

機関番号：10107

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20790584

研究課題名 (和文) 腎不全病態における血管内皮前駆細胞の役割解明と高機能内皮前駆細胞導入の効果

研究課題名 (英文) Role of the endothelial progenitor cells in the pathophysiology in kidney failure and the effect of injection of high functional endothelial progenitor cells in kidney failure.

研究代表者

中川 直樹 (NAKAGAWA NAOKI)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10451460

研究成果の概要 (和文)：

骨髄選択的プロスタグランジン I2 受容体(IP)欠損マウスモデル (=EPC 機能低下モデル)では、腎不全の病態が増悪するか否かを、IP 欠損マウス由来の骨髄細胞を用いて、骨髄移植マウスを作成し、検証を進めた。腎動脈虚血再灌流モデル、尿管結紮モデル、腎摘出モデルの三系統のなかで、腎動脈虚血再灌流モデルにおいて、血清クレアチニン値を wild 骨髄細胞移植群との比較検討したところ、骨髄 IP 欠損モデルにおいて、血清クレアチニン値が高値を呈する傾向を見出したが、有意差は見出せなかった。

今後、虚血条件の検討や、さらに実験動物数を増やすとともに、その形質変化の機能解析実験を行い、さらには尿管結紮モデル、腎摘出モデルにおいても検討を進めていく予定である。そして骨髄選択的 IP 欠損・腎不全モデルにおける正常 EPC 投与の影響、さらには腎不全病態への高機能 EPC 投与の影響についても検討を進めていく予定である。

研究成果の概要 (英文)：

We have recently reported that the mice of the specific deletion of prostaglandin I2 receptor (IP) in bone marrow cells is used as endothelial progenitor cells (EPCs) dysfunction model. We investigated the condition is whether the renal failure worsened, using the mice of the specific deletion of IP in bone marrow cells (BMCs). We examined renal function and histological change in models of renal artery ischemia-reperfusion, ureteral ligation, and renal nephrectomy. Among the three models, in renal artery ischemia-reperfusion model, the serum creatinine levels were tend to higher, but no significant, in mice of the specific deletion of IP in BMCs compared with mice of the transfused wild-type EPCs in BMCs.

In the future, we will investigate the ischemic conditions in increasing the number of animals, and examine the changes in functional analysis, as well as ureteral ligation model and nephrectomy model. Furthermore, we will clarify the role of the EPCs in the pathophysiology in kidney failure and the effect of injection of high functional EPCs in kidney failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

近年食生活などの欧米化により、日本での糖尿病、高血圧症に伴う慢性腎臓病患者数が増加している。血液透析患者数は年々増加の一途をたどり平成20年末には26万人を超え、必要な医療費も既に1兆2千億円（国民総医療費の約4%）に達している。また、慢性腎臓病は末期腎不全に至る危険率が高いのみならず、心血管疾患の独立した危険因子である。現在、腎不全の治療はレニン・アンジオテンシン系抑制薬を中心とした降圧療法が主体である。しかし、これら既存の治療法は、腎不全の進行抑制効果を期待しているが、その効果は決して満足できるものではなく、また、すでに障害された腎組織に対して明らかな改善効果がある治療法も存在しない。したがって、慢性腎臓病および腎不全の病態生理の解明、さらに効果のある新しい治療法の開発が重要な課題となっている。

最近、慢性腎不全病態と末梢血中の血管内皮前駆細胞（EPC）に連関性があること[1]、骨髄細胞導入で一部腎機能改善効果を認める[2]ことが報告され、腎不全病態あるいは腎機能維持にEPCが重要な役割を持つのではと考えられるようになってきた。しかし、従来の研究は、腎不全病態におけるEPCの役割に関してほとんどが間接的な検討であり、また、従来の方法による骨髄細胞やEPCの細胞導入療法の効果は十分とはいえない。したがって、腎不全病態での詳細なEPCの役割解明とともに、より効果的なEPC導入療法の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

『血管内皮前駆細胞（EPC）は腎不全の病態進展に重要な役割を持ち、高機能EPC導入療法は腎不全病態改善に効果がある』という仮説をたて、研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

我々は、プロスタサイクリン（PGI<sub>2</sub>）の特異的受容体（IP）を骨髄選択的に欠損させたマウスモデルを利用して、EPCの機能維持に、EPC自身のPGI<sub>2</sub>・IP系が重要であることを見出した。このことから、

