

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590886

研究課題名（和文）

新たな疾患概念「腎障害におけるRASを介した腎・肺連関」の確立

研究課題名（英文）

Establishment of a new disease concept “the kidney and lung correlation through RAS in a renal damage”

研究代表者

佐藤 和一 (SATO WAICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90508920

研究成果の概要（和文）：この研究課題に対して以下の結果を得た。CKDモデル（5/6腎摘出）では、肺でのMKの産生が増加した。内皮細胞にMKのsiRNA投与することでMKの産生量が減少した。このsiRNAを吸入させたが、MKの産生量は減少しなかった。別のCKDモデル（L-NAME投与+片腎摘出）では、MK欠損型マウスにおいて血圧上昇を認めなかったが、野生型マウスとMKノックアウトマウスで血清、肺でACEの差は認められなかった。AKIモデル（両側IRIモデル・両側腎摘出モデル）では、肺に好中球浸潤と浮腫上の変化を認めた。尿細管細胞を用いた低酸素暴露実験において細胞内のMK上昇は認められなかったが、上清中のMKの発現量は経時的に上昇を認めた。新規ARDS/ALI発症患者において、人工呼吸器管理の日数増加するにつれ、AKIグループの方が非AKIグループよりも優位に死亡率が増加した。

研究成果の概要（英文）：The outcome to this research task was as follows. In the CKD model (5/6 nephrectomy), MK expression increased in a lung. In vitro, the amount of production of MK decreased by transfection of MK-siRNA into endothelial cells. Although the mouse was made to breathe in this siRNA, MK expression did not decrease. In another CKD model (L-NAME administration +Uninephrectomy), blood pressure did not elevated in MK deficient mice. there was no difference of ACE expression in serum or a lung between wild type mice and MK defficient mice. In the AKI model (bilateral IRI model and bilateral uninephrectomy), the change on neutrophil infiltration and edema was obserbed in the lung. In the low oxygen exposure experiment which used the renal tubular cells, intracellular MK expression did not increase but the amount of production of MK in serum increased temporally. In the new ARDS/ALI patients, , mortality rate in the non-AKI group increased significantly rather than the AKI group as the long period of time of respirator management.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：ミッドカイン、急性腎障害（AKI）、慢性腎臓病（CKD）、RAS

1. 研究開始当初の背景

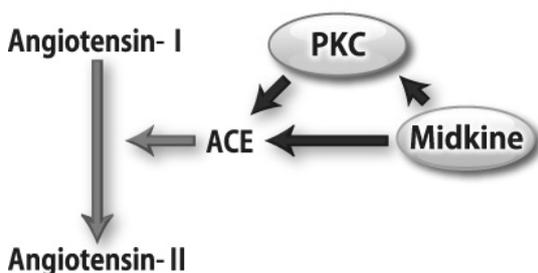
近年、急性・慢性を問わず腎障害と多臓器障害との連関が注目されている。急性腎障害 (AKI) に関しては、肺との密接な連関が注目され、実験レベルでそのメカニズムが明らかにされつつある (Rabb H et al. *Kidney Int* 63: 600-606, 2003)。一方、慢性腎臓病 (CKD) においては特に心血管病との連関 (心腎連関) が注目されているが、心血管系以外の臓器との連関については全く評価されていない。

一方、renin-angiotensin-system (RAS) は腎障害進行のもっとも重要な因子となっているが、肺も RAS 活性化に必須の臓器である。しかし、肺障害における RAS の関与及び RAS を介した腎臓・肺のクロストークについては全く検討されていないのが現状である。

申請者らはこの二つの臓器障害を連携する重要な因子として RAS に着目して、ここに「RAS を介する腎・肺クロストーク」という新たな疾患概念を提唱し、その疾患概念の確立・クロストークのメカニズム・新たな腎障害治療戦略の確立を本研究の主眼とする。

2. 研究の目的

申請者らは、既に、CKD モデル (5/6 腎摘) の検討から、腎・血清中・肺におけるミッドカイン (MK) の発現増強及び、肺での MK 依存性のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性化を確認し、RAS 活性化を介した肺腎連関を確認した。この過程で、下記に示すように新規 RAS 活性化物質としての MK の作用点を解明した (J Clin Invest 2009)。



以下の図でそれぞれ CKD、AKI における「RAS

を介する腎・肺クロストーク」の疾患概念図を示す。



<仮説-1 : CKD における肺腎連関>

CKD により誘導された酸化ストレスなどにより、肺で MK 依存性に RAS が活性化する。その結果誘導されたアンジオテンシン (AT) II あるいは高血圧によりさらに腎障害が進行する悪循環が形成される。

<仮説-2 : AKI における肺腎連関>

AKI において、肺で MK 依存性に RAS 活性化が生じる。急性期での RAS 活性化は AT II を介した肺局所での炎症が誘導され、ALI /ARDS へと進展する。

