

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09294

研究課題名(和文) 災害や外傷に伴う急性腎障害(AKI)の機能予後と治療に関わる分子マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of molecular markers for prognosis and treatment of acute kidney injury (AKI) associated with disaster and trauma

研究代表者

那須 亨(Nasu, Toru)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60393310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：災害時や平時のケガや事故などにより外傷を受けた後に、急性腎障害(英語ではacute kidney injury, AKI)と呼ばれる病気になることがあります。AKIとは体内にある腎臓と呼ばれるおしっこを作る臓器がうまくはたらくことが出来なくなり、体内に毒素がたまり、時には命に関わる状態になることもある病気です。私の研究の目的はこの腎臓の中の尿細管と呼ばれる部分の修復や治療に関係する物質を見つけ出すことです。これにより外傷を受けた後にAKIにならないようにしたり、あるいは有効な治療方法や治療薬の発見につなげることができるのです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的検討により外傷後急性腎障害の発症を予測する臨床因子として「病院前収縮期血圧」と「救急外来での乳酸値」が候補になることを発見した。さらに別のデータセットを使用し妥当性を検討したところ、これらは外傷後急性腎障害の予測能性が高いことがわかった。一方分子生物学的検討も行うも予測分子マーカーを同定するに至らなかった。外傷を受けた後にせっかくケガが治ってもAKIにより障害を残したり、命を落とす場合がある。この研究によりこのような人をひとりでも減らすことに貢献でき、特に若い人や働き盛りの人がAKIにならないようにすることは、その人だけでなく家族や社会を救うことにもつながる。

研究成果の概要(英文)：After a traumatic injury or accident during a disaster or in normal times, a person may suffer from acute kidney injury (AKI), a disease in which the kidney, an organ in the body that produces urine, is unable to function properly and toxins accumulate in the body, sometimes causing a life-threatening condition. This can cause toxins to accumulate in the body, sometimes resulting in a life-threatening condition. The purpose of my research is to find substances that are involved in the repair and treatment of the tubules in the kidneys. This will allow us to prevent AKI after trauma and to find effective treatments and drugs to cure the disease.

研究分野：救急医学

キーワード：急性腎障害 AKI 外傷 災害 予測臨床因子 予測分子マーカー CITED1

1. 研究開始当初の背景

< 研究の学術的背景 >

高エネルギー体幹部外傷や出血性ショックに対する緊急手術の術後、あるいは腹部コンパートメント症候群のICU 管理中、または災害時における圧挫症候群解除後に発症する合併症として急性腎障害 (Acute Kidney Injury: AKI) がある。これらに合併してくるAKIは虚血性変化によるものであり腎灌流減少が高度かつ持続的であることで尿細管器質的障害に至った状態であり急性尿管壊死 (Acute Tubular Necrosis: ATN) を呈することが多く、一度発症すると非常に高い治療抵抗性を示し、救命率低下の大きな一因となっており、AKIの早期診断と適切な予防と治療が必須である。しかし、現時点でAKIに対する明確な予防法や絶対的な治療法はまだ確立されておらず、新規AKI療法の開発が待たれている。

近年、AKI動物モデルにおいて尿細管細胞への治療に関し多くの方法論が集積され、AKIの予防・障害軽減・回復促進の効果が期待される。治療の介入点として、

1. 腎血行動態の制御

2. 炎症の制御

3. 細胞死の制御 (抑制)

4. 細胞増殖・分化の制御

が挙げられるが、本研究では

細胞増殖・分化の制御 (図1)

に着目した。

細胞増殖と分化・脱分化に関する研究は癌細胞における浸潤と転移のメカニズムとして最も多く行われておいる。特に大腸癌先進部では癌が間質内へ浸潤する過程において、高分化型組織である主病巣と異なった低分化な組織へ脱分化することが知られている。

我々はこれまでにヒト大腸癌組織を用いた網羅的遺伝子発現解析により、大腸癌先進部脱分化をもたらす候補遺伝子群を選定した (Clin Cancer Res 2008)。さらに実際の大腸癌症例161例を用いて検討し、これらの候補遺伝子群の中でCITED1が進行大腸癌のみならず早期癌においてもリンパ節転移を予測する新しいバイオマーカーとなり得ることを示した (J Surg Res 2013)。このCITED1を用いれば、早期大腸癌であってもリンパ節転移を生じやすく生命予後の悪い症例を手術前に予測することができ、オーダーメイド治療につながる可能性を示した。

