

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19592092
研究課題名（和文） 高齢ラットの虚血再灌流性急性腎障害における知覚神経活性化の役割
研究課題名（英文） Activation of sensory neurons reduces ischemia/
reperfusion-induced acute renal injury in rats
研究代表者
野口 隆之（NOGUCHI TAKAYUKI）
大分大学・医学部・教授
研究者番号：90156183

研究成果の概要（和文）：腎虚血再灌流ラットモデルを用いて生体防御反応の CGRP (calcitonin gene-related peptide) 放出亢進が PGI₂ 産生亢進を起こすことで腎傷害を軽減する可能性を検討した。腎虚血再灌流に伴い、腎局所で単球から放出される TNF- α などにより VR-1 (vanilloid receptor-1) が活性化される。その結果、知覚神経から CGRP が放出され CGRP レセプターに結合し、PGI₂ (Prostaglandin I₂) 産生亢進を認めた。しかし VR-1 拮抗薬カプサゼピンや血管内皮上の CGRP レセプター拮抗薬 CGPR (8-37) の前処置やカプサイシン感受性知覚神経をカプサイシンで化学的に脱神経処理したラットでは、腎虚血再灌流に伴う過剰な TNF- α 産生、好中球の活性化、血管内皮障害、血管透過性亢進、腎組織血流低下、腎機能低下を更に増悪させた。しかし、CGRP の皮下投与や PGI₂ 誘導体のアイロプロストの投与により、腎虚血再灌流に伴うこれらの変化を改善した。種々の炎症反応は VR-1 を活性化し、知覚神経よりの CGRP を放出する。その結果、血管内皮細胞よりの PGI₂ 産生を亢進し、炎症反応に伴う TNF- α 産生を抑制することで種々の炎症反応を軽減する生体防御反応を有する。したがって知覚神経を活性化する薬剤ならびに食品では VR-1 の活性化に伴う CGRP 放出を介して、血管内皮細胞よりの PGI₂ を更に促進することにより、炎症に伴って生じる病態を軽減する可能性を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：PGI₁ produced by endothelial cells improves ischemia/reperfusion-induced acute renal injury by inhibiting leukocyte activation in rat. However, the underlying mechanism of increased PGI₂ production is not fully elucidated. Activation of sensory neurons increases endothelial PGI₂ production by increasing calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rat hepatic ischemia or reperfusion. We examined here whether activation of sensory neurons increases PGI₂ endothelial production, thereby reducing ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. Renal tissue level of CGRP and 6-keto-PGF₁ a stable metabolite of PGI₂, increased after renal ischemia/reperfusion, peaking at 1h after reperfusion. Overexpression of CGRP was also

noted at 1 h after reperfusion. Increases in renal tissue levels of 6-keto-PGF1 at 1h after reperfusion were significantly inhibited by pretreatment with capsazepin, CGRP(8-37), indomethacin. Pretreatment with capsazepin, CGRP (8-37), indomethacin, and denervation of primary sensory nerves significantly increased blood urea nitrogen and serum creatinine levels, renal vascular permeability, renal tissue levels of MPO activity, CINC, and TNF- α , and decreased renal tissue blood flow. However, pretreatment with CGRP significantly improved these changes. Our result suggests activation of sensory neurons in the pathologic process of ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. Such activation reduces acute renal injury attenuating inflammatory responses through enhanced endothelial PGE2 production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：麻酔

キーワード：腎虚血再灌流傷害、CGRP、PGI₂、VR-1、アイロプロスト

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞により産生される PGI₂ はラット腎臓虚血再灌流傷害を白血球抑制で改善する。しかしこの PGI₂ の産生メカニズムが十分解明されておらず、肝臓の虚血再灌流傷害で PGI₂ は CGRP 放出で産生されることが判明した。

2. 研究の目的

高齢ラットを用いた虚血再灌流性急性腎障害モデルを作成し、知覚神経活性化により放出されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) のこの病態への関与を確認する。更に CGRP 産生亢進を増強する可能性のある DIC 治療薬のアンチトロンビン III および活性化第 X 因子選択的阻害薬のダナパロイドが虚血再灌流に伴う生体防御反応としての PGI₂ 産生亢進を更に増強させ、TNF- α 産生抑制しこの急性腎障害を軽減するかを検討する。

