

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791758

研究課題名（和文） ドキシサイクリン：腎虚血再還流障害の新治療戦略

研究課題名（英文） Doxycycline: new therapy for renal ischemia reperfusion injury

研究代表者

荒木 元朗（ARAKI MOTOO）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：90467746

研究成果の概要（和文）：マウス腎虚血再還流モデルを用いてドキシサイクリンによる腎保護効果を確認した。対照群に比べドキシサイクリン投与群では腎虚血後24時間の血清クレアチニンが低下していた。組織学的にもドキシサイクリン投与群で尿細管腔の拡張の程度が軽減しており腎障害の軽減が確認された。このメカニズムとしてはドキシサイクリンによる matrix metalloproteinases (MMPs) 阻害による腎組織内好中球浸潤の減少傾向が寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The protective effect of doxycycline was examined in murine renal ischemia reperfusion injury (IRI) model. The administration of doxycycline reduce renal IRI confirmed by reduced serum creatinine level and damage in histopathology. The mechanism was due to reduced neutrophil infiltration in renal tissue by matrix metalloproteinases (MMPs) inhibition by doxycycline.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：泌尿器科

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：腎虚血再還流障害、ドキシサイクリン、細胞外マトリックス (MMP)、MMP 阻害薬、腎移植

## 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全の治療法として、透析療法と腎移植の2種類がある。しかしながら日本では透析患者約30万人に対して2010年の一年間で合計1484例（生体腎移植1276例、死体腎移植（心停止146例、脳死62例）の腎移植しか行われていない。よって少ない腎提供を最大限に生かす工夫が必要である。本研究

申請者の研究課題である虚血再還流障害は腎移植の成績に大きな影響を及ぼす。虚血再還流障害は移植腎機能遅延、急性/慢性拒絶反応の発現増加に関与する (C. D. Bryan et al. *Transplantation* 2001, D. Dragun, et al. *Kidney Int* 60 2001)。血液の再還流による組織の再酸素化は組織の生存には不可欠だが、再還流によって反応性に産生

される酸素派生物質が重大な組織障害を引き起こす(MA Daemen et al. *J Clin Invest* 1999, S Nogae et al. *J Am Soc Nephrol* 1998)。再還流によって虚血に陥っていた血管内皮細胞はTNF- $\alpha$ やIL-1といったサイトカインを数分間の間に産生し、引き続き好中球やマクロファージの遊走因子であるIL-8, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CCL2/MCP-1を産生する。こうして浸潤した好中球やマクロファージは細胞障害性サイトカインや酸素派生物質を産生し組織の障害を引き起こす。本研究申請者は腎移植時の虚血時間と好中球走化因子であるIL-8が相関関係にあることを明らかにした (M. Araki et al. *Transplantation*, **81**: 783, 2006)。動物モデルにおいてこの好中球浸潤を阻害することによって組織障害が緩和されることが知られており (M. Araki et al., *Current Opinion in Organ transplantation*, Jun; 9 (2), 2004, M Miura et al. *Am J Pathol* 2001, D. Cugini et al. *Kidney Int* 2005)、本研究申請者もマウスを使った実験でこれを証明した。しかしながらこれらの動物モデルでは好中球浸潤を阻害するために好中球を消失させてしまう抗好中球抗体を用いる必要があり、人間に用いた場合重大な感染症を引き起こす可能性があり実際の臨床現場には応用されていない。よって本研究申請者は臨床現場で使用可能な好中球浸潤抑制物質の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

研究申請者は、白血球浸潤抑制物質としてドキシサイクリンに着目した。

白血球が組織内に浸潤するためにはコラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解する必要がある。これらの細胞外マトリックス

を分解する酵素は matrix metalloproteinases (MMPs) と呼ばれ、弾性繊維を分解するMMP-2, 7, 9やコラーゲンを分解するMMP-1, 2, 8, 9, 13, 14などに細分類される。ドキシサイクリンはこれらのMMPsを広く抑制する作用があり動物実験で広く用いられている。すでにラットの四肢の虚血再還流障害においてドキシサイクリン投与によって組織障害が緩和されたという報告がある (D. Roach et al., *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23, March 2002)。しかし腎臓の虚血再還流障害におけるドキシサイクリンの効果は明らかにされていない。

