

平成30年6月6日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18884

研究課題名(和文)腎虚血再灌流傷害における活性酸素種産生を介した急性尿細管壊死形成機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of kidney ischemia-reperfusion injury via reactive oxygen species production

研究代表者

今西 正樹 (IMANISHI, Masaki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00734344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎虚血再灌流傷害における活性酸素種産生を介した腎障害形成機序を解明するために、immuno-spin trapping法(IST)および内皮特異的ERK5欠損マウスを用いて検討を行った。スピントラップ剤であるDMPOの投与下によっても腎虚血再灌流による腎障害がDMPO非投与と同様に認められた。腎組織ホモジネートを用いて過酸化水素刺激によってフリーラジカルが増加する傾向をISTにより確認した。内皮特異的ERK5欠損マウスを作成した。野生型マウスでは腎虚血再灌流後の髄質におけるアンジオテンシノーゲン発現が上昇し、腎局所レニン-アンジオテンシン系活性化により酸化ストレスが亢進している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanisms of kidney ischemia-reperfusion injury (IRI) via reactive oxygen species (ROS) production, we used the immuno-spin trapping (IST) and endothelial cell-specific ERK5 deficient (ECKO) mice. Acute kidney injury was induced in the mice with a spin trapping agent, DMPO administration as well as in the mice without DMPO administration. By using IST, free radical production was found in the mouse kidney homogenate with hydrogen peroxide. We successfully created the ECKO mice. IRI induced angiotensinogen expression in the kidney medulla in the wild-type mice. ROS production, including free radical production, can be induced via local renin-angiotensin system activation in the kidney with IRI treatment.

研究分野：薬理学

キーワード：腎虚血再灌流傷害 フリーラジカル immuno-spin trapping

1. 研究開始当初の背景

腎虚血再灌流障害は腎移植や腎がんの部分切除等、临床上回避できない問題である。腎虚血再灌流により急性尿細管壊死が引き起こり、糸球体濾過量の減少に至る。本病態形成には再灌流後の ROS 産生が重要であることが知られているものの、ROS の産生源やいかに ROS が物理的あるいは細胞内シグナル伝達を介して病態形成に寄与しているのかは不明な点が多い。ニトロチロシン免疫染色などにより ROS を介して酸化された腎臓中のタンパクの局在が評価されているが、再灌流後数時間が経過している検討がほとんどであり、その範囲は糸球体付近から近位尿細管にかけて広範囲に及ぶため明確な産生源は明らかではない。基礎研究の分野では、腎虚血再灌流障害に対して各種抗酸化剤が効果を示すことを報告した論文がいくつか存在するが、临床上では効果があげられていないのが現状である。そこで本研究では、immuno-spin trapping 法 (IST) というタンパクラジカルを検出する新しい手法を用いて ROS の産生源および産生時期を特定し、ROS を介した急性尿細管壊死形成機構を詳細に検討することで、腎虚血再灌流障害による急性尿細管壊死形成に対する新規治療法開発の基盤研究を行うことを目的とする。

研究代表者は以前、日本学術振興会 先端研究拠点事業国際戦略型「生体レドックスの磁気共鳴分子イメージング拠点形成」若手派遣事業若手派遣者として米国国立環境衛生科学研究所 Laboratory of Toxicology and Pharmacology Dr. Ronald P. Mason 研究室に短期留学した経験があり、*in vitro* の実験系を用いて IST によるタンパクラジカルを検出法を習得した。IST は、活性酸素種や活性窒素種などと生体分子などが反応することによって生成するタンパクラジカルや DNA ラジカルなどを直接的に検出できる方法であり、Dr. Ronald P. Mason らによって開発された。本方法は、これまでのスピントラップ法同様、スピントラップ剤である

5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) を用いてラジカルを捕捉させ、その後その複合体 (nitron 付加体) に対する抗体、抗 DMPO nitron 付加体抗体を用いて検出を行うものである。本方法は高感度であるスピントラップ法と高特異性を有する抗原抗体反応とを組み合わせた方法であり、Dr. Ronald P. Mason らの研究グループではすでに動物実験に応用し、肝臓や骨格筋、腎臓において高脂肪食負荷によって生成したラジカルを検出に成功している (Free Radic Biol Med 2012)。

