

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07625

研究課題名(和文) 造影剤腎症における新規RASペプチドの役割

研究課題名(英文) Role of non-classical renin-angiotensin system in contrast induced nephropathy

研究代表者

茂庭 仁人(Moniwa, Norihito)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：50749786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生理食塩水によるhydrationおよび利尿薬と生理食塩水による強制hydrationでは、ネクロトーシスを抑制し造影剤腎症を予防することが示された。hydrationは糸球体上皮細胞の障害を亢進することが示され、強制hydrationはこの作用を軽減することが示された。炎症関連蛋白がhydrationおよび強制hydrationのいずれも亢進を認め、両者による造影剤腎症予防効果が限定的な理由の一つと推察される。当初、RASペプチドと受容体について解析を行う予定だったが、抗体が上手く作用しなかったこと、糸球体上皮細胞障害と炎症関連蛋白が予想外の結果を示したことから、研究計画を一部変更した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)では心血管イベントの発症が多いが、CKDは造影剤腎症(CIN)の最大のリスク因子であり、冠動脈造影などがためらわれることが少なくない。本研究では、慢性腎臓病モデルを用いて、生理食塩水によるhydration、利尿薬と生理食塩水併用による強制hydrationの造影剤腎症予防効果の機序を解明した。尿細管障害の指標に差はなく、hydrationにより糸球体上皮細胞障害が亢進し、強制hydrationによりこの作用が抑制されたこと、hydrationおよび強制hydrationで炎症関連蛋白が亢進したことは、新規知見であり今後の造影剤腎症予防・治療法確立の端緒となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CM increased serum creatinine (s-Cre), BUN and urinary albumin levels and also protein levels of RIP1, RIP3, cleaved caspase 3, and caspase 8 in renal tissues.

Necrostatin-1, an RIP1 inhibitor, administered before and 24 h after CM injection significantly suppressed elevation of s-Cre, BUN and urinary albumin levels and KIM-1 expression in renal tissues after CM injection. Saline infusion before CM injection suppressed elevation of s-Cre and BUN. The combination of saline with furosemide or tolvaptan additionally suppressed urinary albumin with inhibition of CM-induced upregulation of renal RIP1 and RIP3 expression, though KIM-1 expression was not reduced. The results suggest that necroptosis contributes to CIN in CKD. The combination of saline infusion with furosemide or tolvaptan before CM injection has favorable effects on CIN, which are unlikely to be mediated by direct alleviation of renal tubular injury.

研究分野：Acute kidney injury

キーワード：acute kidney injury inflammation hydration forced hydration

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病や高血圧を背景とした慢性腎臓病 (CKD) が増加している。CKD 患者は心筋梗塞や脳卒中の発症が多く、癌合併患者も増加しており、ヨード造影剤を用いた血管造影や CT の必要性が高い。しかし CKD 自体が造影剤腎症の危険因子であり、造影剤の使用が躊躇される場面が多い。レニン・アンジオテンシン (Ang II) 系 (RAS) 阻害薬は CKD に対する保護効果が確立しているが、RAS 阻害薬の新規内服は造影剤腎症の危険因子となるなど、造影剤腎症における RAS の役割は不明な点も多い。申請者は Ang II の前投与がオートファジー亢進を介し急性腎障害 (AKI) に対し保護的に働くこと、CKD モデルにおける造影剤腎症の機序にネクロトーシスが関与することを見出した。

一方、近年「ACE2/Ang-(1-7)/Mas 受容体 (R) 経路」や「Alamandine/MrgD 経路」という新規 RAS が注目されている。

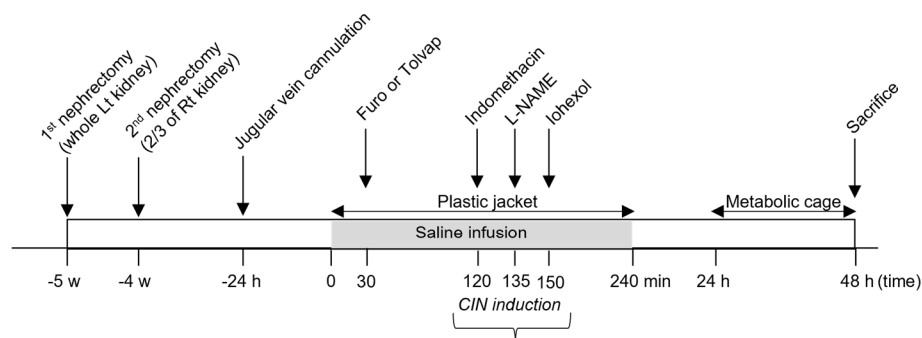
造影剤腎症は有効な治療法は無く、生理食塩水による予防が広く行われているが、その効果は限定的である。近年、利尿薬と生理食塩水を用いた強制 hydration による造影剤腎症予防効果が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、造影剤腎症における新規 RAS、オートファジー、ネクロトーシスの関与を明らかにし新しい造影剤腎症治療の開発を目指す。

また利尿薬と生理食塩水を用いた強制 hydration による造影剤腎症予防効果とその機序について新規 RAS、オートファジー、ネクロトーシスの観点から検討する。

3. 研究の方法



SNx group	+	+	+	-	-
SNx+CM group	+	+	+	-	+
SNx+Sal+CM group	+	+	+	-	+
SNx+Sal/Furo+CM group	+	+	+	+	+
SNx+Sal/Tolvap+CM group	+	+	+	+	+

8 週齢 SD ラットを用いて左腎を摘出、1 週間後に右腎上極・下極を 1/3 ずつ切除することにより 5/6 腎摘を施した。13 週齢で 5/6 腎摘ラットに頸動静脈カニューレ後、プラスチック製拘束筒に入れ、インドメタシン (10 mg/kg)、N-omega-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 mg/kg)、ヨード系造影剤・イオヘキソール (1,600 mg I/kg) を 15 分間隔で経静脈的に投与することにより造影剤腎症を作成した。