そこで本研究では、ドキシサイクリンのMMP阻害作用により、腎臓の虚血再還流障害モデルにおいて好中球を含む白血球の組織浸潤が阻害され組織障害が軽減される可能性を検討した。

ドキシサイクリンは本来抗生物質として用いられる。すでに様々な動物実験でMMP活性を抑制するために用いられており、安全性において問題ない。またドキシサイクリンはすでに臨床現場で用いられているものであり、入手経路に問題はない。

安全性の問題をすでにクリアしているため、研究申請者の仮説が正しければ、臨床応用への障壁が極めて少なく、臨床上腎虚血再還流障害の新しい治療として発展する可能性が高い。

臨床応用された場合の利点は次のとおりである。

(1) 虚血再還流障害によって術後移植腎が機能せず、数カ月透析が必要、また最悪の場合全く機能しない(primary nonfunction) こともある。ドキシサイクリンで虚血再還

流障害を抑制することができれば透析にかかる莫大な費用（月額40-50万円）の節約となる。

(2) 抗生物質であるドキシサイクリンを使用することにより、移植前後の免疫抑制状態にある患者にとって、投与による不利益はなく、むしろ感染コントロールという観点からも患者の利益となる。

(3) 免疫抑制剤の進歩により急性拒絶反応が抑えられ、腎移植の成績は飛躍的に向上した。しかし慢性拒絶反応が大きな問題となっており、これに対する治療法はない。今回研究申請者が着目する虚血再還流障害は、腎移植の際の最も初期の抗原提示の現場である。ここでレシピエントは初めてドナーの大量の抗原にさらされる。よってこの段階での炎症を抑えることは、腎移植の現場においては非自己の抗原暴露を抑制することを意味する。暴露される抗原の減少は急性/慢性拒絶反応の発現を抑制、すなわち移植腎の生着延長へとつながる (C. D. Bryan et al. *Transplantation* 2001, D. Dragun, et al. *Kidney Int* 60 2001)。しかしながら現在腎移植の臨床において腎臓の虚血再還流障害を軽減する手段はステロイド投与のみである。ステロイドは50年前から使われており、この間虚血再還流障害について臨床上まったく進歩がない。ステロイドを補う、もしくはそれを超える効果をもつ薬剤の検討は、新しい移植プロトコールにつながる。

(4) またMMPsは心筋梗塞、大動脈解離の発症にも関与しており、マウスモデルにおいて

ドキシサイクリン投与によってこれらの発症を軽減できたという報告がある (R. Pyo et al., *The Journal of Clinical Investigation*, 105 June 2000)。MMP阻害のためある程度長期間のドキシサイクリン投与が必要となった場合も心筋梗塞、大動脈解離の発症軽減といった副次的な利益が生まれる可能性がある。

### 3. 研究の方法

すでに確立されたマウス腎虚血再還流モデルを用いた。8-14週のC57BL/6雄マウスを麻酔下に開腹し、腎動静脈を一括クランプする。電灯・heatpadを用いてマウスの腹腔内温度を32°Cに保ち、35分後に腎動静脈を開放 (unclamp) する。ドキシサイクリン投与群は術前3日目から12時間毎にドキシサイクリン 200mg/kg/dayを経口投与した。対照群は同様に蒸留水を経口投与した。各群を麻酔下に開腹し体温を32°Cに保ち、両側腎基部を35分間クランプし再灌流させた。術前、術後24、48時間後に採血と両腎を摘出した。各時点での血清Cr値測定、HE染色での腎組織傷害の程度、ザイモグラフィによるMMP9活性の比較した。

### 4. 研究成果

ドキシサイクリン投与群では腎虚血後 24時間の血清クレアチニン上昇抑制がみられた。組織学的にも HE 染色でドキシサイクリン投与群において組織傷害の抑制が優位にみられた。またドキシサイクリン投与群で組織中の好中球浸潤の減少傾向がみられた。またドキシサイクリン投与群でザイモグラフィにて MMP9 活性の抑制を認めた。またドキシサイクリン投与群で組織中の好中球浸潤の減少傾向がみられ

