

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22875

研究課題名（和文）高血圧ラットで解き明かす「AKI to CKD」の分子基盤とその予防法の開発

研究課題名（英文）Evaluation of molecular basis of 'AKI to CKD' and development of the preventive method using hypertensive rats

研究代表者

江川 雅博（Egawa, Masahiro）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：90799115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：急性腎障害(AKI)は慢性腎臓病(CKD)の発症に関わるリスク因子の一つと考えられているが、その病態生理学的な基盤は不明である。本研究では、高血圧自然発症ラット(SHR)を用いて「AKI to CKD」の背景にあるメカニズムを調査することを目的とした。しかし、少なくとも本研究における虚血再灌流(I/R)モデルでの評価では、CKDへの進行を示す明らかな所見は確認できておらず、「AKI to CKD」に関わる分子メカニズムの解明には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧は国内患者数が4000万人を超える国民病であり、かつAKIからCKDへの移行に関わる危険因子の一つと考えられている。有病率の高さに加え、高血圧それ自体が腎障害（腎硬化症）のリスク因子であることを考慮すると、AKI-CKDの病態連関における高血圧の病態生理学的役割を検証することは臨床的にも意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Acute kidney injury (AKI) is thought to be a risk factor for the onset of chronic kidney disease (CKD), however, the pathophysiological basis remains unclear. In this study, we aimed to investigate the underlying mechanisms of 'AKI to CKD' using spontaneously hypertensive rats (SHR). At least in the evaluation by ischemia/reperfusion (I/R) model, we found no pathological features of CKD. Further investigation is warranted to clear the underlying mechanisms of 'AKI to CKD'.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性腎障害 慢性腎臓病 高血圧 高血圧自然発症ラット

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害(AKI)は敗血症や心不全、薬剤傷害により急激に腎機能が悪化する病態である。従来、AKIによる腎機能障害は軽度かつ一過性であり、「治る病」と考えられてきた。しかし近年、AKIはしばしば致死性であるだけでなく、AKI患者の20%以上が慢性腎臓病(CKD)や末期腎不全に移行する重篤な病態であることが臨床的に認識されている(Coca et al. 2012 *Kidney Int*)。AKIの発症の予測は困難であり、加えて確実な治療法も存在しないため、AKIを起源にCKDや末期腎不全への進行を防ぐためには、「AKIとCKDの病態形成のクロストーク」を明らかにし、重症化を早期に予防することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、AKIを基礎としてCKDに至る要因と分子機序を探究するため、高血圧性腎障害を併発する高血圧自然発症ラット(SHR・SHRSP)をモデルに、「AKIからCKDへの進行(AKI to CKD)における高血圧と酸化ストレス傷害の関与を検証し、その分子機序の一端を明らかにすること」を目的とする。高血圧は国内患者数が4000万人を超えるとされる国民病であり、かつAKIからCKDへの移行に関わる危険因子の一つと考えられている。有病率の高さに加え、高血圧それ自体が腎障害(腎硬化症)のリスク因子であることを考慮すると、AKI-CKDの病態連関における高血圧の病態生理学的役割を検証することは臨床的にも意義がある。また、活性酸素種の過剰産生による酸化ストレスは、脳心血管腎臓病を含む多くの疾患の発症・進行の双方に関わり、AKIおよびCKDへの進行においても中心的な働きを担うと考えられている(Tomsa et al 2019 *PeerJ*)。本研究では、高血圧ラットおよび、それらをベースに生体内の活性酸素産生/消去に関わる3つの主要遺伝子を各々ノックアウト(KO)したユニークなゲノム編集ラットを用いて、AKIからCKDへの進行における「高血圧と酸化ストレス」の関与を検証し、高血圧・酸化ストレス制御による腎臓病進行に対する予防・治療戦略の確立を目指す。

3. 研究の方法

12週齢オスのSHR/Izmを無処置の対照群と虚血再灌流(ischemia/reperfusion; I/R)処置群に分けた(各群3匹)。三種混合麻酔(塩酸メドミジン+酒石酸ブトルフェノール+ミダゾラム)を皮下注射で投与し、左側腹部を開腹して周囲脂肪を綿棒で除去して腎動静脈を露出した。非傷害性クリップで腎動静脈を45分間クランプした後、クリップを外して再灌流を行った。術部を縫合し、1週間の回復期間を設けた後、実験に供した。