骨髄選択性IP欠損マウスは、「EPC機能不全モデル」として各種病態におけるEPCの役割を解明することができる。腎不全の原因は多種多様であり、EPCがどのようなタイプの腎不全病態に役割を持つのか不明である。したがって、さまざまな発症機転でおこる腎不全モデルを作成し、腎障害（不全）進展におけるEPCの役割を検討することにする。すなわち

- ① 尿管結紮モデル：尿管通過障害による尿細管障害、腎間質における炎症細胞浸潤、線維化をひき起こす。
- ② 腎摘出モデル：残存腎の負荷を高め、糸球体高血圧を介し、糸球体硬化、間質の線維化をもたらす。
- ③ 腎動脈虚血再灌流モデル：腎循環障害により、腎虚血、梗塞をもたらす、急性尿細管壊死をもたらす。

（1）IP欠損骨髄細胞移植； 研究協力者（川辺）の指導のもと、骨髄移植法にて、骨髄のみをIP欠損骨髄に置換する（98%以上の骨髄細胞を置換）。対照群として、wild EPCを置換したモデルを合わせて作成する。

（2）腎不全モデル作成； 骨髄移植4～5週後、上記の各種腎不全モデルを作成する。

（3）腎病理および免疫組織評価； 腎不全形成は、尿管結紮、腎摘出モデル、また腎動脈虚血再灌流モデルで、それぞれ術後5～7、2～3日目で認める。時間経過（腎不全初期・後期）ごとに、病理組織的解析を行う。PAS染色で糸球体硬化、HE染色で尿細管壊死、シリウス・レッド染色法で間質線維化を評価し、腎尿細管、および内皮細胞はアミノ酸トランスポーター抗体、vWF抗体、炎症細胞浸潤は、F4/80抗体の免疫染色法で細胞同定、評価する。

（4）腎機能評価； 腎不全モデル作成後、尾静脈から採血し、電解質、BUN、Creなどを測定する。

（5）腎組織の増殖因子、サイトカインなどの発現； 腎不全進展過程におけるサイトカイン（TGF- $\beta$ 、CTGF）、ケモカイン（MCP-1、RANTES）の発現動態をreal time RT-PCR法により

評価する。

(6) 末梢血中のEPC数、機能評価；腎不全病態の経過中、尾静脈から採取した末梢血中のEPC数をフローサイトメトリー法で、EPCの機能をEPC culture assay法で評価する。

#### 4. 研究成果

骨髄選択的プロスタグランジンI<sub>2</sub>受容体(IP)欠損マウスモデル(=EPC機能低下モデル)では、フローサイトメトリー解析などから98%以上の骨髄がdonor由来のものに置換していることを確認した。腎動脈虚血再灌流モデル、尿管結紮モデル、腎摘出モデルの三系統のなかで、腎動脈虚血再灌流モデルにおいて、両腎動脈20分虚血の24時間後の血清クレアチニン値を野生型骨髄細胞移植群との比較検討したところ、骨髄IP欠損群において、血清クレアチニン値が高値を呈する傾向(野生型:50±28mg/dl、骨髄IP欠損群:58±32mg/dl、N=6)を見出したが、有意差は見出せなかった。また、組織学的検索においても、尿細管壊死(図1)、マクロファージ(Mφ)浸潤(図2)に両群で有意差は見出せなかった。