た。ドキシサイクリン投与による MMP9 阻害、好中球浸潤抑制作用により虚血再灌流時の腎機能障害、腎組織傷害が抑制されることが示唆された。

#### 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、すべて査読あり)

1. Watanabe T, Inoue M, Ishii A, Yamato T, Yamamoto M, Sasaki K, Kobayashi Y, Araki M, Uehara S, Saika T, Kumon H: Laparoscopic-assisted tension-free vaginal mesh: an innovative approach to placing synthetic mesh: transvaginally for surgical correction of pelvic organ prolapse. *Acta Med Okayama* (2012) 66: 23-29.
2. Kishimoto R, Saika T, Bekku K, Nose H, Abarzua F, Kobayashi Y, Araki M, Yanai H, Nasu Y, Kumon H: The clinical impact of pathological review on selection the treatment modality for localized prostate cancer in candidates for brachytherapy monotherapy. *World J Urol* (2012) 30: 375-378.
3. Araki M, Uehara S, Sasaki K, Monden K, Tsugawa M, Watanabe T, Monga M, Nasu Y, Kumon H: Ureteroscopic management of chronic unilateral hematuria: a single-center experience over 22 years. *PLoS One* (2012) 7: e36729.
4. Araki M, Saika T, Araki D, Kobayashi

Y, Uehara S, Watanabe T, Yamada K, Nasu Y, Kumon H: Laparoscopic management of complicated urachal remnants in adults. *World J Urol* (2012) 30: 647-650.

5. Watanabe T, Inoue M, Sasaki K, Araki M, Uehara S, Monden K, Saika T, Nasu Y, Kumon H, Chancellor MB: Nerve growth factor level in the prostatic fluid of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome is correlated with symptom severity and response to treatment. *BJU Int* (2011) 108: 248-251.
6. Kumon H, Matsumoto A, Uehara S, Abarzua F, Araki M, Tsutsui K, Tomochika K: Detection and isolation of nanobacteria-like particles from urinary stones: long-withheld data. *Int J Urol* (2011) 18: 458-465.

[学会発表] (計 7 件)

1. 有吉勇一, 荒木元朗, 岸本 涼, 和田耕一郎, 小林泰之, 江原 伸, 上原慎也, 渡辺豊彦, 那須保友, 公文裕巳 血液凝固第 8 因子の活性亢進を伴うレシピエントに施行した生体腎移植の 1 例 第 63 回日本泌尿器科学会西日本総会 20111110 久留米市
2. 荒木元朗 基調講演 II 腎移植の現状と進歩 第 61 回岡山腎疾患懇話会 20111008 岡山市
3. 荒木元朗, 和田耕一郎, 有吉勇一, 上松克利, 河内啓一郎, 小武家誠, 上原慎也, 渡辺豊彦, 雑賀隆史, 那須保友, 公文裕巳 岡山大学泌尿器科における

腎移植初期症例の検討 第 47 回日本  
移植学会総会 20111004 仙台市

4. 荒木元朗, 上松克利, 河内啓一郎, 小  
武家誠, 上原慎也, 渡辺豊彦, 雑賀隆  
史, 那須保友, 公文裕巳 拡張型心筋  
症を伴った生体腎移植の 1 例 第 27  
回腎移植・血管外科研究会 20110624  
札幌市
5. Araki M., Uehara S., Monden  
K., Watanabe T., Saika T., Nasu  
Y., Kumon H. “Ureteroscopic  
evaluation and treatment of chronic  
unilateral hematuria: A 24 year  
experience” 106th American  
Urological Association 2011 Annual  
Meeting 20110514 Washington,  
DC, USA
6. 河内啓一郎, 上松克利, 荒木元朗, 石  
井和史, 上原慎也, 渡辺豊彦, 雑賀隆  
史, 那須保友, 公文裕巳, 二宮善文,  
廣畑 聡, 三好 亨 腎虚血再灌流傷  
害におけるドキシサイクリンによる腎  
障害抑制効果の検討 第 99 回日本泌尿  
器科学会総会 20110421 名古屋市
7. 荒木元朗, 上松克利, 河内啓一郎, 小  
武家誠, 上原慎也, 渡辺豊彦, 雑賀隆  
史, 那須保友, 公文裕巳, 齋藤和英,  
高橋公太 岡山大学泌尿器科における  
腎移植初期症例の検討 第 99 回日本泌  
尿器科学会総会 20110421 名古屋  
市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 元朗 (ARAKI MOTOO)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号 : 90467746

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

廣畑 聡 (HIROHATA SATOSHI)

岡山大学・国際センター・准教授

研究者番号 90332791

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授

研究者番号 70126241