

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791499

研究課題名（和文） マウス閉塞性水腎症に対する新規 AP-1 阻害剤による腎線維化の制御

研究課題名（英文） Control of kidney fibrosis in the mouse unilateral urethral obstruction model with the novel AP-1 inhibitor

研究代表者

前田 高宏 (MAEDA TAKAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00407090

研究成果の概要（和文）:

マウスの閉塞性水腎症モデルを作成した。水腎症作成後の時系列の変化について検証し、少なくとも腎の線維化は皮質、髄質において手術後 3 日目から生じていることを確認した。非免疫性腎炎モデルにおいて、DHMEQ 投与群ではコントロール群に比べ、間質の線維化、尿細管のアポトーシス、尿細管の増殖を抑制した。一方、DTCM (dodecylthiocarbonyl methyl) は、コントロール群に比べ有意な腎線維化の抑制効果を認めなかった。投与方法や投与経路、投与期間の更なる詳細な検討を要すると考えた。

研究成果の概要（英文）: The unilateral ureteral obstructive (UUO) model of the mouse was created. We evaluated the natural time course of renal fibrosis after UUO operation. Renal fibrosis was occurred in both renal medulla and cortex at least from the 3rd day after UUO creation. DHMEQ treatment decreased the interstitial fibrosis, tubular apoptosis and proliferation as compared with control group in the non-immune nephritis model. On the other hand, DTCM (dodecylthiocarbonyl methyl) did not achieve the significant effect against the renal fibrosis compared with the control group. I thought that the further detailed examination of the medication method, an administration route, and a dosing period was required.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：水腎症、線維化

1. 研究開始当初の背景

臨床の現場では、水腎症はしばしば泌尿器科医が遭遇する病態であるが、その程度は様々であり、原因となっている閉塞を解除することでその腎機能が回復するか否かの判断は未だに困難を極めるところである。患者の都合により即座に水腎を解除できない場合や、目の前にある水腎症が一体いつの時点から生じたものなのか判断できないことを経験する。不可逆性の腎機能障害となる時期 (point of no return) を解明し、それまでの時間に進行する腎機能障害を抑えることが可能となれば実際の臨床に非常に有用であると考えられる。

一方、申請者は腎炎の腎機能廃絶に至る過程では腎の線維化がその病態の主体であり治療法を開発する上で炎症のメカニズムを制御するだけでなく、線維化をいかに抑制するかが肝心であると考えている。当教室では、免疫学的系球体腎炎モデルのみならず、非免疫学的な閉塞性水腎症モデルにおける腎障害において、Angiotensin (A) が線維化を司るサイトカイン TGF- β を誘導し腎実質を線維化に至らしめることを報告してきた (Miyajima et al. *Kidney Int* 58; 2301-13, 2001)。また、当教室ではラット水腎症モデルにおいて A-TGF- β 経路を抑制すべく、ACE 阻害剤や A₁ 型受容体 (AT₁R) 阻害剤の有用性を確認し、直接 TGF- β の産生を抑制する COX-2 阻害剤 (Miyajima et al. *J Urol* 166; 1124-1129, 2001) やトラニラスト (Miyajima et al. *J Urol* 165; 1714-1718, 2001) の効果を報告してきた。また、Angiotensinogen を遺伝子工学的にノックアウトしたトランスジェニックマウスにおける水腎症閉塞腎においては Angiotensin は腎線維化に重要な役割を果たし、Angiotensin を標的とすることが治療で必要であることを示してきた (Uchida et al. *Urology*, e-publication, 2009)。