一方、CITED1は腎発生段階でも発現している。哺乳類の腎発生段階において、中間中胚葉より発生した後腎では、後腎間葉の誘導によりウォルフ管から尿管芽が伸長している。後腎間葉細胞は尿管芽周辺に凝集し将来尿細管となるキャップ状の構造 (cap mesenchyme) を形成させる。CITED1はこのcap mesenchymeのマーカースとして知られており、ラットおよびマウスのcap mesenchymeにCITED1のmRNAおよび蛋白が高発現していることが分かっている (Plisov S et al; JASN 2005)。また、TGF-βシグナル伝達において細胞内でリン酸化されたSmadはco-Smadと複合体を形成し核内に移行し (Heldin CH et al; Nature 1997)、核内で転写因子・転写共役因子とともに、標的遺伝子の転写を調節するが (Liu F et al; Nature 1996)、CITED1は転写co-activatorの1つであり、Smad複合体と結合して転写活性を上昇させる (Yahata T et al; J Biol Chem 2000) (図2)。その他にDelta-1やNoctch-Hesが腎胎生期とAKI後の修復期に発現することが知られている (Kobayashi T et al; Kidney Int 73 1240-1250 2008)。



図1 AKIの回復過程

すなわちCITED1は胎生期腎尿細管の  
 マーカーであり、脱分化関連遺伝子である。  
 脱分化という現象がAKIの近位尿管  
 修復に深く関わっており、CITED1が  
 近位尿管修復能の新規性のあるバイオ  
 マーカーとなる可能性が高い。さら  
 に、CITED1はES細胞やiPS細胞を利用し  
 た新規AKI治療の開発に寄与するもの  
 と予想される。

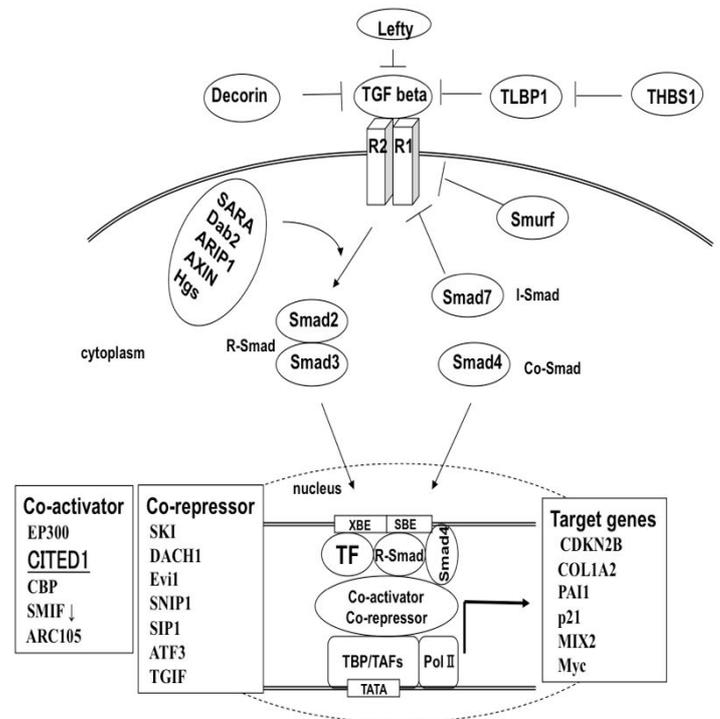


図2 TGF-βシグナル伝達におけるCITED1の役割

## 2. 研究の目的

敗血症や重症外傷術後などに発症する急性腎障害：Acute Kidney Injury (AKI) は尿管細胞死が主な病態であり、末期腎不全に陥る症例から元の健全な腎機能を回復する症例まで、その臨床経過は多岐にわたっている。AKI は主に近位尿管が脱落し、細胞増殖と分化を経て修復される。回復期の近位尿管細胞の増殖と再生には、胎生期の分化に関わるシステムが関与していることが知られており、上皮間葉転換 (EMT)による脱分化が認められるが、脱分化の機序や予後に関わる因子は未だ不鮮明である。今回我々は、虚血再灌流モデルを用いて AKI 重症度・AKI 発症からの時期に応じて、近位尿管細胞の増殖と再生において脱分化関連遺伝子 CITED1 がどのように関与しているかを明確にし、新規分子マーカーや新規遺伝子治療となり得るか検討する。

## 3. 研究の方法

分子生物学的アプローチ検討として、ラットの虚血再灌流モデルを用いて脱分化関連遺伝子CITED1が外傷後急性腎障害にどのように関与しているかを明確にし、新規分子マーカーや新規遺伝子治療となり得るか検討することである。すなわち、

### (1) Wistar ラットを用いた腎虚血再灌流モデルの作製技術の習得

腎虚血再灌流モデルはWistar ラット (日本クレア) を用いて以下のプロトコルで行う (Kidney Int14: 1646, 2002)。まず尾静脈から採血した後、Pentobarbital (大日本製薬) を50mg/kg 腹腔内投与による麻酔下で、腹部正中切開で開腹を行う。両側腎門部の腎動静脈を露出し、動脈クリップを用いて30分から90分クランプする。また最良のAKIモデルを得るため、腎動静脈のクランプ時間は調整していくその後クランプを外し再灌流させ、閉腹する。