研究代表者は、本方法をマウス腎虚血再灌流障害モデルに適用しラジカル産生の特定を行うことを最初の目的とする。次に、応募者は腎虚血再灌流処置による急性尿細管壊死形成の最初の引き金は、腎血流量変化が起きる部位に最も近い、血管内皮細胞にある

と仮説を立てた。実際、腎虚血再灌流後の炎症に血管内皮細胞が関与することが知られている (Pediatr Nephrol 2015)。Extracellular signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) は、酸化ストレスやサイトカイン、成長因子などで活性化されることが知られており、活性化によって内皮機能を保つことや NF- κ B 活性を抑制することが報告されている (Biochem Soc Trans 2009, Biochem Pharmacol 2013, J Biol Chem 2006)。さらに、腎臓内 ERK5 は腎虚血再灌流障害に対して保護的に働くことが報告されている (Biochem Biophys Res Commun 2012)。以上より、内皮由来 ERK5 シグナル経路が腎虚血再灌流障害に対して保護的に働く可能性が考えられる。そこで研究代表者は内皮特異的 ERK5 欠損マウスを用いて、内皮由来 ERK5 が腎虚血再灌流障害による急性尿細管壊死の形成に関与するか検討する。さらに、内皮特異的 ERK5 欠損が腎虚血再灌流障害による ROS 産生に影響するかを IST により検討する。

これらの検討により、腎虚血再灌流障害の病態形成過程において ROS 産生と内皮由来 ERK5 との因果関係が明らかとなり、新たな腎虚血再灌流障害の病態形成メカニズムが解明される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、(1) IST を用いて腎虚血再灌流障害における ROS の産生源を特定すること、および(2) 内皮特異的 ERK5 欠損マウスを用いて血管内皮細胞由来 ERK5 が腎虚血再灌流障害による急性尿細管壊死の形成や ROS 産生に影響するか否かを検討すること、により、腎虚血再灌流障害による急性尿細管壊死の形成機構を解明し新規治療法開発の基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究期間において、以下の研究を実施した。

(1) IST による腎虚血再灌流障害における ROS 産生源の特定

腎虚血再灌流処置によって生成する ROS によるフリーラジカル産生が IST により検出可能かを検討するために予備実験を行った。マウス腎組織ホモジネートを RIPA buffer を用いて作製し、過酸化水素 (1-100 mM) と 37 °C, 30 秒にて反応させた。DMPO (20 mM) は過酸化水素添加前 60 分、30 分、10 分、3 秒、0 秒、添加後 1 秒、3 秒、30 秒、1 分、10 分、60 分のいずれかの時点で添加した。DMPO との反応後、11000xg, 4 °C, 20 分にて遠心分離し上清を得た。上清

のタンパク定量を行い、bicarbonate buffer にて希釈し、ELISA にてフリーラジカルの定量比較を行った。96 well white plate に 2、20、100 $\mu\text{g}/\text{well}$ となるように希釈したサンプルを添加し 37 にてインキュベートさせた。Wash 後ブロッキングを行い、anti-DMPO 抗体と反応させた。さらに wash した後、alkaline phosphatase 標識された 2 次抗体と反応させ wash 後に CDP star 基質と反応させた。反応によって生じる化学発光量を発光光度計にて測定し、産生フリーラジカル量を求めた。

野生型マウスに腎虚血再灌流処置を行い、腎臓および血清を採取した。虚血時間は 45 分間とし、組織採取は再灌流後 60 分後に行った。DMPO (1g/kgBW) は腎虚血再灌流処置前 60 分と再灌流前 10 分に 2 回腹腔内投与した。血清はエスアールエル株式会社以外注シクレアチニン値を測定した。形態学的変化を観察するために、腎パラフィンブロック切片を用いて HE 染色を行った。腎臓凍結ブロックを用いて、8 μm の厚みで組織切片を作製し、anti-DMPO 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。核染色には hoechst を用いた。

(2) 内皮特異的 ERK5 欠損マウスの作出

ERK5 floxed マウスと cadherin 5-Cre トランスジェニックマウスを交配させ内皮特異的 ERK5 欠損マウスを作出した。

腎臓局所レニン アンジオテンシン系活性化は ROS 産生亢進に寄与するため、腎虚血再灌流処置を行ったマウス腎臓の angiotensinogen 免疫染色を行った。