<仮説-3 : 新たな RAS 活性化物質としての MK の産生機序と RAS への作用点の解明>

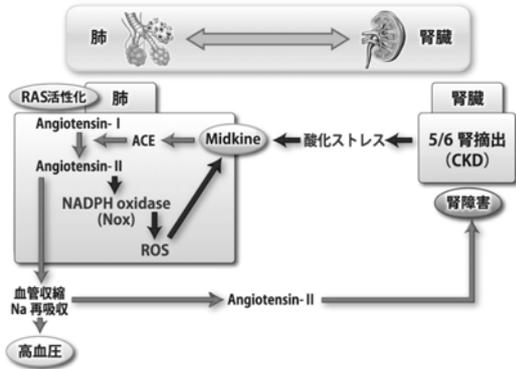
Midkine の産生機序として、AKI においては、虚血により HIF1 依存性に腎・肺において MK の産生が誘導される。一方、CKD においては、酸化ストレスにより腎臓・肺で MK が発現上昇する。この結果 ACE が活性化され、高血圧・炎症細胞浸潤へ進展する。MK は肺において、直接あるいは PKC の活性化により ACE の発現増加・活性化に関与すると考えている。

3. 研究の方法

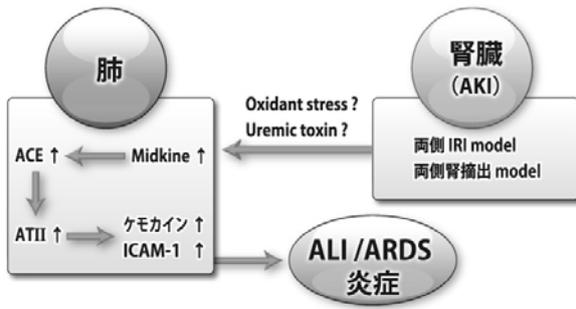
本研究では研究目的を達成するために以下の研究計画・方法に沿って実施する。

- (1) CKD モデルである 5/6 腎摘出モデルを野生型マウスで作成し、吸入 siRNA 投与することで肺内の MK 発現を抑制している

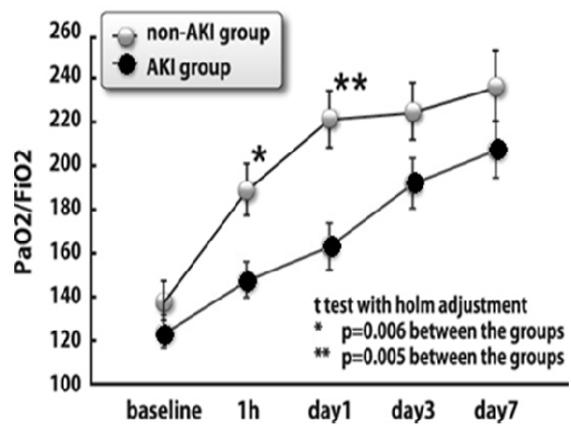
ことを確認し、ACE や ATII などを測定することで RAS 依存性の高血圧が抑制されていることを証明し、腎障害を軽減できることを病理学的に検討する。



(2) AKI モデルである両側 IRI モデル・両側腎摘出モデルを野生型と MK 欠損マウスで作成し、MK 発現が HIF-1・依存性であることを確認し、肺障害を病理学的に検討し、肺内炎症性サイトカイン及び Midkine 依存性 RAS 活性化を測定し局在を免疫染色で確認する。



(3) ①新規発症高血圧患者の腎機能、血中ミッドカイン濃度、血中 AT-II 濃度及び血圧の相関、及び正常人との比較、② ARDS/ALI 患者の肺胞洗浄液中の MK と AT-II 濃度、各種ケモカインのプロファイリングという臨床研究をすることで「RAS を介する腎・肺クロストーク」という疾患概念を確立する。



＜臨床研究の詳細＞

①新規発症高血圧患者の腎機能、血中ミッドカイン濃度、血中 AT-II 濃度及び血圧の相関、及び正常人との比較に関する臨床研究 : IRB 臨床研究申請中、YUMIN 登録計画

目標症例数：新規発症高血圧患者 100 人
正常コントロール 50 人

登録期間：IRB 承認取得後 1 年間

参加施設：名古屋大学医学部附属病院 腎臓内科・循環器内科

評価項目：腎機能評価 (BUN/Cre、eGFR、シスタチン C)

血中ミッドカイン・ATII 濃度測定：ELISA (名古屋大学 IRB・倫理委員会承認済み)