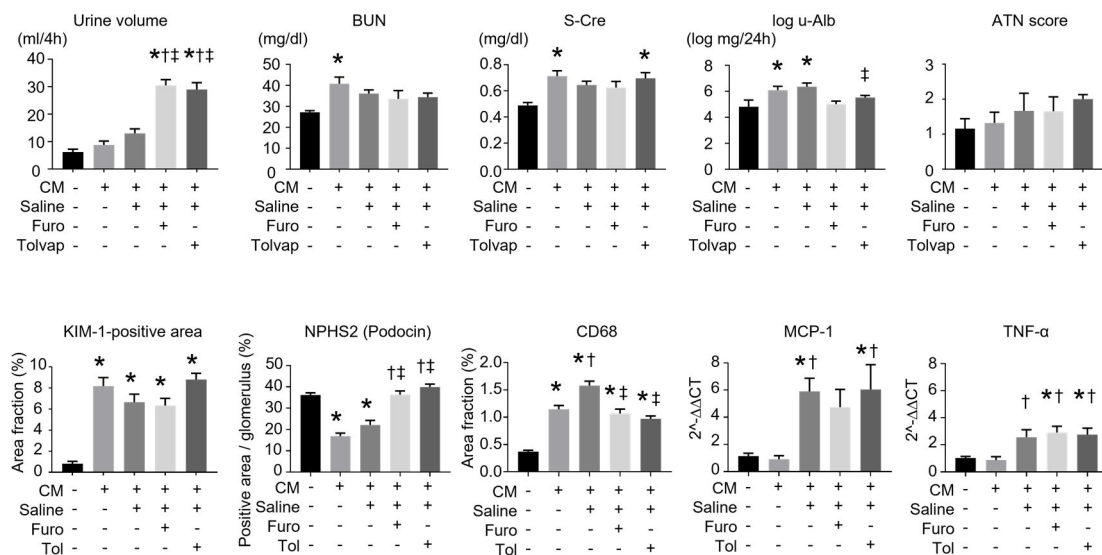
5/6 腎摘ラットをコントロール群 (SNx 群)、造影剤腎症群 (SNx + CM 群)、生理食塩水 + 造影剤腎症群 (SNx + Sal + CM 群)、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群 (SNx + Sal/Furo + CM 群)、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群 (SNx + Sal/Tolvap + CM 群) の 5 群に分け、48 時間後に sacrifice

し、血中クレアチニン(Cr)、血液尿素窒素(BUN)、尿アルブミンを測定、尿細管障害スコアを評価、Kim-1、NAG、糸球体上皮細胞障害の指標として NPHS2(Podocin)を、ウェスタンブロット法、免疫染色、RT-PCR にて評価した。オートファジー関連蛋白(LC3、p62、AMPK)、ネクロプトーシス関連蛋白(RIP1、RIP3、pMLKL)、炎症関連蛋白(CD64、MCP-1、TNF- α)をウェスタンブロット法、免疫染色法により評価した。当初、RAS ペプチド[Ang II、Ang IV、An-(1-7)、Alamandine]と、その受容体(AT1R、AT2R、AT4R、MasR、MrgD)について解析を行う予定であったが、市販の抗体が上手く作用しなかったこと、糸球体障害の指標と炎症関連蛋白が予想外の結果を示したことから、炎症関連蛋白の解析に注力するよう、当初の研究計画を変更した。

4. 研究成果

尿量は他の 3 群と比較し、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で有意に増加した。BUNはコントロール群と比較し、造影剤腎症群で上昇し、生理食塩水 + 造影剤腎症群、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で部分的に抑制された。S-Cre はコントロール群と比較し、造影剤腎症群と生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で高値であり、生理食塩水 + 造影剤腎症群、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群で部分的に抑制された。尿アルブミンはコントロール群と比較し、造影剤腎症群、生理食塩水 + 造影剤腎症群で上昇し、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で部分的に抑制された。ネクロプトーシスシグナルである RIP1、RIP3 は造影剤腎症群で上昇し、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で低下した。炎症性マクロファージである CD64 は、コントロール群と比較し、造影剤腎症群で上昇、生理食塩水 + 造影剤腎症群で更に上昇し、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で部分的に抑制された。炎症性サイトカインである MCP-1 と TNF- α はコントロール群と比較し生理食塩水 + 造影剤腎症群、生理食塩水 + フロセミド + 造影剤腎症群、生理食塩水 + トルバプタン + 造影剤腎症群で上昇した。

生理食塩水による hydration および利尿薬と生理食塩水による強制 hydration では、ネクロプトーシスを抑制し造影剤腎症を予防することが窺われた。生理食塩水による hydration は糸球体上皮細胞の障害を亢進することが示され、利尿薬と生理食塩水による強制 hydration は、糸球体上皮細胞の障害を軽減することが示された。炎症関連蛋白が hydration および強制 hydration のいずれも亢進を認めたことから、これらによる造影剤腎症予防効果が限定的な理由の一つである可能性が窺われた。



*: p<0.05 vs CM (-), i.e., SNx, †: p<0.05 vs CM (+), i.e., SNx+CM, ‡: p<0.05 vs CM (+), Saline (+), i.e., SNx+saline+CM

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 歩、茂庭 仁人、柴田 智、田中 希尚
2. 発表標題 トルバプタンと生理食塩水による造影剤腎症予防効果
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022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	丹野 雅也 (Tanno Masaya) (00398322)	札幌医科大学・保健医療学部・教授 (20101)	

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