4. 研究成果

- (1) DMPO の投与下によっても腎虚血再灌流による腎障害が DMPO 非投与下同様に認められる (腎組織傷害、血清クレアチニン値上昇) ことを確認した (図 1)。また、myoglobin に過酸化水素を反応させ生成した myoglobin ラジカルが ELISA 法を介した IST により検出可能であることを確認し、腎組織ホモジネートを用いて過酸化水素刺激によってフリーラジカルが増加する傾向も IST により確認した (図 2)。

DMPO 存在下、腎虚血再灌流処置を行ったマウス腎臓を用いて IST および anti-DMPO 抗体蛍光免疫染色により、腎臓内フリーラジカル産生の局在を検討したが、未だ適当な実験条件が定まっていない。

- (2) ERK5 floxed マウスと cadherin 5-Cre トランスジェニックマウスを交配させ内皮特異的 ERK5 ヘテロ欠損マウスの作製に成功した。内皮特異的 ERK5 ホモ欠損マウスはほとんど誕生せず、胎生致死であることが考えられた。

腎虚血再灌流処置を行った野生型マウスにおいて、腎臓髄質の angiotensinogen 発現の亢進が認められた (図 3)。

以上の研究成果より、腎虚血再灌流障害において IST によるフリーラジカル産生の検出が可能であった。IST と免疫染色とを組み合わせた手法により、フリーラジカルの局在は未だ解明できていない。しかし、腎臓髄質においてアンジオテンシノーゲン発現は上昇し、腎臓局所レニン アンジオテンシン系活性化を介した酸化ストレス亢進に寄与している可能性が考えられた。

図 1. DMPO 存在下での腎虚血再灌流障害

DMPO 存在下においても腎虚血再灌流処置により近位尿細管の傷害 (楕円部分) が認められ、血清クレアチニン値の上昇が認められた。

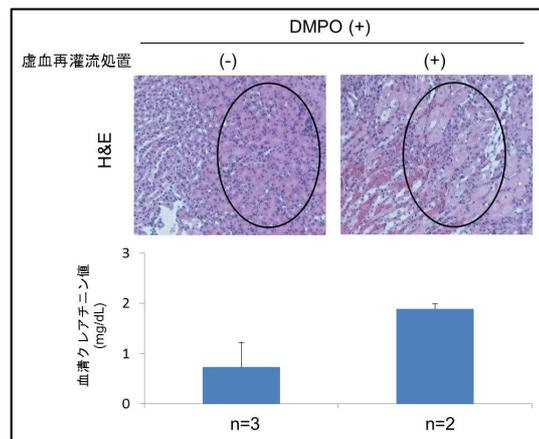


図 2. 腎組織ホモジネートにおける過酸化水素刺激によるフリーラジカル産生 (IST-ELISA)

(腎組織ホモジネートを過酸化水素 10 mM にて刺激 30 秒後に 20 mM DMPO を添加した。ELISA には 20 $\mu\text{g}/\text{well}$ 量の総タンパクを添加した。)

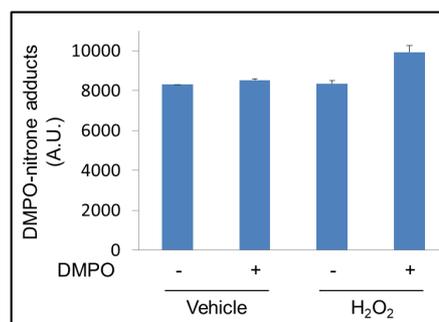
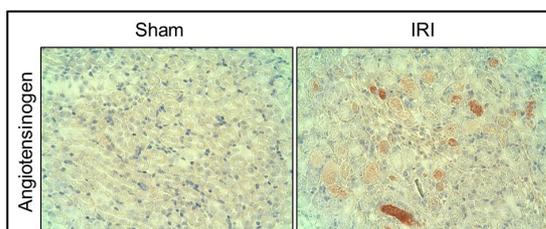


図 3. 腎虚血再灌流処置による腎髄質における angiotensinogen 発現亢進



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6件)