他方で、近年、サイトカインやメディエーターを分子標的とした治療の開発が、炎症性疾患や癌を対象に幅広く進められている。当教室でも本大学理工学部梅澤研究室と連携し、細胞内転写因子 NF- κ B を抑制しうる NF- κ B 阻害剤である DHMEQ が前立腺癌 (Kikuchi et al. *Cancer Res* 63; 107-110, 2003)、腎癌 (Sato et al. *Int J Oncol* 28; 841-846, 2006)、膀胱癌 (Horiguchi et al. *Expert Rev Anticancer Ther* 3; 793-798, 2003) の各種癌腫に対して抗腫瘍効果を有するだけでなく、免疫誘導型腎炎 (Kosaka et al. *Nephron Exp Nephrol* 110; e17-e24, 2008) や非免疫誘導型腎炎 (Miyajima et al. *J Urol* 169; 1559-1563, 2003) などの炎症性疾患に対しても抗炎症効果を有することを示して

きた。

本検討では、新規に開発された薬剤で NF- κ B 阻害剤である 9-methylstreptimidone よりデザインされた誘導体である DTCM-glutarimide による抗炎症効果について研究を行うこととした。

2. 研究の目的

水腎症は、尿路結石症、尿管狭窄症、膀胱腫瘍、尿管腫瘍などの尿路の通過障害によって惹起される病態であり、我々、尿路の外科的処置を行う泌尿器科医が日常診療でしばしば遭遇する病態である。長期間の、尿路の通過障害は、腎臓の不可逆的な萎縮、あるいは腎臓機能の低下をもたらす。一方で、その原因となっている尿路の通過障害の程度と期間は様々であり、水腎症を発見した時に、その原因を解除することが、その後の腎臓機能の回復につながるかどうかを事前に判断することは難しい。一方、患者の立場では、両側性でない“水腎症”の病態だけではさしたる臨床症状を呈さないこともあり、緊急的に水腎症を解除できないもしくはしないこともしばしば経験する。本研究では、どのくらいの期間、水腎症が持続すると、不可逆的な腎臓機能の障害を起こすのかを検討することを目的とした。

不可逆性の腎機能障害となる時期を解明できれば、不可逆的变化が起こる前までの時間に水腎症を解除する、もしくは、それまでの時間に進行する腎機能障害を抑えることが可能となれば実際の臨床に非常に有用であると考えた。

本検討では、マウスの片側水腎症モデルを作成し、その線維化が起きる時系列変化を検証し、更に、新規に合成された、DHMEQ と DTCM-glutarimide を、マウスの水腎症閉塞腎モデルに用い抗炎症効果の研究を行う。どの時点で腎の線維化を止めることが腎機能の保持につながるか検討することとした。

3. 研究の方法

(1) マウス水腎症モデルの確立

BALBC マウスをペントバルビタール 6.5mg/ml の腹腔内投与下に眠らせ、固定台に仰臥位で固定する。開腹の上、片側尿管を 4-0silk 糸にて結紮して人為的に片側の水腎症を作成する。手術後に麻酔より覚醒させる。手術後、3日目、5日目、7日目、10日目、14日目、28日目、42日目と日数を変えに両側の腎臓 (健康腎と閉塞腎) を摘出し、腎臓の形態学的観察を行うとともにホルマリン固定ならびに 80 deep freezer 用に分けて保存した。

(2) マウス水腎症における変化の検討

マウス水腎症において、水腎症の発症の過程

どのように線維化をおこしているのか摘出した腎臓を健常腎、閉塞腎それぞれの形態的变化を肉眼的に観察し、摘出腎の重量を測定する。間質の線維化は Masson's Trichrome 染色および collagen、fibronectin を免疫組織学的ならびに mRNA の測定で検討する。

