

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11067

研究課題名(和文) 麻酔薬によるKv1.3チャネルを介した免疫抑制作用の機序解明と予後改善戦略

研究課題名(英文) Clarifying the mechanism of the immunosuppression by anesthetics via Kv 1.3 channel

研究代表者

外山 裕章 (Toyama, Hiroaki)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00375007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの尿管閉塞後3週の間、尿管閉塞腎と正常腎を組織学的に比較した。尿管の閉塞期間が長くなる程、腎臓間質にTリンパ球とマクロファージの増加を認めた。しかし、Kv1.3チャネル選択的阻害薬マルガトキシンを連日200nM/mL腹腔内投与したラットは、腎皮質間質の線維化マーカーの発現減少を認め、マルガトキシンが腎皮質間質におけるリンパ球浸潤と間質線維化を抑制することが示された。組織像ではマルガトキシン治療ラットで顕著な白血球数の減少と白血球増殖の抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットの尿管閉塞後、尿管閉塞腎と正常腎を組織学的に比較した。尿管の閉塞期間が長い程、腎臓間質にTリンパ球とマクロファージの増加を認めた。しかし、Kv1.3チャネル選択的阻害薬マルガトキシンを連日200nM/mL腹腔内投与したラットは、腎皮質間質の線維化マーカーの発現減少を認め、マルガトキシンが腎皮質間質におけるリンパ球浸潤と間質線維化を抑制することが示された。組織像ではマルガトキシン治療ラットで顕著な白血球数減少と白血球増殖抑制も認めた。リンパ球膜表面Kv1.3チャネルへの標的治療により腎間質線維化を抑制できると考えられ、慢性腎不全進行を抑制する今後の治療薬開発への一助となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We compared the normal kidney tissues and kidney tissues of chronic nephritis by the histologically and immunohistologically for 3 weeks after the unilateral ureteral obstruction in rats. The longer ureteral obstruction, the more T lymphocytes and macrophages were found at the interstitium of the renal cortex. However, In the rats that were administered 200nM/mL of margatoxin intraperitoneally, less T lymphocytes and macrophages and the decrease expression of fibrosis markers were found at the interstitium of the renal cortex, which indicated that margatoxin could inhibit the infiltration of lymphocytes and fibrosis in interstitium of the renal cortex. Additionally, by the histopathological images of the renal cortex in the rat administered with margatoxin, decrease of white blood cells and inhibition of white blood cell proliferation were also indicated.

研究分野：麻酔科学

キーワード：尿管閉塞 慢性腎不全 Kv1.3チャネル 間質性腎炎 免疫抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、手術患者の腎機能低下・腎不全患者の腎機能が周術期にさらに悪化した場合、生命予後が確実に悪化することが知られている。

リンパ球の細胞膜表面に多く発現する K⁺チャネル(Kv1.3 チャネル: 遅延整流性カリウムチャネル)は Ca²⁺の細胞内への流入を介して、細胞性免疫を賦活化やリンパ球 Kv1.3 チャネルの過剰発現が胸腺由来リンパ球の機能亢進や巨核球の血小板産生促進に寄与することが知られている。末期腎不全に伴って進行する腎線維化にも大きく関与する可能性がある。また、一部の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)やカルシウム拮抗薬がリンパ球 Kv1.3 チャネルを阻害することにより免疫抑制作用を示すことも明らかされており、麻酔科領域の研究では、揮発性麻酔薬(セボフルラン、イソフルランなど)は免疫抑制作用が示されている。

腎不全進行にリンパ球 Kv1.3 チャネル賦活化やリンパ球・マクロファージ浸潤が強く関与していることを明らかにし、また、周術期に使用する麻酔関連薬剤のリンパ球細胞膜への作用を検討することにより、麻酔関連薬剤と免疫抑制作用や腎保護作用との関係を明らかにする。

