

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22592010

研究課題名(和文)急性腎傷害における心房性ナトリウム利尿ペプチドの腎保護作用メカニズムの研究

研究課題名(英文) Mechanism of protective effects of atrial natriuretic peptide on acute kidney injury

研究代表者

三高 千恵子(Mitaka, Chieko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20126254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)が、腎虚血-再灌流による急性腎傷害や造影剤腎症を軽減するかをラットモデルで検討した。ANPは、腎虚血-再灌流による代謝性アシドーシス、肺水腫、血中乳酸濃度、クレアチニン濃度、K濃度の上昇などの急性腎傷害を軽減した。さらにANPは、腎虚血-再灌流による腎や肺組織のTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA上昇や蛋白発現を軽減するとともに、血中IL-1 $\beta$ やIL-6濃度の上昇も軽減した。これは、ANPが炎症反応を抑制することにより、腎-肺の臓器間のクロストークを妨げることを示唆する。また、ANPの前投与は造影剤腎症を軽減した。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether atrial natriuretic peptide (ANP) attenuates renal ischemia-reperfusion injury (IRI)-induced acute kidney injury (AKI) or contrast-induced AKI. ANP prevented renal IRI-induced metabolic acidosis, pulmonary edema, increased plasma concentrations of lactate, creatinine and potassium in rats. In addition, ANP attenuated renal IRI-induced increases in plasma concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-6 as well as elevation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B protein expressions in kidney and lung. These findings suggest that ANP prevents kidney-lung cross talk by inhibiting inflammatory cytokines in rat renal IRI model. Furthermore, pretreatment of ANP attenuated contrast-induced AKI in rats.

研究分野：敗血症、急性腎傷害

キーワード：急性腎傷害 心房性ナトリウム利尿ペプチド サイトカイン 炎症 虚血再灌流傷害 造影剤

### 1. 研究開始当初の背景

全身性炎症反応 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) や敗血症性ショックにおいて、急性腎傷害は多臓器機能不全症候群のうち最も頻繁に起こる合併症であり、腎傷害が悪化すると患者の予後にも影響する。また造影剤による急性腎傷害も重症患者の予後に影響する。そのため、急性腎傷害に対する早期治療が患者の予後を改善する。心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide; ANP) は、ナトリウム利尿だけでなく、抗炎症作用や細胞保護作用を有していることが *in vitro* の研究で明らかになってきた。また、ANP の受容体は腎だけでなく、肺や心臓にも分布しているため、腎とそれらの臓器との関連が予想される。

### 2. 研究の目的

腎の虚血・再灌流傷害による急性腎傷害ラットモデルや、造影剤による急性腎傷害ラットモデルにおいて、ANP 投与が腎保護作用を有するだけでなく、遠隔臓器の肺や心臓への炎症の波及を阻止できるかを検討した。すなわち、ANP が腎と肺や心臓などの臓器間のクロストークを軽減できるかを検討した。

### 3. 研究の方法

対象：雄 Sprague-Dawley ラット

方法：

#### (1) 腎虚血・再灌流傷害

ANP 前投与

ラット腹腔内にペントバルビタールを注入し麻酔した。右内頸動脈にカニューレを挿入し動脈圧の測定および採血を行った。右大腿静脈にカニューレを挿入し生食を 6ml/kg/h の速度で持続投与した。3 群に分類 1) Sham-operated control (n=6)：腹部皮膚切開のみ施行、2) 生食投与急性腎傷害群 (n=10)：腎の虚血・再灌流モデル作成；腹部皮膚切開後、左側腎茎（腎静脈、腎動脈）を露出し血管クリップで 30 分クランプ、クランプ解除後 3 時間経過観察、3) ANP 投与急性腎傷害群 (n=10)：腎動静脈をクランプする 5 分前から、生食輸液から ANP に切り替え、ANP を 0.2  $\mu$ g/kg/min (生食で希釈 6ml/kg/hr) の速度で 3 時間持続投与。測定項目：心拍数、血圧、動脈血液ガス、血漿クレアチニン濃度、血漿乳酸値、血漿 K 濃度。測定時間：前、1、2、3 時間、3 時間後にペントバルビタールを大量投与後、腎、肺、心臓を摘出し、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- $\beta$ ) の mRNA 測定用に冷凍保存、蛍光染色用に冷蔵保存した。