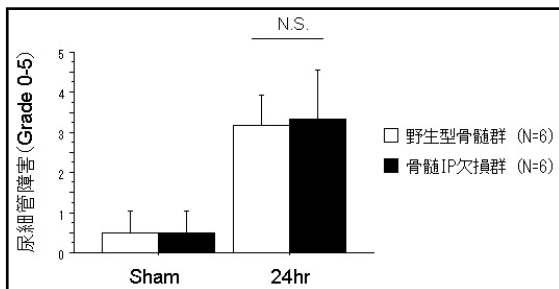


図1 腎虚血モデルにおける尿細管障害

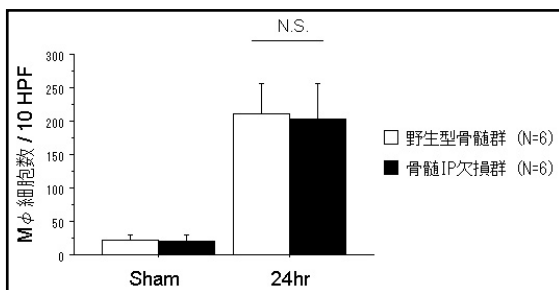


図2 腎虚血モデルにおけるMφ浸潤

今後虚血条件の検討や、さらに実験動物数を増やすとともに、その形質変化の機能解析実験を行い、さらには尿管結紮モデル、腎

摘出モデルにおいても検討を進めていく予定である。骨髄選択的IP欠損・腎不全モデルにおける正常EPC投与の影響、さらには腎不全病態への高機能EPC投与の影響についても検討を進めていく予定である。

#### 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 1 件)

1. Nakagawa N, Yao N, Hirayama T, Ishida M, Ishida H, Wada A, Fujino T, Saijo Y, Kikuchi K, Hasebe N., Potential impact of renin-angiotensin system inhibitors and calcium channel blockers on plasma high-molecular-weight adiponectin levels in hemodialysis patients. Hypertension research, 34:592-598, 2011、査読有り

2. Nakagawa N, Ota H, Tanabe Y, Kabara M, Matsuki M, Chinda J, Sakamoto N, Fujino T, Takehara N, Takeuchi T, Kawabe J, Sato N, Kawamura Y, Fukuhara T, Ikuta K, Kikuchi K, Hasebe N., A Case of Idiopathic Systemic Capillary Leak Syndrome with High Serum Levels of G-CSF on Exacerbation. Intern Med, 50:597-600, 2011、査読有り

3. Kabara M, Nakagawa N, Chinda J, Hirai T, Nimura A, Ota H, Tanabe Y, Fujino T, Sato N, Hasebe N., Diagnosis of IgG4-related systemic disease by cytology of large pericardial effusion with fine needle aspiration. International journal of cardiology, 148:392-393, 2011、査読有り

4. Kawabe J, Yuhki K, Okada M, Kanno T, Yamauchi A, Tashiro N, Sasaki T, Okumura S, Nakagawa N, Aburakawa Y, Takehara N, Fujino T, Hasebe N, Narumiya S, Ushikubi F., Prostaglandin I<sub>2</sub> promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 30:464-470, 2010、査読有り

5. 中川直樹、長谷部直幸、AKIとCKDのすべて 10. CKDにおいて使われる薬剤 5)Ca拮抗薬、腎と透析 69 増刊号:234-237, 2010年、査読無し

6. Nakagawa N, Kidney Disease, 2010 ISH HIGHLIGHTS pp84-88, 2010年、査読無し

7. 珍田純子、中川直樹、長谷部直幸、特集：透析・腎移植患者の血圧異常とその管理透析時低血圧症の管理、腎と透析 69(3):287-289, 2010年、査読無し

8. 菊池健次郎、中川直樹、藤野貴行、長谷部直幸：臨床研究Overview NICE-Combi Studyの紹介・解説、Nephrology Frontier 9(2):66-69, 2010年

9. 中川直樹、長谷部直幸：特集 透析患者の心臓—心臓病による死亡を減らすために I. 慢性腎臓病 (CKD) と心不全 臨床透析 26(5):511-517, 2010年

10. 中川直樹、長谷部直幸：ACE阻害薬に関する話題 4. 高血圧とACE阻害薬 (EBMを含めて)、Modern Physician 30(3):391-394, 2010年

[学会発表] (計 1 件)

1. Nakagawa N, Fujino T, Sato N, Kikuchi K, Hasebe N., Controlled-Release Nifedipine and Candesartan Combination Therapy Reduced Urinary Albumin Excretion without Decreasing Glomerular Filtration Rate: The NICE Combi Substudy., 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (ISH), Vancouver, Canada, 2010

[図書] (計 2 件)

1. 中川直樹、長谷部直幸、他、CKDにおける心不全の治療のあり方 Annual Review 腎臓 2011, p257-264, 2011年

2. 中川直樹、長谷部直幸、他、II. 高血圧はどのように調節されているのか、どうして高血圧になるのか 4. 血行力学、最新高血圧診療学、p52-57, 2010年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 直樹 (NAKAGAWA NAOKI)  
旭川医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：10451460

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：