

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791506

研究課題名（和文）腎虚血再灌流障害に対する HIF- $\alpha$  の腎尿細管再生メカニズムの解明研究課題名（英文）Amelioration of Acute Tubular Necrosis in Ischemic Acute Renal Failure was Impaired in Mice Lacking Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene

研究代表者

山口 邦久 (YAMAGUCHI KUNIHISA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90464346

研究成果の概要（和文）：

HIF-1 $\alpha$  kd mice では、IR (ischemia-reperfusion) 後の BUN が高値に推移し、腎組織における尿細管壊死の所見も高度、さらに IR 後 2 4 h 以降も腎機能の増悪、腎機能回復が遅延していた。一方 WILD type mice では、IR 後 2 4 h より細胞増殖の指標である Ki-67(+)細胞が、kd mice と比較して有意に増加しており、Pax-2(+)細胞も同様に増加していることが確認できた。HIF-1 $\alpha$  の有無によるこれらの相違が確認できたことから、IR 後の各モデルマウスの腎組織についてマイクロアレイ解析を行い、ストレス応答や細胞・組織修復に関係していると考えられる遺伝子がいくつか存在することを確認した。そのうち A 遺伝子、B 遺伝子をピックアップし、HIF-1 $\alpha$  による腎尿細管再生制御に関わる分子メカニズムを解明してゆく予定である。

研究成果の概要（英文）：

The mutant mice (HIF-1 kd) showed a prolonged elevation of blood urea nitrogen (BUN) levels up after ischemia-reperfusion, compared to the control mice. On the other hand, the cell proliferation that was evaluated by expression of Ki-67 increased in the control mice, in comparison with the mutant mice from early phase. Thus, tissue damage by ischemic injury was prolonged and recovery of renal function was delay in the mutant mice kidney. We are going to pursue further mechanism about this problem according to results of microarray analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・再生学

キーワード：HIF- $\alpha$ ・IRI・再生

## 1. 研究開始当初の背景

腎の虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury ; IRI) は、急性尿細管壊死 (acute tubular necrosis ; ATN) を主体とする急性腎不全 (acute renal failure ; ARF) を引き起こす原因の一つである。臨床的にはショック、敗血症等の重篤な全身性疾患に関与した急性腎不全を多く経験するが、泌尿器科領域の手術では手技の一環として腎 IRI-ATN、ARF が問題になることがある。腎移植術や腎部分切除術はその代表例であるが、近年、慢性腎臓病 (CKD) の概念が広まり、腎細胞癌の手術法は nephron-sparing surgery-腎部分切除術の適応が拡大している。また慢性腎不全の最終的な治療法である腎移植術も、移植法の改定に伴い、少しずつではあるが増加してゆくことが予想される。臨床的に ATN による ARF からの腎機能回復は、数日~数週間であることはよく知られているが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。従って臨床の場で、いかに IRI-ARF (ATN) からの回復を促進し、早期の腎尿細管再生を得られるかは現在も非常に重要な問題である。IRI のように組織が低酸素状態に曝された場合、細胞内の酸素ホメオスターシスの維持において重要な役割を果たす転写因子として HIF (hypoxia inducible factor)-1, 2 が知られている。HIF は、低酸素下におかれた細胞の生存に深く関わっていることが分かっており、過去には HIF-2 $\alpha$  knockdown mice に腎 IRI を引き起した場合、HIF-2 $\alpha$  の発現低下は、血管障害を主因として腎障害が増悪する (Kojima et al, J Am Soc Nephrol 18, 1218-1226, 2007) との報告があるが、腎再生との関与は明らかではない。我々は HIF-2 $\alpha$  が主に腎尿細管周囲の血管内皮細胞に発現が限られているのに対し、HIF-1 $\alpha$  は腎の全般に発現 (主に尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞) していること

に注目し、HIF-1 $\alpha$  は HIF-2 $\alpha$  とは異なり、低酸素下での尿細管細胞の生存と、腎尿細管の再生にも関わるのではないかという仮説を立て、我々の研究室ですでに作成に成功している HIF-1 $\alpha$  kd (knockdown) mice と WILD type mice に対する同様の腎 IRI モデル (右腎摘除+左腎 45min 虚血-再灌流) を作成し検討した。IRI 後の腎組織の HE 染色、腎発生や腎再生、腎前駆細胞のマーカーとされる Pax-2 の免疫組織染色で確認を行うとともに、腎再生制御に関わる分子メカニズムの解明をめざした。

## 2. 研究の目的

### 1) IRI モデルマウスの腎障害の評価

血液学的腎障害と病理学的腎障害の評価として、IRI モデルマウス (HIF-1 $\alpha$  kd マウス VS Wild Type マウス) の腎虚血前と腎虚血後 24 時間、48 時間、72 時間の血液サンプル、左腎を採取し、HIF-1 $\alpha$  の有無による腎障害の相違を確認する。BUN、Cre の測定と腎組織の HE 染色、Ki-67 の免疫組織染色を行う。

### 2) IRI モデルマウスの虚血-再灌流腎における nephrogenic protein 発現の有無を評価

HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の IRI 後の腎組織において、腎発生や腎再生時に再発現するとされる nephrogenic protein の発現に相違があるか確認する。

