

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09346

研究課題名（和文）スタチンのMMP阻害による好中球浸潤を介した腎保護の証明

研究課題名（英文）MMP inhibition of statins proves renal protection via neutrophil infiltration

研究代表者

吉永 香澄 (Yoshinaga, Kasumi)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70833276

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）：in vitroイメージングにおいてスタチン投与で虚血再灌流後の糸球体への好中球集積が軽減することが示された。また、スタチン投与群は非投与群よりも虚血再灌流翌日のCr値が低値となる傾向にあった。一方、活性型MMP-9と総MMP-9を定量したところ、我々の予想と反しControl群に比してStatin群でよりactive, total MMP-9濃度ともに上昇した。t=1よりt=6の方がactive/total比が低く、時間とともに活性が低下していると思われた。スタチンの多面的作用が複雑に絡み合い今回の結果が生じた可能性が考えられた。これを踏まえ、他薬剤を用いた同様の研究に取り組んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血再灌流障害が移植腎の生着にもたらす影響は大きく、それには好中球浸潤が主要な役割を担っている。白血球が組織に浸潤するためにはmatrix metalloproteinases(MMP)の存在が必要不可欠である。高脂血症治療薬のスタチンにはMMP阻害作用があり、好中球浸潤の抑制を介して組織障害を軽減する作用を持つと考えた。今回、イメージングや血清Cr値は上記仮説を後押しする可能性を示したが、MMP定量に関しては相反する結果を認めた。活性の抑制以外に発現や放出の抑制があるのか検討したり、他剤変更でより望ましい結果を得られるものがあるのか等、今後の研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：In vitro imaging showed that statin treatment reduced neutrophil accumulation in the glomerulus after ischemia-reperfusion. In addition, Cr levels on the day after ischemia-reperfusion tended to be lower in the statin group than in the non-treated group. On the other hand, the active and total MMP-9 levels were higher in the statin group than in the control group, contrary to our expectation. t=6 had a lower active/total ratio than t=1, suggesting a decrease in activity over time. The pleiotropic effects of statins may have complicated the results of this study. Based on this, we are working on similar studies using other drugs.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 虚血再灌流障害 好中球 MMP スタチン

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流における臓器障害の進行には好中球が重要な役割を果たしている。再還流により虚血に陥っていた血管内皮細胞がサイトカインを産生し、引き続いて好中球やマクロファージの遊走因子が産生される。浸潤した好中球やマクロファージが細胞障害性サイトカインや酸素派生物質を産生し、組織障害を引き起こされる。虚血再灌流障害は移植腎機能遅延、急性/慢性拒絶反応の発現増加に關与する(Bryan CF, et al. *Transplantation*. 2001. 71, 875-879.; Dragun D, et al. *Kidney Int*. 2001. 60, 1173-1181.)。したがってこの段階で炎症を抑えることが移植腎の生着延長へとつながる。

我々は動物モデルにおいて好中球浸潤を阻害することで組織障害が緩和されることを証明した (Araki M, et al. *Curr Opin Organ Transplant*. 2004. 9, 139-144.)。そして、白血球浸潤抑制物質として matrix metalloproteinases (MMP)に着目してきた。好中球の顆粒内には MMP-9 が存在し、これが細胞外マトリックスの分解を行うことで好中球が血管外に浸潤し組織障害を引き起こされる。ドキシサイクリンは MMP を広く抑制する作用があり、ラットの四肢をはじめとした虚血再還流障害における動物実験で広く用いられている(Roach DM, et al. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002. 23, 260-269.)。我々も腎臓の虚血再灌流において、ドキシサイクリンが好中球を含む白血球の組織浸潤を阻害し、組織障害が軽減されたことを確認した。しかし、抗菌薬であるが故に長期投与に問題がある。そこで高脂血症治療薬であるスタチンに着目した。長期投与が可能であるスタチンにはコレステロール低下以外にも様々な多面的効果があり、その一つが MMP 阻害である。腎虚血再灌流障害モデルにおいてスタチンの MMP 阻害作用が好中球浸潤を抑制することで組織障害が軽減されるという「仮説」を立証し、新しい腎保護の可能性にチャレンジする。

2. 研究の目的

“スタチンの MMP 阻害により好中球浸潤が抑制され組織障害が軽減する”という仮説の証明である。これにより腎虚血再還流障害における新しい治療を目指す。腎虚血再灌流障害において、スタチンの MMP 阻害作用には酸化ストレスから細胞を保護する Nfr2 タンパク(Zhang Yu, et al. *Exp Ther Med*. 2017. 14, 4460-4466.) やコレステロール生合成に関わるメバロン酸経路(Sharyo S, et al. *Kidney Int*. 2008. 74, 577-584.)が關与していることがわかっている。しかし未だに不明な点が多く、好中球浸潤の關与については十分に解明されていない。したがって学術的に極めて独自性が高い。

腎虚血再灌流は腎移植時だけでなく急性腎不全や腎腫瘍に対する腎部分切除術の際にも見られる障害である。すなわち本研究は将来的には腎移植にとどまらず、今後増えゆく慢性腎臓病や腎腫瘍など広範囲の疾患に対しても腎保護作用を示す可能性が高い。また MMP は心筋梗塞、大動脈解離の発症にも關与しており、マウスモデルにおいて MMP 阻害剤投与によってこれらの発症を軽減できたという報告がある (Pyo R, et al. *J Clin Invest*. 2000. 105, 1641-1649.)。ある程度長期間のスタチン投与が必要となった場合も心筋梗塞、大動脈解離の発症軽減といった副次的な利益が生まれる可能性がある。このように本申請は非常に創造性と発展性に富む研究である。