#### (2) 腎虚血・再灌流傷害

ANP 後投与

ラット腹腔内にペントバルビタールを注入し麻酔した。右内頸動脈にカニューレを挿入し動脈圧の測定および採血を行った。右大腿静脈にカニューレを挿入し生食を 6ml/kg/h の

速度で持続投与した。3 群に分類 1) Sham-operated control (n=6)：腹部皮膚切開のみ施行、2) 生食投与急性腎傷害群 (n=10)：腎の虚血・再灌流モデル作成；腹部皮膚切開後、左側腎茎（腎静脈、腎動脈）を露出し血管クリップで 30 分クランプ、クランプ解除後 3 時間経過観察、3) ANP 投与急性腎傷害群 (n=10)：腎動静脈クランプ 5 分後に、生食輸液から ANP に切り替え、ANP を 0.2  $\mu$ g/kg/min (生食で希釈 6ml/kg/h) の速度で 3 時間持続投与。測定項目：心拍数、血圧、動脈血液ガス、血漿クレアチニン濃度、血漿乳酸値、血漿 K 濃度。測定時間：前、1、2、3 時間、3 時間後にペントバルビタールを大量投与後、腎、肺、心臓を摘出し、組織中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- $\beta$ ) および NF- $\kappa$ B の蛋白発現を評価した。

また、ラット両側腎茎を 30 分クランプし、ラクテックリンゲル液あるいは ANP (0.2  $\mu$ g/kg/min) を 3 時間投与した。血中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 濃度を測定した。

#### (3) 造影剤による急性腎傷害

ラットは indomethacin (10mg/kg)、15min 後に N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (10 mg/kg)、30min 後に造影剤 iopamidol (2.9 g Iodine/kg) を静注して作成した。Iopamidol 投与 30 min 前に生食 (2 ml/h) あるいは ANP (0.2  $\mu$ g/kg/min) を 2 時間投与した。ラットはケージに戻し、水分なしで餌は自由に 24 時間与えた。血中クレアチニン、K、乳酸濃度は、0 時間、1.5 時間、24 時間で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腎虚血・再灌流傷害

ANP 前投与

ANP は、腎虚血・再灌流傷害による代謝性アシドーシス、肺水腫、血中乳酸、クレアチニン、K 濃度上昇、腎や肺組織の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA の上昇を軽減した。

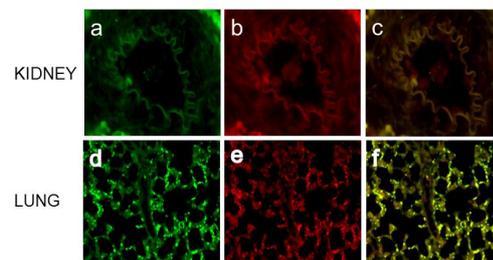


図1. 免疫蛍光染色による TNF- $\alpha$  の局在  
TNF- $\alpha$  は、腎血管内皮細胞および気管支上皮細胞に局在した。

(2) 腎虚血・再灌流傷害

ANP後投与

ANPは、腎虚血・再灌流傷害による代謝性アシドーシス、肺水腫、血中乳酸、クレアチニン、K濃度上昇を軽減するだけでなく、腎や肺組織のTNF- $\alpha$ 、IL-6、NF-kBの蛋白発現を軽減した。