## 3. 研究の方法

1) HIF-1 $\alpha$  kd, WILD type (C57 BL/6)、雄性 8~12 週齢 mice を使用。IRI モデル作成は、

ペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔導入し、左腎動静脈をクランプし血流を遮断する。腎阻血時間は45分間とし、クランプを解除し血流再開する。右腎は左腎の血流遮断直前に摘出しておく。それぞれの IRI モデルマウスの腎虚血前と腎虚血後24時間、48時間、72時間の血液サンプル、左腎を採取し、BUN、Cre の測定と腎組織の HE 染色、Ki-67 の免疫組織染色を行う。

2) HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の虚血-再灌流後の腎組織における、腎発生や腎再生、腎前駆細胞のマーカーとされる Pax-2 を免疫組織染色にて確認する。出現数、出現部位、増加が認められる時間（虚血-再灌流後からの時間）の相違を確認する。

3) HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の IRI モデルにおいて、腎障害評価の time point とは異なる再灌流後6h、12h、24hの時点で腎 sample を採取。それぞれの mice の無処置の腎 sample も加え、各ポイントの腎（特に強い障害が生じる皮質髄質境界部の尿細管をマイクロダイセクションにて採取）より total RNA を採取し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行う。

#### 4. 研究成果

IRI モデルマウスによる実験で、HIF-1 $\alpha$  kd mice では、WILD type mice と比較して BUN が高値に推移することが IRI 後の血液サンプルより確認できた。腎組織における尿細管壊死の所見も HIF-1 $\alpha$  kd mice で高度であり、さらに虚血-再灌流後24h以降も腎機能の増悪、腎機能回復が遅延していた。一方 WILD type mice では、虚血-再灌流後24hより細胞増殖の指標である Ki-67(+)細胞が、HIF-1 $\alpha$  kd mice と比較して有意に増加しており、腎発生や腎再生時に発現するとされる Pax-2(+)細胞も同様に増加していることが免疫染色で確認できた。

ATN 後の尿細管再生において重要となる前駆細胞の存在については、さまざまな議論があるが、Loverre らは腎虚血障害後の ANT 回復期において、尿細管修復のために前駆細胞的役割を果たす細胞として pax-2(+)細胞の出現を報告している (Transplantation 85:1112-1119, 2008)。HIF-1 $\alpha$  の有無によるこれらの相違が確認できたことから、さらに我々は IRI における HIF-1 $\alpha$  の尿細管再生制御の可能性を明らかにするため、腎虚血-再灌流処置後の HIF-1 $\alpha$  kd mice、WILD type mice の腎組織についてマイクロアレイ解析を行った。

網羅的遺伝子発現解析の分析からストレス応答や免疫応答、細胞・組織修復に関係していると考えられる遺伝子がいくつか存在することが示唆された。そのうち A 遺伝子、B 遺伝子をピックアップし、今後細胞レベルでの確認と A 遺伝子、B 遺伝子と HIF-1 $\alpha$  との相互作用と、細胞内での動きや別の因子との相互作用を確認しすることで、最終的には HIF-1 $\alpha$  による腎尿細管再生制御に関わる分子メカニズムを解明してゆく予定である。

#### 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 3 件)

1. Ishizawa K, Yamaguchi K, Horinouchi Y, Fukuhara Y, Tajima S, Hamano S, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T

Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): development of drugs on endothelial cell protection for overcoming CKD.

J Pharmacol Sci 109・1, 14-19 2009 (査読有)

2. Motobayashi Y, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Orino S, Yamaguchi K, Kawazoe K, Hamano S, Tsuchiya K, Tomita S, Tamaki T

Adiponectin inhibits insulin-like growth factor-1-induced cell migration by the suppression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation,

but not Akt in vascular smooth muscle cells.  
Hypertens Res 32・3, 188-193 2009 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 富田修平

Amelioration of Acute Tubular Necrosis in Ischemic Acute Renal Failure was Impaired in Mice  
第 36 回国際生理学会世界大会 (IUPS 2009)  
2009/7/27-8/1

2. 富田修平

AMELIORATION OF ACUTE TUBULAR NECROSIS IN ISCHEMIC ACUTE RENAL FAILURE WAS IMPAIRED IN MICE LUCKING HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1ALPHA GENE.  
The 9th World Congress on Inflammation  
2009/7/6-10

3. 富田修平

Amelioration of acute tubular necrosis in ischemic acute renal failure was impaired in mice  
第 30 回日本炎症・再生医学会  
2009/7/6-10

4. 山口邦久

Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ は、腎虚血再灌流障害による急性尿細血管壊死の軽減と回復に關与する  
第 52 回日本腎臓学会学術総会  
2009/6/3-5

5. 山口邦久

Amelioration of Acute Tubular Necrosis in Ischemic Acute Renal Failure was Impaired in Mice Lacking Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene  
WCN 2009. 5. 23

6. 山口邦久

腎虚血-再灌流障害に対する Hif-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ) が与える影響に關する検討  
日本泌尿器科学会 2009. 4. 16

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 邦久 (YAMAGUCHI KUNIHISA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：90464346

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無