1. 今西正樹
血液検査値に影響を与える医薬品とその副作用
四国医学雑誌 2018: 74: 1-2.
査読有
2. 今西正樹, 富田 修平
血管リモデリング形成における低酸素誘導因子の機能解析
血管 2017: 39(4): 127-132.
査読有
3. Nishimura Yoshiro, Ueki Masaaki, Imanishi Masaki, Tomita Shuhei, Ueno Masaki, Morishita Jun, Nishiyama Takashi
Reoxygenation with 100% Oxygen Following Hypoxia in Mice Causes Apoptosis
Shock. 2017: 48: 590-594.
査読有
4. Ikeda Yasumasa, Horinouchi Yuya, Hamano Hirofumi, Hirayama Tasuku, Kishi Seiji, Izawa-Ishizawa Yuki, Imanishi Masaki, Zamami Yoshito, Takechi Kenshi, Miyamoto Licht, Ishizawa Keisuke, Aihara Ken-ichi, Nagasawa Hideko, Tsuchiya Koichiro, Tamaki Toshiaki
Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice
Scientific Reports. 2017: 7: 10621.
査読有
5. Zamami Yoshito, Imanishi Masaki, Takechi Kenshi, Ishizawa Keisuke
Pharmacological approach for drug repositioning against cardiorenal diseases
The Journal of Medical Investigation. 2017: 64: 197-201.
査読有
6. Hamano Hirofumi, Ikeda Yasumasa, Watanabe Hiroaki, Horinouchi Yuya, Izawa-Ishizawa Yuki, Imanishi Masaki, Zamami Yoshito, Takechi Kenshi,

Miyamoto Licht, Ishizawa Keisuke, Tsuchiya Koichiro, Tamaki Toshiaki
The uremic toxin indoxyl sulfate interferes with iron metabolism by regulating hepcidin in chronic kidney disease.
Nephrology Dialysis Transplantation. 2017: 33: 586-597.
査読有

[学会発表](計6件)

1. 櫻田 巧, 今西正樹, 座間味 義人, 桐野 靖, 中村 敏己, 寺岡 和彦, 石澤 啓介
腎機能がペメトレキセド治療における安全性に影響を与えるか
日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2018
2018年
2. 今西正樹
シンポジウム1 検査値を変えるくすりに注意!
第256回徳島医学会学術集会(招待講演)
2018年
3. 今西正樹, 近藤 正輝, 田中 恭平, 生藤 来希, 村井 陽一, 座間味 義人, 武智 研志, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 池田 康将, 藤野 裕道, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃, 石澤 啓介
Febuxostatの尿素合成抑制作用とは独立した血管線維化抑制機構の解明
第256回徳島医学会学術集会
2018年
4. 堀ノ内 裕也, 池田 康将, 今西正樹, 座間味 義人, 石澤 有紀, 石澤 啓介, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃
経口FXa阻害剤の腎線維化抑制効果
医療薬学フォーラム 2017 / 第25回クリニカルファーマシーシンポジウム
2017年
5. Masaki Imanishi, Kyohei Tanaka, Raiki Ikuto, Yoshito Zamami, Kenshi Takechi, Yuya Horinouchi, Yuki Ishizawa, Yasumasa Ikeda, Hiromichi Fujino, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki, Keisuke Ishizawa
The effects of febuxostat on angiotensin II-induced vascular remodeling.
27th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (国際学会)
2017年
6. 田中 恭平, 今西正樹, 近藤 正輝, 生藤 来希, 村井 陽一, 座間味 義人, 武智 研志, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 池田 康将, 藤野 裕道, 土屋 浩一郎, 玉置 俊晃, 石澤 啓介
フェブキソスタットの尿酸合成抑制剤作用とは独立した血管線維化抑制作用の検討
第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会

2017年

〔その他〕
ホームページ等

研究 | 徳島大学病院 薬剤部 ・ 徳島大学大
学院医歯薬学研究部 医学域内科系 臨床薬
理学分野

http://square.umin.ac.jp/pharm_tks-u_hosp/research/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今西 正樹 (IMANISHI, Masaki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00734344

(2)研究協力者

石澤 有紀 (ISHIZAWA, Yuki)

漆原 真樹 (URUSHIHARA, Maki)

Marilyn I. Ehrenshaft