### (2) 重症度別腎虚血再灌流モデルにおけるAKI 治癒過程の細胞増殖および脱分化の評価

腎虚血再灌流モデルは軽症・中等症・重症モデルそれぞれ12匹ずつ作製する(計36匹)。作製より経時的に12時間後・24時間後・3日後・10日後(計4時期)にそれぞれ3モデルグループより3匹ずつ屠殺し、採血・採尿・腎臓摘出を施行する。摘出腎は分割し、ホルマリンあるいはパラホルムアルデヒドによる固定、液体窒素による急速凍結保存を行い、さらに保存された腎臓より蛋白質とmRNAを抽出する。その後、以下の項目を検討する。AKIの評価項目---採血によるCr値、BUN値。採尿によるL-FABP(L型脂肪酸結合蛋白)値。H-E染色標本による近位尿細管上皮細胞の変性・壊死と再生の評価(日腎会誌38:493の評価基準を参考に熟練病理医に判定を依頼)。

- (3) AKI 治癒過程の細胞増殖および脱分化の良好な部位のCITED1、Delta-1、Noctch-Hes遺伝子発現を評価

実験2.で細胞増殖および脱分化が良好であると評価された部位をLaser microdissectionを用いて選択的に採取し(図3)、RNeasy Micro Kit(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出し、ImPromII Reverse Transcription System(Promega)でcDNAを作製し、LightCycler(Roche)を用いてreal time RT-PCRを行い、CITED1、Delta-1、Noctch-HesのmRNA発現を定量し評価する。さらに免疫染色を行い、蛋白発現を評価する。実験3.でのCITED1 mRNA発現と総合的に評価し、CITED1、Delta-1、Noctch-Hes遺伝子の発現と細胞増殖および脱分化の関連性を検討する。

- (4) AKI に対する尿細管細胞増殖・分化能向上を目的としたCITED1遺伝子導入により、腎再生の促進効果検討(モデル作製 3日後、10日後)

Day 1:中等症あるいは重症腎虚血再灌流モデルを作製し(実験1で示した方法)、再灌流後両側腎動脈からCITED1 expression HVJ Envelope vectorを投与。その後、独立した実験系で経時的(3日後、10日後)に、実験2で示したAKI 治癒過程の細胞増殖および脱分化の評価を行い、CITED1 mRNA発現およびCITED1蛋白発現を検討する。

一方、臨床的検討として、和歌山県立医科大学附属病院高度救命救急センターに搬送された実際の外傷患者の臨床データを用いて、外傷後急性腎障害の発症を予測する臨床因子を検討することである。

#### 4. 研究成果

研究成果を「**病院前収縮期血圧と乳酸値は外傷後の急性腎障害(AKI)の予測因子となり得る:前向き検証研究**」と題し第48回日本救急医学会総会・学術集会(2020年11月,岐阜)の優秀演題セッションにて研究発表を行ない、**最優秀賞**を獲得した。

さらにこれらの研究成果を英文誌に投稿し、Prediction of early acute kidney injury after trauma using prehospital systolic blood pressure and lactate levels: A prospective validation study. (INJURY. 53(1):81-85, 2022)として採択された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nasu Toru, Ueda Kentaro, Kawashima Shuji, Okishio Yuko, Kunitatsu Kosei, Iwasaki Yasuhiro, Kato Seiya	4. 巻 265
2. 論文標題 Prehospital Blood Pressure and Lactate are Early Predictors of Acute Kidney Injury After Trauma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 180 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2021.03.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nasu Toru, Ueda Kentaro, Kawashima Shuji, Okishio Yuko, Kunitatsu Kosei, Iwasaki Yasuhiro, Kato Seiya	4. 巻 53
2. 論文標題 Prediction of early acute kidney injury after trauma using prehospital systolic blood pressure and lactate levels: A prospective validation study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Injury	6. 最初と最後の頁 81 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.injury.2021.09.039	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nasu Toru
2. 発表標題 Prehospital systolic blood pressure and lactate are early predictors of acute kidney injury after trauma: a prospective validation study.
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 那須亨
2. 発表標題 病院前収縮期血圧と乳酸値は外傷後の急性腎障害 (AKI) の予測因子となり得る: 前向き検証研究
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔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	上田 健太郎 (UEDA KENTARO) (20438279)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授  (24701)	
研究分担者	米満 尚史 (YONEMITSU TAKAFUMI) (80382331)	和歌山県立医科大学・医学部・講師  (24701)	

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
---------	---------