②ARDS/ALI 患者の肺胞洗浄液中の MK と AT-II 濃度、各種ケモカインのプロファイリングに関する臨床研究：公立陶生病院 IRB 承認済み、名古屋大学 IRB 臨床研究申請中、YUMIN 登録計画

対象症例：過去 15 年間に公立陶生病院にて発症した ARDS 症例

参加施設：名古屋大学医学部附属病院、公立陶生病院腎臓内科・呼吸器内科

公立陶生病院腎臓内科・呼吸器内科との共同研究にて行う

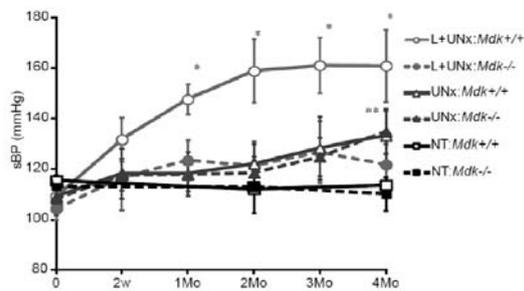
評価項目：腎機能評価 (BUN/Cre、eGFR、シスタチン C) 肺胞洗浄液中の MK と AT-II

濃度、各種ケモカイン：ELISA、WB、RT-PCR

4. 研究成果

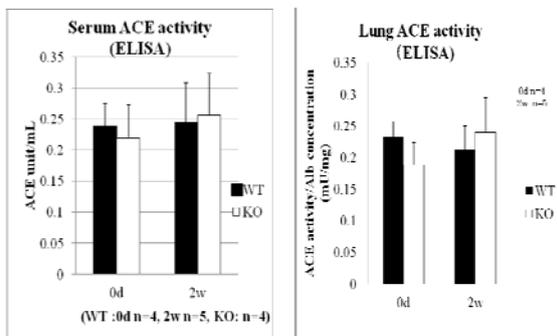
CKD モデルである 5/6 腎摘出モデルを野生型マウスで作成することで、肺での MK の産生が増加していることを確認した。In vitro において MK の siRNA 投与することで MK をノックダウンすることを確認した。5/6 腎摘出モデルに siRNA 吸入投与したが、MK の産生量を減少することが出来なかった。これは肺まで siRNA が到達していなかったこと、血管内皮細胞への siRNA トランスフェクションが低いことなどが原因と考えられた。

次に CKD モデルである内皮障害モデルを片腎摘出と L-NAME 投与することで作成した。野生型マウスと MK 欠損型マウスにおいて血圧の差は認められた。



(図3:内皮細胞障害モデルの血圧)

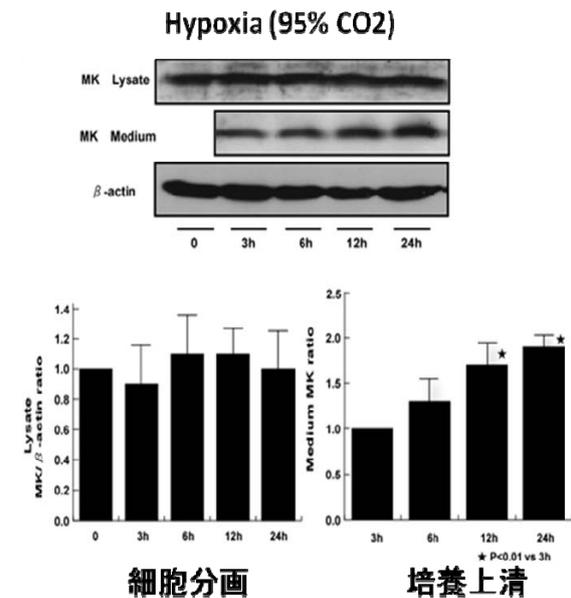
予想に反してRASの発現に野生型マウスとMKノックアウトマウスで血清、肺でACEの差は認められなかった。



NOの発現抑制した場合の血圧の差がRASを介さずどのようなメカニズムで起こっているのかが今後の課題となり、他の血圧調節因子(神経物質、エンドセリンなど)を検証している。

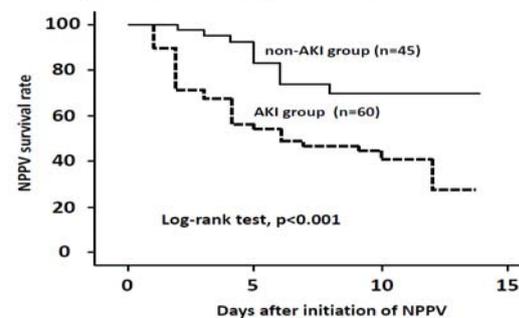
AKIモデルである両側IRIモデル・両側腎摘出モデルを野生型とMK欠損マウスで作成した。肺に好中球浸潤と浮腫上の変化が認められた。尿細管細胞を用いた低酸素暴露実験において細胞内のMK上昇は認められなかったが、上清中のMKの発現量は経時的に上昇

