評価を行った。腎障害度評価においては、糸球体毛細管内の血栓形成や充血、近位尿細管を中心とした上皮剥離物質(globule)、遠位尿細管を中心とした管腔の拡大などの所見を認め、概ね再灌流後2時間をピークに回復してくる所見が得られている。また、PPAR- $\gamma$  の発現評価指標として標的遺伝子の1つであるLXR- $\alpha$  に着目し、同時に測定を行った。基礎実験として PPAR- $\gamma$  Ab 及び LXR- $\alpha$  Ab がブタに対して work し、腎に発現し、かつ局在が一致することを確認した。免疫染色の結果、両物質とも

ネフロン近傍の血管内皮及び近位尿細管を中心とした尿細管上皮に発現し、かつ再灌流後の時間経過に沿って発現が上昇する所見を得た(図3, 4)。

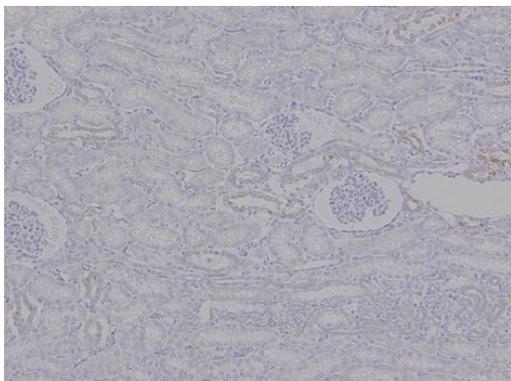


図3 PPAR- $\gamma$ 免疫染色(再灌流後2時間)

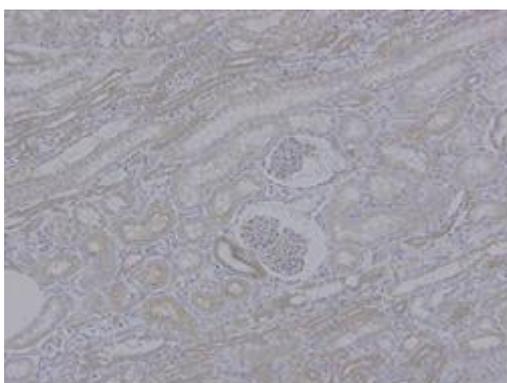


図4 LXR- $\alpha$ 免疫染色(再灌流後2時間)

(3) PPAR- $\gamma$ 及びLXR- $\alpha$ の定量評価をquantitative RT-PCR, Western blottingを行っている。現在さらなるデータ蓄積をすすめているところである。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本吉 直孝 (MOTOYOSHI NAOTAKA)

東北大学・病院・講師

研究者番号：40375093

### (2) 研究分担者

川本 俊輔 (KAWAMOTO SHUNSUKE)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20400244

高橋 悟朗 (TAKAHASHI GORO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50526449

阿部 高明 (ABE TAKAAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80292209

齋木 佳克 (SAIKI YOSHIKATSU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50372298

### (3) 連携研究者