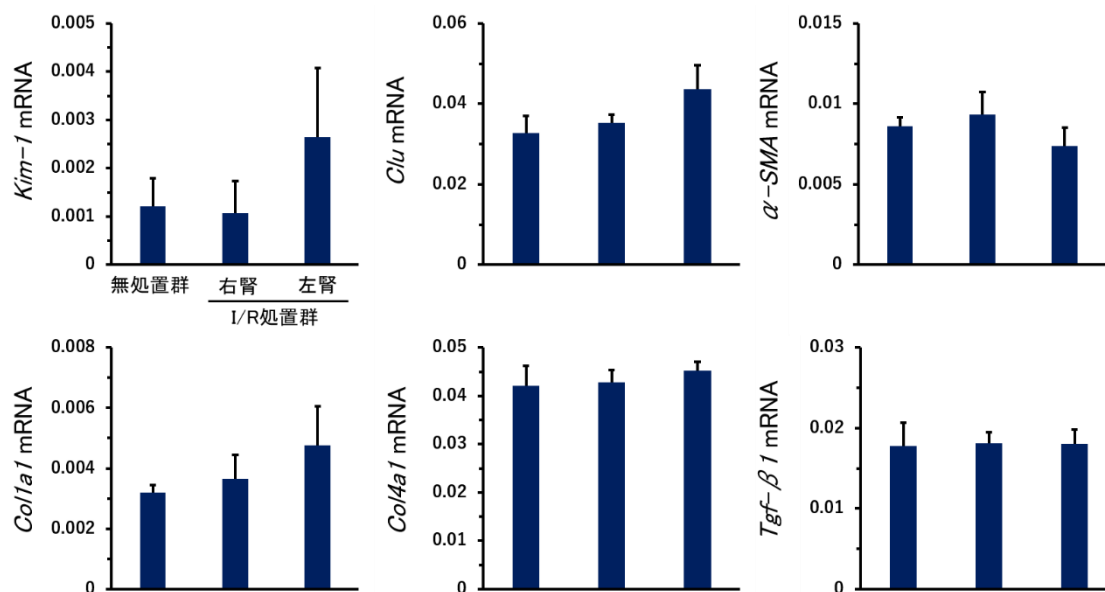
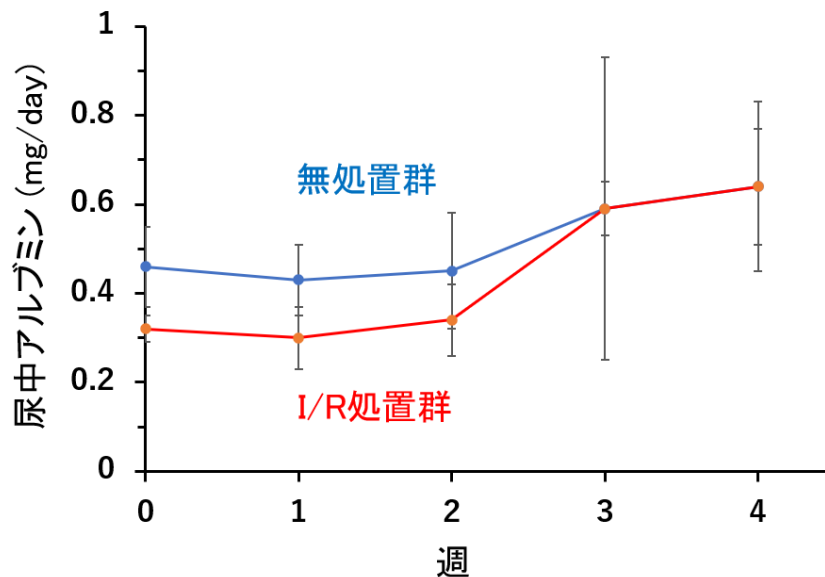
術前および術後1週間後から4週間の計5回、代謝ケージで採尿した。1,000 rpmで5分間遠心した上清を回収して尿量を計測するとともに、使用時まで -80°C で保存した。レビス アルブミン-ラット(富士フィルムワコーシバヤギ)を用いて尿中アルブミンを定量した。測定にはDTX880 マルチモードディテクター(BECKMAN)を用いて、620 nmを参照波長として450 nmの吸光度を測定し、1日当たりのアルブミン排泄量(mg/day)を算出した。

最終の採尿が終わった後に、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、後大静脈から採血後、腎臓を摘出した。一部を液体窒素に入れて凍結し、使用時まで -80°C で保存した。I/R処置群については、I/R処置を行った左腎と、無処置の対照となる右腎をそれぞれ採取・保存した。Sepasol RNA-I Super G(ナカライテスク)を用いてRNAを抽出し、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser(タカラバイオ)で腎cDNAを調製した。TB Green Premix EX Taq II(タカラバイオ)およびStepOnePlusリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を用いて、尿細管障害マーカー[kidney injury molecule-1 (*Kim-1*), Clusterin (*Clu*)]および線維化関連マーカー(α -SMA, *Col1a1*, *Col4a1*, *Tgf- β 1*)の発現を定量評価した。発現量は、 β -actinに対する相対的発現として算出した。

4. 研究成果

尿中アルブミンおよび、尿細管傷害/線維化関連マーカーの発現量のいずれにおいても、無処置群とI/R処置群で有意差は認められなかった。遺伝子発現量については、I/R処置群の右腎と左腎での比較においても、有意差は認められなかった。申請者は本研究に関わる動物実験や分子生物学実験についての経験に乏しいため、高血圧ラットを用いた研究に精通した学内の研究協力者による技術指導を受けながら、計画を実施する予定であった。しかし、新型コロナウイルスに関連した研究以外の業務負担の増大により、研究協力者と時間調整をして研究を実施することが難しくなり、手術操作の確認や実験条件の検討などに時間を要し、研究計画に大幅な遅延が生じてしまった。そのため、当初予定していたノックアウトラットの解析等に着手できず、対照

系統となる SHR/Izm を用いた一部の実験を実施するに留まってしまった。予備実験による組織学的評価から、45 分の虚血が AKI の腎病態の誘導に最適であることは確認したが、今回の実験条件は CKD への移行を評価する期間としては短すぎであり、間質線維化が十分に進行していなかった可能性も考えられる。尿細管傷害については、術後約 1 か月が経過しているため、組織が十分に再生されたために有意差が認められなかったことが推測される。以上のことから、「AKI to CKD」のメカニズムを計画通りに検証できたとは言えず、ノックアウトラットを含めた解析を今後も継続する必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 WANG Mei, OHARA Hiroki, EGAWA Masahiro, FUKUNAGA Shohei, MATSUO Hiroyuki, GE Zhi-Ru, NABIKI Toru	4. 巻 In press
2. 論文標題 A 3-Mbp fragment on rat chromosome 1 affects susceptibility both to stroke and kidney injury under salt loading in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: a genetic approach using multiple congenic strains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0189	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
---------------------------	-----------------------	----

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