

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592258

研究課題名(和文)腎虚血再灌流障害に対する水素の腎保護効果とその分子生物学的機序の解明

研究課題名(英文)elucidation of the molecular mechanisms about the protective effect of hydrogen against renal ischemia-reperfusion injury

研究代表者

三好 宏(miyoshi, hirosi)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90332858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体における臓器虚血再灌流障害は、生命予後を大きく変化させる。臓器保護作用をもつ薬剤として水素の腎保護作用に注目して研究を行った。ウスターラットを使用し、麻酔施行後、気管挿管・人工呼吸を行い、両側側腹部切開にて腎臓を露出後、腎動脈・腎静脈・尿管を一塊としてクランプする。虚血時間は40分。水素の投与は、低濃度・高濃度群に分けて行った。その後、閉腹し、24時間後、48時間後に採血を行い、血中尿素窒素、クレアチンを測定した。水素投与により、血中尿素窒素、クレアチンの上昇が抑えられることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Organ ischemia-reperfusion injury in a living body, greatly changed the life prognosis. The studies were conducted with a focus on the renal protective effect of hydrogen as an agent with the organ protective effects. Use the Wistar rat, anesthesia enforcement, make tracheal intubation, artificial respiration, after exposure to the kidney on both sides side abdominal incision, to clamp en bloc renal artery, renal vein, ureter. Ischemic time is 40 minutes. Administration of hydrogen was performed by dividing the low concentration and high concentration group. After that, I closed the wound. Blood samples were collected after 24 hours, and measured blood urea nitrogen, and creatinine. By hydrogen administration, increased blood urea nitrogen, creatinine can be suppressed has been found.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：腎虚血再灌流 水素 腎臓 保護

1. 研究開始当初の背景

生体における、臓器虚血再灌流障害は、生命予後を大きく変化させる。様々な臓器における虚血再灌流障害を防ぐために、その発現機序の解明が行われているが、その中で、薬剤による虚血再灌流障害の軽減の作用機序解明が多く行われている。腎臓における虚血再灌流障害抑制機序は、種々の薬剤において検討されているが、その作用機序として様々な因子が関与していることが判明している。

2. 研究の目的

近年、臓器保護作用をもつ薬剤として、水素の保護作用が注目を集めている。腎臓の虚血再灌流障害に対する水素の影響に関する検討は、未だ行われていない。今回、水素の腎虚血再灌流障害保護作用を検討し、その作用機序に関し分子生物学的手法を用いて解明する。

周術期における腎臓に対する虚血再灌流障害は、急性腎不全や急性尿細管壊死などを引き起こす要因となり、その後の罹患率や死亡率などと深く関与するといわれている。近年、様々な臓器において、虚血再灌流障害に対する対策及び治療法がとられるようになってきた。1986年 Murry らが、短時間虚血に暴露することによりその後の臓器障害が軽減されることを心筋細胞にて報告して以来、各主要臓器において研究されてきた(虚血プレコンディショニング効果)。その後、短時間虚血の代わりに薬物による前処置により同様の効果が認められることが判明し、その分野でも主要臓器において研究が進められてきた(薬理的プレコンディショニング様効果)。腎臓においても、虚血プレコンディショニング効果の存在は確認されており、また、薬理的プレコンディショニング効果に関しては、我々の研究で、揮発性麻酔薬(イソフルレン)が腎臓の虚血再灌流障害に対し保護作用を持つことを報告してきた¹⁾。周術期において腎保護効果を認める薬物は少なく、腎不全を予防する薬物は臨床的には存在しないとされている。しかし、近年、PDE3 阻害薬などは、虚血再灌流後に投与した場合、cAMP を介して白血球活性化を抑制することにより腎保護作用を引き起こすとしていると水谷らにより報告されている²⁾。また、腎臓において、虚血プレコンディショニングの保護効果に PI3K が関与することも言われており、保護効果に関しては、様々な原因があることが報告されている。虚血再灌流障害において、種々の薬物によるプレコンディショニング様効果が期待されているなかで、近年、水素の組織保護作用が注目を集める様になった。Cong らは、急性放射線障害に対し水素療法が効果的で、新しい治療法である可能性を報告している。³⁾ また、Ohsawa らは、脳細胞における水素の抗酸化作用について報告している。⁴⁾ Hayashida らは、心筋虚血再灌流障害モデルにおいて、水素が心筋