2. 研究の目的

腎不全の進行と腎間質における線維化を免疫組織学的手法を用いて評価し、リンパ球細胞膜表面の Kv1.3 チャネルの賦活化がリンパ球・マクロファージ浸潤の原因であることを明らかにする。さらに、麻酔薬(揮発性麻酔薬と麻酔関連薬剤)が Kv1.3 チャネルに対してどの程度の抑制作用を有するかを、単離したマウス胸腺リンパ球に対してパッチクランプ法を用いて解析し、麻酔薬の免疫抑制作用を定量化する。その後、麻酔薬を腎虚血再灌流モデルに使用し、免疫抑制作用により生じる腎保護効果を免疫組織学的手法にて評価する。これらから周術期の腎不全発症に対する新規予防法と治療法を模索する。

3. 研究の方法

片側尿管閉塞(Unilateral Ureteral obstruction: UUO) モデルは糸球体病変を伴わずに腎間質の線維化を生じ、腎血流と関係なく腎不全が進行するモデルである。腎臓局所においてリンパ球やマクロファージなどの炎症性細胞が多く浸潤することが知られている。

(1) UUO モデルラットを用いて、腎不全の進行と腎間質の線維化におけるリンパ球 Kv1.3 チャネルの関与を明らかにするため、免疫組織学的手法やウェスタンブロット法を用いて、Kv1.3 チャネル蛋白の発現、リンパ球・マクロファージの浸潤(CD3、ED-1 発現による)、細胞増殖(Ki-67 発現による)、線維化の程度(Collagen-、-SMA 発現による)を比較する。病態形成過程(腎臓への炎症性細胞の浸潤や線維化)におけるリンパ球 Kv1.3 の役割を明らかにできる。

(2) 単離したマウス胸腺リンパ球に対してセボフルラン、デスフルラン、イソフルランなど頻用されている揮発性麻酔薬や揮発性麻酔薬や、その他の麻酔関連薬剤の投与により Kv1.3 チャネル電流が抑制されるかを確認する。

(3) 片側腎動静脈閉塞による腎虚血再灌流モデルラットのモデル作成時に麻酔関連薬剤を投与し、腎臓における炎症細胞浸潤や線維化に対して麻酔薬が抑制効果(腎保護効果)を生じるかを検討する。腎組織の免疫組織学的手法やウェスタンブロット法を用いて比較し、麻酔薬が有する本病態に対する腎保護効果についても明らかにする。

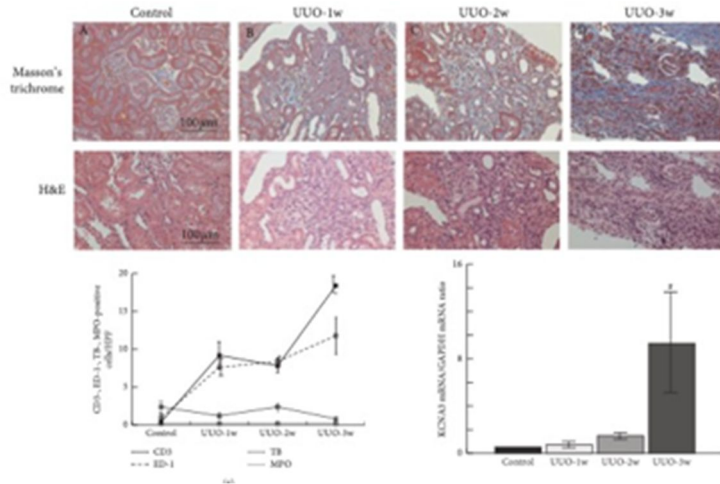
麻酔関連薬剤の免疫抑制作用と腎保護作用を評価し、周術期患者の腎不全発症に対する予防法を確立する。

4. 研究成果

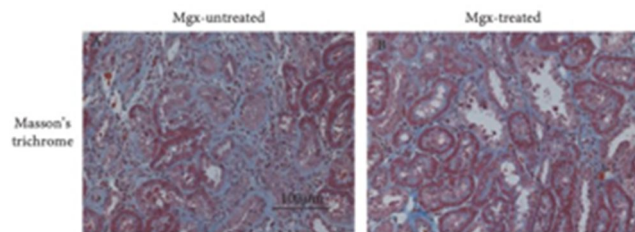
(1) 片側尿管閉塞(Unilateral Ureteral obstruction: UUO)モデルは腎臓の糸球体に病変を発生させずに腎臓の間質の線維化を発生させる。ラットの尿管閉塞後 1-3 週の各週において対側の UUO を行っていない正常腎をコントロールとして組織学的な比較検討を行った。