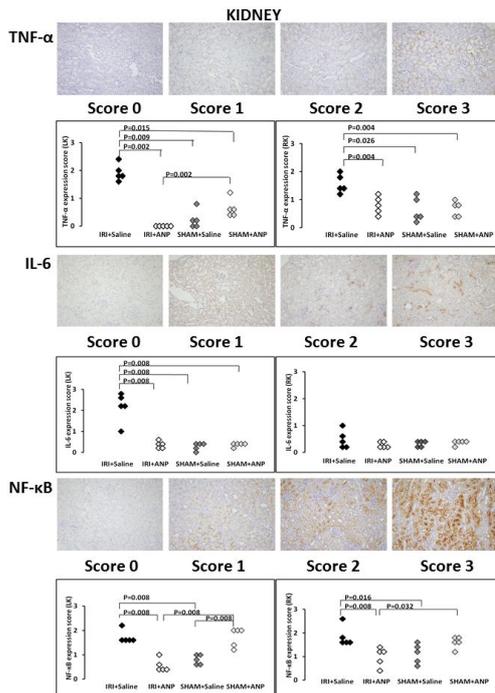


図2. 腎におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6、NF-kB蛋白発現の比較

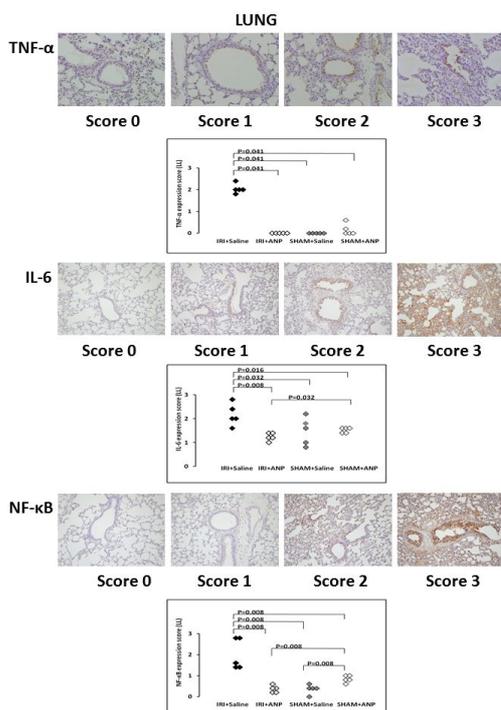


図3. 肺におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6、NF-kB蛋白発現の比較

また、両側腎虚血・再灌流傷害において、ANPは血中IL-1 $\beta$ 、IL-6濃度の上昇を軽減し、急性腎傷害を阻止した。腎虚血・再灌流による急性腎傷害では、ANPの直接作用だけでなく抗炎症作用により急性腎傷害を阻止し腎と肺の傷害を軽減できた。これは、ANPが腎-肺の臓器間のクロストークを妨げることを示唆する。

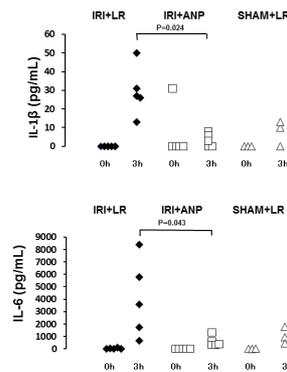


図4. 血中IL-1 $\beta$ 、IL-6濃度の変化

(3) ANPは造影剤による急性腎傷害モデルにおいて、血中クレアチニン濃度、K濃度の上昇を軽減した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Mitaka C, Hnin Si MK, Tulafu M, Qi Y, Uchida T, Abe S, Kitagawa M, Ikeda S, Eishi Y, Tomita M: Effects of atrial natriuretic peptide on inter-organ crosstalk among the kidney, lung, and heart in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Intensive Care Medicine Experimental* 2014;2:28
- 2) Tulafu M, Mitaka C, Hnin Si MK, Abe S, Kitagawa M, Ikeda S, Eishi Y, Kurata S, Tomita M: Atrial natriuretic peptide attenuates kidney-lung crosstalk in kidney injury. 査読有り、*J Surg Res* 2014;186: 217-225

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Hnin Si MK, Tulafu M, Abe S, Ikeda S, Mitaka C. ANP attenuates contrast-induced nephropathy in rats. International session. The 41th Japanese Society of Intensive Care Medicine, Kyoto, Japan, February 28, 2014
- 2) Hnin Si MK, Mitaka C, Tulafu M, Abe S, Ikeda S. Atrial natriuretic peptide attenuates metabolic acidosis and inflammation of kidney, lung and heart in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. The 33<sup>rd</sup>

- International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine,  
Brussels Belgium, March 20, 2013
- 3) Tulafu M, Hnin Si MK, Abe S, Ikeda S, Tomita M, Mitaka C. Atrial natriuretic peptide attenuates acute kidney injury and inflammation of heart and lung in rat model of renal ischemia-reperfusion injury, 第 40 回日本集中治療医学会学術集会、松本、2013 年 2 月 28 日
  - 4) Tulafu M, Mitaka C, Hnin Si MK. ANP prevents AKI in renal ischemia-reperfusion injury rat model. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会、千葉、2012 年 2 月 29 日
  - 5) Tulafu M, Mitaka C, Hnin Si MK. Atrial natriuretic peptide prevents acute kidney injury in renal ischemia-reperfusion injury rat model. The 41<sup>st</sup> Critical Care Congress of Society of Critical Care Medicine, Houston, Texas, USA, February 7, 2012

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

三高千恵子 (MITAKA Chieko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科救命救急医学・准教授

研究者番号：20126254