梗塞サイズを減少させることを報告している。⁵⁾ Fukuda らは、肝臓の虚血再灌流障害モデルにおいて、水素の臓器保護作用を報告している。⁶⁾ 心臓においては、フリーラジカルの関与も示唆されている。^{7) 8) 9)} しかし、腎臓においては、腎虚血再灌流障害に対する水素の影響を調べた報告はない。そこで、本研究では、この水素による組織保護効果を虚血再灌流障害の腎保護効果と関連づけ、そのメカニズム解明を、プレコンディショニング様作用・ポストコンディショニング様作用の観点から、虚血再灌流の障害因子である酸化作用・炎症・アポトーシスを誘導するシグナル伝達系に焦点を当て、炎症やアポトーシスに与える水素の影響を検討し、腎保護作用における水素の関与を明らかにする。

腎虚血再灌流障害における水素の腎保護効果を、薬理的プレコンディショニング様作用、ポストコンディショニング様作用の面から検討し、そのメカニズムを薬理的のみならず、虚血再灌流後の障害因子である炎症やアポトーシスと水素の抗酸化作用について、これらを誘導するシグナル伝達系に焦点を当てて、そのメカニズムを分子生物学的に解明する。

腎虚血再灌流障害に対する水素の保護作用の分子生物学的機序についてはいまだ明らかにされていない。水素の薬理的プレコンディショニングに焦点を当て、その投与量による差異、投与時間による差異を確認し、分子生物学機序を解明する。結果としては、おそらく、腎臓においても水素の虚血前投与による薬理的プレコンディショニング作用は存在し、保護効果を認めるであろう。その作用機序は、他の臓器と同様に考えるのであれば、抗酸化作用の可能性と PI3K を介した作用の可能性がある。臨床的な場面では、周術期において、腎不全を予防する薬剤は存在しないとされているが、水素のプレコンディショニングによる虚血再灌流障害抑制作用が明らかにされれば、腎不全のリスクの高い症例や腹部大動脈瘤などの手術において、虚血前の予防的投与が可能になり、ポストコンディショニング様作用が明らかにされれば、腎虚血後に投与することにより腎不全への移行を予防できる臨床への応用が容易である。

1) Isoflurane protects renal function against ischemia/reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK, A&A,2005

2) Olprinone reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats through enhancement of cAMP. Shock 2005 Sep; 24(3), 281-7

3) Hydrogen therapy may be an effective and specific novel treatment for acute radiation syndrome. Med Hypotheses 2009, doi: 10.1016/j.mehy.2009.07.017

- 4) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007; 13(6): 688-94
- 5) Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(1):30-5
- 6) Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 361: 670-74
- 7) Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1353-1357
- 8) Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.* 82 (1988) 476-485
- 9) Preconditioning in cardiomyocyte protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ. Res.* 86 (2000) 541-548

3. 研究の方法

雄性ウイスターラット(300~350グラム)を、ペントバルビタール(50mg/kg)にて麻酔を行う。気管挿管を行い、人工呼吸器を使用し呼吸補助を行う。内頸静脈にカニューレーションし、薬剤投与ルート・輸液負荷ルートとして使用する。血圧・心拍数をラット用非観血式血圧計(PanLab社)にて定期的に測定する。腎臓の虚血再還流障害モデルは、麻酔を施行したラットに対し、両側側腹部切開にて腎臓を露出後、その基部を腎動脈・腎静脈・尿管を一塊にしてマイクロクリップにてクランプする。虚血時間は40分を目標に定め、虚血終了後クリップを除去し再還流を行う。虚血前・後の腎皮質血流をドップラー血流計(BLR-100V)にて測定し、再灌流の有無を確認する。水素の投与は、人工呼吸器を通して投与を行う。

グループ分け

シャム群(開腹操作のみ)