(3) DHMEQ、DTCM の水腎症に与える影響に関する検討

(1) と同様の手法にてマウス水腎症モデルを作成し、水腎症作成翌日から連日、2-8 mg/Kg の DHMEQ および 10-40mg/kg の DTCM の薬剤投与を行い、その後、7 日目に両側の腎臓(健常腎と閉塞腎)を摘出し、腎臓の形態学的観察を行と各種サイトカインの変化について免疫組織学的に検討を行う。摘出した腎臓の健常腎、閉塞腎それぞれの形態的变化を肉眼的に観察し、摘出腎の重量を測定し、間質の線維化は Masson's Trichrome 染色および collagen、fibronectin を免疫組織学的ならびに mRNA の測定で検討する。尿細管アポトーシスを TUNEL 法を用いて検討する。TGF 濃度を ELISA 法で、Nitric Oxide Synthetase 活性を citrulline assay で検討する。NF- κ B を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で、健常腎および閉塞腎それぞれにおいて比較検討する。

4. 研究成果

(1) マウス水腎症モデルの確立

尿管結紮手術後、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、14 日目、28 日目、42 日目と日数を変え、摘出した両側腎臓(結紮側腎と非結紮側腎)を摘出し、水腎症モデルが完成されているか確認した。全症例において、



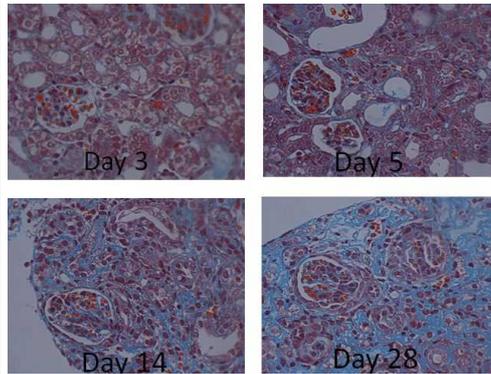
(Fig-1) 尿管の結紮尿管結紮側は、水腎症を呈しておりモデル作成の再現性を確認した。

(Fig-2) 健常腎(左)と閉塞腎(右)

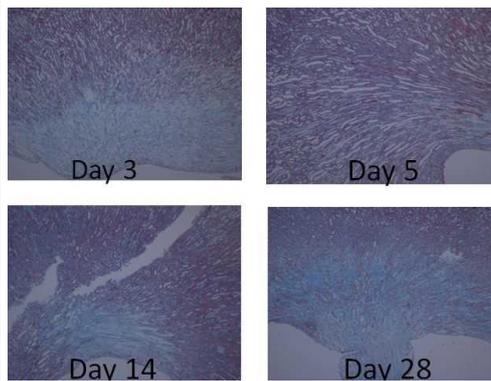


(2) マウス水腎症の時系列変化

マウスの片側尿管結紮による水腎症モデルでは、Masson's Trichrome により、結紮手術後 5 日目より腎の線維化が有意に認められた。この傾向は、腎皮質および髓質ともに認められ、結紮手術後 28 日目にはほとんどの組織が線維化組織に置換されていることが確認された。結紮手術後、7 日目には管腔構造と管腔構造との間の距離の開大および尿細管上皮の扁平化を認めた。



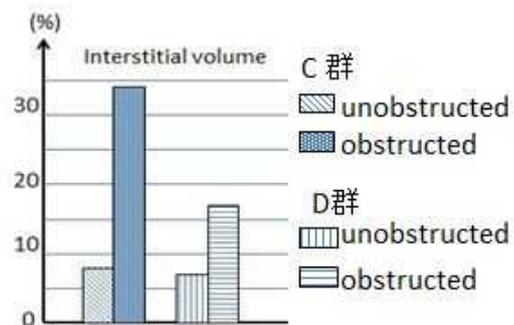
(Fig-3) 水腎症の時系列変化(腎皮質)



(Fig-4) 水腎症の時系列変化(腎髓質)