尿管の閉塞期間が長くなると腎臓間質における T リンパ球とマクロファージの増加を認めた。

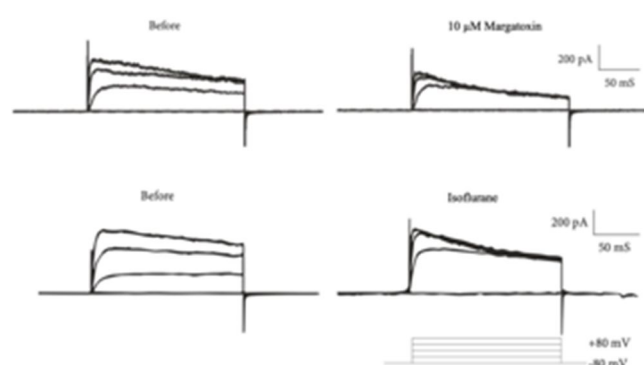
しかし、Kv1.3 チャンネルの選択的阻害薬であるマルガトキシンを連日、200nM/mL 腹腔内投与する治療を行ったラットでは、腎の免疫組織染色標本の腎皮質間質において線維化マーカー発現が減少した。マルガトキシンが腎皮質間質におけるリンパ球浸潤と間質線維化を抑制することが示された。(右図)



組織像では、マルガトキシン治療ラットにおいて顕著な白血球数減少と白血球増殖抑制も認めた(右図上段)。本研究におけるマルガトキシン投与量は慢性腎不全モデルにおける腎間質線維化を抑制するマルガトキシン投与量の倍量ではあったが、マルガトキシンにより UUO モデルにおいても腎間質線維化を抑制する(右図下段他)ことから、リンパ球における Kv1.3 チャンネル過剰発現が、白血球増殖や腎間質線維化に強く関与していると考えられた。



(2) マウス胸腺から得られたリンパ球浮遊液のリンパ球膜表面にパッチクランプ法を行い、電流を測定した後、浮遊液中にマルガトキシンを投与して、電流の変化を計測し確認した。リンパ球細胞膜表面の Kv1.3 チャンネルに対して抑制効果を認めた(右図上段)。



(3) マウス胸腺から得られたリンパ球浮遊液において、(2) 同様にパッチクランプ法でコントロール電流を測定した後、揮発性麻酔薬(ハロタン、イソフルラン)を投与し、リンパ球細胞膜表面 Kv1.3 チャンネルの電流変化を計測した。リンパ球細胞膜表面 Kv1.3 チャンネルの電流変化が確認された。(上図下段)

上記結果から、リンパ球膜表面の Kv1.3 チャンネルを標的とした治療や麻酔薬投与により腎間質線維化を抑制できると考えられ、慢性腎不全への進行を抑制する今後の治療薬開発の一助となると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe Nozomu, Toyama Hiroaki, Saito Kazutomo, Ejima Yutaka, Yamauchi Masanori, Mushiake Hajime, Kazama Itsuro	4. 巻 2019
2. 論文標題 Delayed Rectifier K+-Channel Is a Novel Therapeutic Target for Interstitial Renal Fibrosis in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/7567638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito Kazutomo, Abe Nozomu, Toyama Hiroaki, Ejima Yutaka, Yamauchi Masanori, Mushiake Hajime, Kazama Itsuro	4. 巻 2019
2. 論文標題 Second-Generation Histamine H1 Receptor Antagonists Suppress Delayed Rectifier K+-Channel Currents in Murine Thymocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/6261951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kazutomo Saito, Nozomu Abe, Hiroaki Toyama, Yutaka Ejima, Masanori Yamauchi, Hajime Mushiake, and Itsuro Kazama	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Second-Generation Histamine H1 Receptor Antagonists Suppress Delayed Rectifier K+-Channel Currents in Murine Thymocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 12 pages
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/6261951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	風間 逸郎 (Kazama Itsuro) (60593978)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------