を認めた。今後、肺内炎症性サイトカイン及びMidkine依存性RAS活性化を測定し局在を免疫染色で確認する。



新規発症高血圧患者・ARDS発症患者において、人工呼吸器管理の日数増加するにつれ、AKIグループの方が非AKIグループよりも優位に死亡率が増加してした。今後、肺胞洗浄液中のMKとAT-II濃度、各種ケモカインのプロファイリングをする。

Kaplan-Meier Analysis of NPPV failure



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12件)

- ① Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. Tanabe K, Tamura Y, Sato W, Nakagawa T. (他8名,6番目) *Am J Physiol Renal Physiol.* in press.
- ② KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) criteria could be a useful outcome predictor of cisplatin-induced acute kidney injury. Mizuno T, Sato W, Ishikawa K, Shinjo H, Miyagawa Y, Noda Y, Imai E, Yamada K. *Oncology.* 82(6):354-9.

- 2012
- ③ Midkine and the kidney: health and diseases. Kosugi T, Sato W. *Nephrol Dial Transplant*. 27(1):16-21. 2012
- ④ Selective stimulation of VEGFR2 accelerates progressive renal disease. Sato W, Tanabe K, Kosugi T, Hudkins K, Lanasp MA, Zhang L, Campbell-Thompson M, Li Q, Long DA, Alpers CE, Nakagawa T. *Am J Pathol*. 179(1):155-66. 2011
- ⑤ Growth factor Midkine is involved in the pathogenesis of renal injury induced by protein overload containing endotoxin. Kato K, Kosugi T, Sato W, Tsuboi N, Tawada H, Matsuo S, Kadomatsu K, Maruyama S. (他 4名, 3番目) *Clin Exp Nephrol*. 15(3):346-54. 2011
- ⑥ Endothelial von Willebrand factor release due to eNOS deficiency predisposes to thrombotic microangiopathy in mouse aging kidney. Nakayama T, Sato W, Yoshimura A, Kosugi T, Kojima H, Croker BP, Nakagawa T. (他 2名, 2番目) *Am J Pathol*. 176(5):2198-208. 2010

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 湯沢由紀夫, 臓器連関障害を救済するための急性血液浄化療法の位置付け, 第 23 回日本急性血液浄化学会学術集会, パステルホテル大宮, 2012/10/27
- ② 佐藤和一, 血液透析患者におけるアディポカインと心血管死の関連, 第 57 回日本透析医学会学術集会, 札幌 2012/06/23
- ③ 10. 安田香, ナノチューブを介したオルガネラ交換-幹細胞治療の新たなメカニズム, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/01
- ④ 新城響, 集中治療患者において、急性腎障害の診断基準である KDIGO 分類と AKIN 分類の比較, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/01
- ⑤ 小島博, 成長因子ミッドカインの欠損は、半月体形成性腎炎の進展を促進する, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/01
- ⑥ 佐藤由香, 高血圧・内皮障害におけるミッドカインの役割, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012/06/01
- ⑦ 古橋和弘, 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた壊死性半月体形成腎炎への新たな治療法の確立~骨髄由来間葉系細胞ではなく塩脂肪由来幹細胞がもつ Macrophage への unique character~, 第三回腎疾患と高血圧研究会, 大阪, 2011/6/27
- ⑧ 佐藤和一, Tuener 症候群と馬蹄腎の患者に合併した抗基底膜抗体型腎炎の一例, 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会, 広島, 2010/10/9
- ⑨ 小杉智規, VEGF receptor2 特異的結合性

VEGF-A の強発現は腎障害を引き起こす, 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会, 広島, 2010/10/8

- ⑩ 勝野敬之, 腎再生療法における低血清培養脂肪組織由来間葉系細胞の有用性, 第 31 回日本炎症・再生学会, 東京, 2010/8/5

○取得状況 (計 2 件)

名称: 腎疾患のバイオマーカー及びその用途
発明者: 小杉智規、丸山彰一、佐藤和一、門松健治

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2012-128588

取得年月日: 平成 24 年 6 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 糖尿病性腎症鑑別用マーカー及びその用途

発明者: 丸山彰一、湯澤由紀夫、松尾清一、佐藤和一、尾崎武徳、秋山真一、曾我朋義、平山明由

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2012-128588

取得年月日: 平成 24 年 9 月 14 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 和一 (SATO WAICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90508920

(2) 研究分担者

湯澤 由紀夫 (YUZAWA YUKIO)

藤田保健衛生大学・医学部

研究者番号: 00191479

丸山 彰一 (MARUYAMA SHOICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10362253

(3) 連携研究者

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80204519

西山 成 (NISHIYAMA AKIRA)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 10325334