(3) DHMEQ、DTCM のマウス水腎症モデルに及ぼす影響

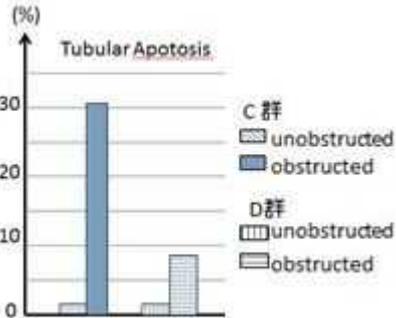
上記(2)の予備実験の結果から、水腎症作成翌日から、DHMEQ および、DTCM の投与を行い、結紮手術後 7 日目にマウスを安楽死させて両側の腎臓を摘出し、健常側腎と結紮側腎の腎の線維化の程度を Masson's Trichrome により評価した。



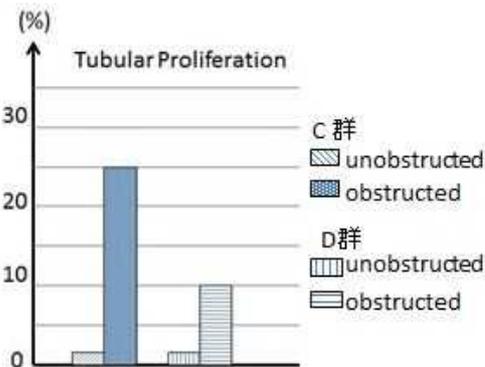
(Fig-5) 腎間質面積の評価

DHMEQ 投与群 (D 群) 閉塞腎では、コントロール群 (C 群) 閉塞腎に比べて、間質の線維化の軽減、それに伴う管腔構造と管腔構造との間の距離の開大の改善を認めた。結果として、D 群閉塞腎では C 群閉塞腎に比べて明らかに間質面積の低下を認めた (Fig 5)。以上より、D 群閉塞腎では腎の線維化の程度抑制効果を認めた。

閉塞腎炎症モデルでは、管腔上皮の細胞の障害が惹起され、結果として管腔のアポトーシスならびに増殖が誘導されるが、D 群閉塞腎では C 群閉塞腎に比べ、有意に軽減されていることが確認できた (Fig 6,7)。



(Fig 6) Tubular apoptosis の評価



(Fig 7) Tubular proliferation の評価

(1)と同様に水腎症モデルを作成し、水腎症作成翌日から 7 日間連続で、DTCM30mg/kg を経腹腔的に投与を行いその効果・有用性につき (2)と同様の方法で検討を行った。Masson 染色における評価では、(2)の DTCM 薬剤非投与群と (3)の薬剤投与群では線維化の程度には統計学的な有意差を認めなかった。

投与日および投与量を変えて、同様に水腎症作成過程での線維化の評価を検討したが、薬剤非投与群との間で統計学的な有意差を認めなかった。

現段階までの検討では、DTCM を用いて腎臓の水腎症を形成する過程における線維化の進行に対する有意な抑制効果を認められなかった。今後は、投与量や方法、投与期間、ま

たは投与開始日の設定を変えて本薬剤が線維化の抑制に有意な効果を有するのか検討する必要がある。また、その他の AP-1 阻害剤を用いた検討においてはどうか、もしくは、NF- κ B 阻害剤など他の薬剤と併用した場合の併用効果の検討などを行っていきたいと考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

前田 高宏、宮嶋 哲、小坂 威雄、長谷川 政徳、篠田 和伸、香野 日高、水野 隆一、菊地 栄次、中川 健、大家 基嗣. 新規 NF- κ B 阻害剤によるラット免疫性/非免疫性腎炎に対する抗炎症効果. 第 54 回日本腎臓学会総会. 2011 年 6 月 16 日. 横浜

Takahiro Maeda, Akira Miyajima, Takeo Kosaka, Eiji Kikuchi, Mototsugu Oya. THE NOVEL NF- κ B ACTIVATION INHIBITOR DEHYDROXYMETHYL-EPOXYQUINOMICIN SUPPRESSES NON-IMMUNE AND IMMUNE INFLAMMATORY KIDNEY DISEASE in RATS. The 107th annual meeting of American Urological Association. 2011/5/21. Washington.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 高宏 (MAEDA TAKAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 00407090