3. 研究の方法

本研究は腎虚血再還流モデルマウスを用いる。2種類のスタチンを用い、投与群とコントロール群の比較検討を行う。具体的な方法は以下のとおりである。

○腎虚血再灌流モデルマウス：8-12週の雄性C57BL/6マウスを麻醉下に開腹し、腎動静脈を一括クランプする。マウスの腹腔内温度を37°Cに保ち、30-45分後に腎動静脈をアンクランプする。

○マウスへの薬剤の投与とMMP活性抑制の確認：もっとも臨床で頻用されているロスバスタチン(10mg/kg/day)とアトルバスタチン(10mg/kg/day)を虚血前より7日間、傾向投与する。ザイモグラフィに代わる定量的アッセイとしてMMP-9定量キット(活性型と総MMP-9測定)を用いてMMP-9活性の抑制を確認する。

腎障害の違いを経時的に比較検討：スタチン投与群とコントロール群の虚血再還流後の腎障害の違いを24時間後の血清クレアチニンを測定することによって比較検討する。

○多光子レーザー顕微鏡を用いた好中球リアルタイムイメージング：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の好中球動態イメージングを行う。Albumin from Bovine Serumで血流を可視化し、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。これによる糸球体への好中球集積の程度を比較する。

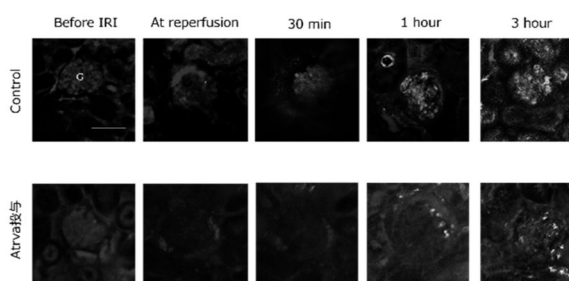
4. 研究成果

in vitroイメージングにおいて、虚血再灌流後3時間までの好中球動態を観察し、スタチン投与により虚血再灌流後の糸球体への好中球集積が軽減されることが示された。

また、虚血再灌流後24時間の血清Cr値の比較では、非虚血のControl群、非投薬下に30分虚血した群、

Rosvastatin内服の30分虚血群で最も高値ではあるものの、3群間に統計学的有意差は認めなかった。

腎虚血再灌流後の腎糸球体における好中球動態
-健常マウスとAtrva投与マウス-

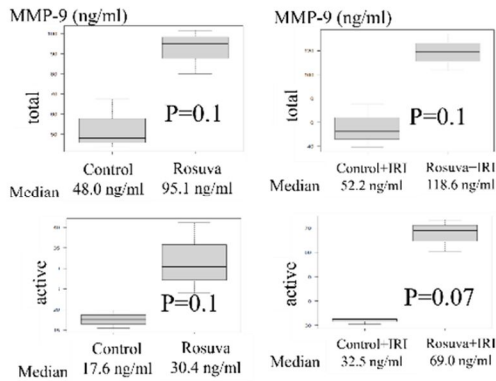


Atrva投与で糸球体への好中球集積が軽減

一方で、我々の予想と反し、Control群に比してRosuvastatin群でよりactive, total MMP-9濃度ともに上昇していた(有意差なし)。両群とも虚血再灌流操作によりtotal MMP-9濃度は上昇するも両群間の有意差はなかった。active/total ratioはIRIに伴い両群ともに上昇しており、MMP-9がIRIにより活性化していることが示唆された。

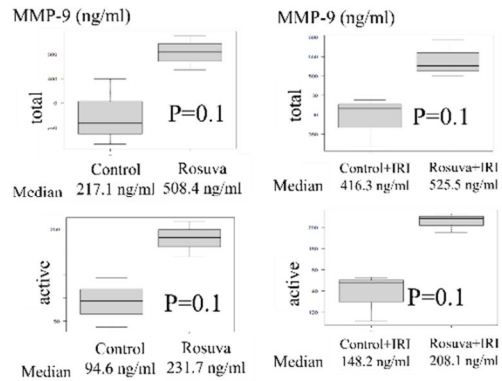
t=1,6ともに上記傾向は変わらないが、t=6の方がactive/total比は低く、時間とともに活性が低下している可能性が考えられた。

血清結果(1時間後)



- IRIの有無に関わらず、Controlに比べRosuva群でactive, total MMP-9ともに上昇(有意差なし)

血清結果(6時間後)



- IRIの有無に関わらず、Controlに比べ、Rosuva群でactive, total MMP-9ともに上昇(有意差なし)

スタチンは多面的作用を示す薬剤として知られており、そのうちの1つにMMP減少作用がある。スタチン内服によりControl群よりもRosuva群でactive, totalMMP-9濃度は低下しているものと考えていたが、相反する結果となった。MMP-9の活性抑制についての報告はあるが発現自体や放出抑制については定かではない。実際、Cr値や好中球集積については予想した傾向が見受けられ、スタチンの多面的作用が複雑に絡み合い今回のような結果が生じた可能性が考えられた。この結果が、スタチンが多面的作用を持つが故なのか、他薬剤では異なった結果が出るのか、新たな疑問が生じた。本研究を踏まえ、他薬剤を用いた同様の研究に取り組み、より適した臨床応用可能な治療薬の発見・開発に臨んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	荒木 元朗 (Araki Motoo) (90467746)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
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