3. 研究の方法

麻酔下に CGRP、パピロイドレセプター 1 拮抗薬カプサゼピン、CGRP 拮抗薬 CGRP(8-37)、

シクロオキシゲナーゼ拮抗薬インドメタジンの前投与を受けたものか、カプサイシン脱神経ラットで 45 分間の虚血による再灌流傷害を作成したこれに対して組織 CGRP、6-keto-PGF1、血中 MPO、CINC、TNF- α 、腎組織血流、エバンスブルーによる腎血管透過性を測定した。次に、カプサゼピン、ダナパロイドは、若年および高齢ラットでの虚血再灌流に伴う活性化凝固第 X 因子阻害による抗凝固作用ではなく、CGRP の産生を亢進する結果、血管内皮細胞からの PGI₂ の産生を亢進させる結果、TNF- α 産生亢進を抑制し、急性腎障害を軽減することを検討する。虚血再灌流を施行した若年および高齢雄性ラットを次の各群に分ける。a) 虚血再灌流群、b) 虚血再灌流 + ダナパロイド群、c) 虚血再灌流 + DX9065a (活性化凝固第 X 因子阻害薬) 群、d) 虚血再灌流 + インドメタジン群、e) 虚血再灌流 + Iloprost (PGI₂ 作動薬) 群、f) 虚血再灌流 + インドメタジン + ダナパロイド群、g) 虚血再灌流 + カプサゼピン + ダナパロイド群、h) 虚血再灌流 + CGRP8-37 + ダナパロイド群) 虚血再灌流 + 脱神経 + ダナパロイド群、各群で上記測定項目をそのピーク時点

(腎組織血流は虚血前より再灌流3時間後まで)で評価した。

4. 研究成果

生体に感染、外傷、手術やショックなどの侵襲が加わると、単球から TNF (tumor necrosis factor)- 等の炎症性サイトカインが産生され、生体防御反応が作動するが、これらのサイトカイン産生が過剰になると、好中球が活性化される。この活性化好中球は、後毛細血管細静脈において血管内皮細胞と接着し、血管内皮細胞が活性化され、血管内皮細胞障害を引き起こす。その結果、血管透過性が亢進し、微小循環障害が招来され、種々の臓器障害が生じる。

神経ペプチドは、生体の恒常性を維持する上で、神経系、内分泌系および免疫系間の協調を介するという重要な役割を担っている。その一つであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド CGRP (calcitonin gene-related peptide) は中枢神経および末梢神経に存在し、中枢神経系、消化器、呼吸器、内分泌系に関連した生物活性を有する、主にカプサイシン感受性知覚神経などの侵害受容性知覚神経に存在するアミノ酸 37 個からなる神経ペプチドである。CGRP は強力な血管拡張作用を有し、エンドトキシン投与ラットや敗血症患者での血漿中の CGRP 濃度の上昇が見られたことから、当初は敗血症性ショックに関与し、炎症反応を惹起すると考えられていた。しかし知覚神経の化学的アブレーションにより、炎症反応が増強することが報告され、さらに *in vitro* で CGRP にはマクロファージの NF- κ B (nuclear factor- κ B) 活性化抑制により、TNF- α 産生抑制作用も有することが報告された。これらより CGRP には局所の炎症反応を制御する可能性があることが見出され、さらに CGRP を含有する神経は細動脈を支配し、そこでは神経終末が血管平滑筋層に及んでいることより、CGRP は微小循環を制御する可能性がある

CGRP と PGI₂: カプサイシン感受性知覚神経は、種々の組織の細動脈周囲、上皮組織および心筋に分布している。この神経終末には、カプサイシンなどの vanilloid 化合物に対する VR (vanilloid receptor)-1 がある。VR-1 はカプサイシンなどの vanilloid 化合物の他に、TNF- α や IL (interleukin)-1 などのサイトカイン、微小循環障害による pH の低下、熱刺激、ヒスタミン、アナンダマイド、リポキシゲナーゼ産物、神経成長因子、ブラジキニンおよびアデノシン三リン酸などにより活性化される。さらに cAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate;) を介した PKA (protein

kinase A) の活性化も VR-1 の活性化に重要な役割を果たしている。VR-1 が活性化されると、神経終末から CGRP が放出される。放出された CGRP は血管内皮細胞上の CGRP receptor に作用すると、血管内皮細胞の endothelial nitric oxide synthase (eNOS) を活性化し、NO を産生し、血管拡張作用を発揮する。そして NO は COX (cyclooxygenase) -1 を活性化することで PGI₂ (prostaglandin I₂) を産生する。PGI₂ は、細動脈拡張作用により組織血流を増加する。さらに TNF- の転写を抑制することでその産生を抑制し、活性化白血球を抑制することにより、後毛細血管細静脈における血管透過性亢進を抑制する。従って炎症反応が惹起されている状態では、PGI₂ は臓器血流の減少を改善する作用を有し、臓器保護作用を有する。

