

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791111

研究課題名（和文）

虚血再還流障害に関する研究—ドキシサイクリンは50年の沈黙を破れるか

研究課題名（英文） Can doxycycline become new medicine in the last 50 years to reduce 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・助教

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確立した。8-12週のB6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℃に保ち、45分後に腎動静脈を開放（unclamp）する。腎機能の評価は24時間ごとに血清クレアチニンを測定した。腎組織が必要な場合その時点でマウスをsacrificeし、標本を保存し、組織の比較検討を行った。ドキシサイクリンによる腎虚血再還流障害が軽減されていることを確認した（これまで報告がない）。

研究成果の概要（英文）：We established murine renal ischemia reperfusion injury (IRI) model. Renal hilums of B6 mouse was clumped for 45 minutes under anesthesia. Body temperature was kept on 32°C. We have identified reduced IRI by measuring serum creatinine level and histopathology.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：腎移植

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25万人に対して2005年の一年間で

合計 994 例（生体腎移植 834 例、死体腎移植（心停止 144 例、脳死 16 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 (M. A Daemen et al. *J Clin Invest* 1999, S Noguea 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- α 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

たく進歩がなかったということは驚くべきことである。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、移植黎明期からの沈黙を破る新しい移植プロトコールを意味する。

(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

マウスの腎虚血再還流モデルにおいてドキシサイクリン投与群とコントロール群の2群に分け、虚血再還流後の腎機能に違いが出るか経時的に比較検討した。

腎病理組織に違いがあるか比較検討した。

腎臓内の好中球浸潤に違いがあるか経時的に比較検討した

研究成果

マウス腎虚血再還流モデルを確立した。8-12週のB6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、45分後に腎動静脈を開放(unclamp)する。腎機能の評価は24時間ごとに血清クレアチニンを測定した。腎組織が必要な場合その時点でマウスをsacrificeし、標本を保存し、組織

の比較検討を行った。ドキシサイクリンによる腎虚血再還流障害が軽減されていることを確認した。これは今まで報告のない画期的な結果である。

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 Robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy in the Asian population: Modified port configuration and ultradissection
(International Journal of Urology, 2010 17 297-300、査読あり、Wooju Jeong, Motoo Araki et al.)

[学会発表] (計6件)

① H22.12月 日本内視鏡外科学会 (東京)
腹腔鏡下尿管遺残摘出術の8例
(荒木元朗ほか)

② H22.11月 岡山腎疾患懇話会 (岡山)
術前6週間の免疫抑制で成功したハイリスク生体腎移植の1例
(荒木元朗ほか)

③ H22.11月 World Congress of Endourology (ミュンヘン、ドイツ)
RETROGRADE URETEROPYELOSOPIC TREATMENT OF LARGE UPPER URINARY TRACT AND STAGHORN CALCULI WITH AQUAGUIDE
(荒木元朗ほか)

④ H22.8月 Yonsei Urology Symposium (招請講演)(ソウル、韓国)
International Robotic Fellowship Program at Yonsei

(荒木元朗)

⑤ H22.4月 American Urological Association Annual meeting (シカゴ、アメリカ)
Ureteroscopic Evaluation and Treatment of Chronic Unilateral Hematuria: A 22-year Experience
(荒木元朗ほか)

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・助教
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

河内 啓一郎 (KAWAUCHI KEIICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

廣畑 聡 (HIROHATA SATOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
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