虚血群

虚血+水素群(高濃度投与群)(虚血前投与)

虚血+水素群(低濃度投与群)(虚血前投与)

虚血+水素群(高濃度投与群)(虚血後投与)

虚血+水素群(低濃度投与群)(虚血後投与)

虚血+水素群(高濃度投与群)(全経過投与)

虚血+水素群(低濃度投与群)(全経過投与)

水素の投与時間は、虚血前投与・虚血後投与では、50分間の投与とする。低濃度群は

2%、高濃度群は5%の投与とする。その後閉腹し、麻酔から覚醒させ、飼育箱の中に戻す。その後は、飲水・食事は自由に行うことができるようにする。実験経過中は、直腸体温計にて体温を測定し、37-38度になるように電熱器にて保温する。12時間・24時間・48時間後に再び、ペントバルビタールにて麻酔後、採尿・採血を行い、BUN、クレアチニン、尿中Na排泄能、尿中GSTを測定する。

続いて、水素の高容量群に絞って検討を行う。プレコンディショニング様作用(虚血前投与群)

ポストコンディショニング様作用(虚血後投与群)

グループ分け

シャム群

虚血群

虚血+水素虚血前投与群(高用量)

虚血+水素虚血前投与群(高用量)+ウ

オルトマニン群(PI3K inhibitor)

虚血+水素虚血前投与群(高用量)+

PD98059(Akt inhibitor)

虚血+水素虚血前投与群(高用量)+

L-NAME(NOS inhibitor)

虚血+水素虚血後投与群(高用量)

虚血+水素虚血後投与群(高用量)+ウ

オルトマニン群(PI3K inhibitor)

虚血+水素虚血後投与群(高用量)+

PD98059(Akt inhibitor)

虚血+水素虚血後投与群(高用量)+

L-NAME(NOS inhibitor)

12時間・24時間・48時間後に再び、ペントバルビタールにて麻酔後、採尿・採血を行い、BUN、クレアチニンを測定する。

4. 研究成果

虚血再灌流モデルとしては、コントロール群にて24時間後のBUN、クレアチニンは、120mg/dl、3.5mg/dlと上昇を認め、モデルとして問題ないことを確認した。その後、水素を低濃度群、高濃度群のそれぞれのグループにおいて虚血前投与、虚血後投与、全経過投与に群分けを行った。

虚血+水素群(高濃度投与群)(虚血前投与)では、BUN 40 ± 30.1 mg/dl、クレアチニン 1.13 ± 1.55 mg/dl

虚血+水素群(低濃度投与群)(虚血前投与)では、BUN 46 ± 32.5 mg/dl、クレアチニン 1.21 ± 1.47 mg/dl

虚血+水素群(高濃度投与群)(虚血後投与)では、BUN 43 ± 30.5 mg/dl、クレアチニン 1.10 ± 1.47 mg/dl

虚血+水素群(低濃度投与群)(虚血後投与)では、BUN 46 ± 32.1 mg/dl、クレアチニン 1.20 ± 0.98 mg/dl

虚血+水素群(高濃度投与群)(全経過投与)では、BUN 38 ± 28 , 5mg/dl、クレアチニン 1.05 ± 1.02 mg/dl

虚血+水素群(低濃度投与群)(全経過投与)

では、BUN 39 ± 28.9 mg/dl、クレアチニン 1.07 ± 1.01 mg/dl

と、水素投与群においては、すべてのグループにおいて BUN、クレアチニンの上昇が抑制された。水素が、腎臓虚血再灌流障害の抑制に効果があることがわかった。つづいて、分子生物学的機序について検討した。各種拮抗薬を投与し、その作用機序を検討したが、得られたデータがばらつきが多く、検討が必要と思われる。

()

研究者番号：

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

三好 宏 (MIYOSHI Hiroshi)

長崎大学病院・麻酔科・助教

研究者番号：90332858

(2) 研究分担者

前川 拓治 (MAEKAWA Takuji)

長崎大学病院・麻酔科・講師

研究者番号：10336167

(3) 連携研究者