CGRP と臓器保護作用: 著者らは、腎虚血再灌流ラットモデルを用いて、生体防御反応としての CGRP 放出亢進が PGI₂ 産生促進することで、腎障害を軽減する可能性を検討した。腎虚血再灌流に伴い、腎臓局所において単球から放出される TNF- α などにより、VR-1 が活性化される。その結果、知覚神経から CGRP が放出され、血管内皮細胞上の CGRP receptor に結合し、PGI₂ 産生の亢進を認めた。しかし、VR-1 や血管内皮細胞上の CGRP receptor を阻害する薬剤での前処置や、カプサイシン感受性知覚神経を化学的に脱神経処理したラットでは、腎虚血再灌流に伴う過剰な TNF- α 産生、好中球の活性化、血管内皮細胞障害、血管透過性亢進、腎組織血流低下および腎機能低下をさらに増悪させた。さらに、CGRP の皮下投与や PGI₂ 誘導体のアイロプロスト投与により、腎虚血再灌流に伴うこれらの変化を改善した。また、腎虚血再灌流ラットモデルと同様に、ラットのエンドトキシンを用いたショックモデルやラットの胃潰瘍モデルにおいても、PGI₂ 産生亢進を介し、TNF- α 産生を軽減することで臓器障害を軽減し、その機序として、これらのストレスによりカプサイシン感受性知覚神経が活性化される結果、放出される CGRP の関与が報告されている。著者らは、生理的抗凝固物質であるアンチトロンピンが血管内皮細胞よりの PGI₂ 産生を亢進し、TNF- α 産生を軽減することにより、腎虚血再灌流ラットモデルでの急性腎障害を軽減することを報告した。ここでアンチトロンピンが、カプサイシン感受性知覚神経の活性化を促進する結果、CGRP の放出をさらに増強し、血管内皮細胞よりの PGI₂ 産生を亢進する結果によることが判明した(一部未発表データ)。さらに、アンチトロンピンの重症敗血症治療効果

の作用機序としても同様の作用機序が示唆されている。また急性心不全治療薬である PDE (phosphodiesterase) 3 阻害薬の塩酸オルプリノンも腎虚血再灌流ラットモデルにおいて、cAMP 濃度を上昇させることで知覚神経の活性化を亢進し、その結果 CGRP 放出亢進を介して急性腎障害を軽減した。

以上より、種々の炎症反応は VR-1 を活性化し、知覚神経よりの CGRP を放出する。その結果、血管内皮細胞よりの PGI₂ 産生を亢進し、炎症反応に伴う TNF- α 産生を軽減することで、種々の炎症反応を軽減するという生体防御反応作用を有する。従って、知覚神経を活性化する薬剤ならびに食品には、VR-1 の活性化に伴う、CGRP を介して血管内皮細胞よりの PGI₂ 産生をさらに促進することにより、炎症に伴って生じる病態を軽減する可能性を有することが示唆される。

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 4 件)

Kudo K, Noguchi T, et al. Cepharrantine exerts anti-inflammatory effects via NF- κ B inhibition in a rat systemic inflammation. 査読有 J Surg Res 2010, Feb 4. Epub ahead of print.

Mizutani A, Kudo K, Nogucchi T, et al. Activation of sensory neurons reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats. 査読有 Anesthesiology 110: 361-369, 2009.

水谷明男、野口隆之. CGRP を介した PGI₂ 産生による炎症性応答の軽減. 査読無 生命の科学 60: 492- 493, 2009.

Hagiwara S, Noguchi T, at al. Danaparoid sodium prevents cerulein-induced acute pancreatitis in rats. 査読有 Shock 32(1): 94-99, 2009.

[学会発表] (計 1 件)

Involvement of sensory neuron to

ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats. International anesthesia research society 82th clinical and scientific congress 2008.03.31
San Francisco, CA, USA

[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

野口 隆之 (NOGUCHI TAKAYUKI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号 : 90156183

(2) 研究分担者

工藤 享祐 (KUDO KYOSUKE)
大分大学・医学部・助教
研究者番号 : 80336271

(3) 連携研究者

なし