

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590257

研究課題名（和文） 閉塞性腎症における腎線維化を抑制する新しい薬物治療の開発

研究課題名（英文） Development of novel pharmacological treatment to inhibit renal fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction

研究代表者

伊藤 敬一（ITO KEIICHI）

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：90260091

**研究成果の概要（和文）：**（目的）抗酸化物質  $\alpha$  リポ酸(ALA)が閉塞性腎症(UUO)の尿細管間質障害に与える影響について検討した。（方法）ラット 14 日間尿管閉塞モデルを用い、ALA (200mg/kg/day, 連日)の効果について検討した。（結果）ALA の投与により間質線維化が抑制され、FSP1 陽性細胞数も有意に低下した。組織 TGF- $\beta$ 1 濃度も ALA 投与で抑制され、尿細管アポトーシスも ALA 投与により有意に改善した。（結論）ALA は腎臓の TGF- $\beta$ 1 の産生を抑え、腎障害を抑制する。UUO 治療における新しい薬物治療となる可能性が示された。

**研究成果の概要（英文）：Introduction and Objective:** We focused on the effect of alpha-lipoic acid (ALA) on renal injury caused by unilateral ureteral obstruction (UUO). Reactive oxygen species (ROS) is reportedly generated in UUO and oxidative stress caused by ROS results in irreversible renal damage including interstitial fibrosis and tubular apoptosis. Thus agents that decrease oxidative stress are potential effective tools for the treatment of UUO. ALA is an antioxidant and its renoprotective effects have been shown in several renal disease models such as glomeronephritis and diabetic nephropathy. The present study was undertaken to evaluate the effects of ALA on mediator of renal injury, TGF- $\beta$ 1, and parameters of renal injury in a rat UUO model.

**Methods:** Two groups of Sprague-Dawley rats were subject to left UUO. Group 1: control (oral administration of 0.5% carboxymethyl cellulose beginning 1 days prior to UUO and continuing throughout study, n=10). Group 2: ALA treatment (oral administration of ALA in 0.5% carboxymethyl cellulose beginning 1 days prior to UUO and continuing throughout study, n=10). Kidneys were harvested at day 14 after UUO. The following was examined: interstitial fibrosis, point counting of Masson's trichrome-stained slides and fibroblast specific protein (FSP) immunostaining; macrophage infiltration, ED-1 immunostaining; apoptosis, ssDNA immunostaining; TGF- $\beta$ 1, ELISA.

**Results:** Interstitial fibrosis in obstructed kidney was significantly decreased in ALA group compared to control group (See table). Tissue TGF- $\beta$  levels were significantly lower in ALA group compared to control group (See table), suggesting that the decline in TGF- $\beta$  level in the kidney was one of causes for the improvement of renal injury by ALA treatment. Apoptotic cells in obstructed kidney were significantly decreased by ALA treatment. In contrast, there was no significant difference in the number of infiltrated macrophage between control and ALA group.

**Conclusions:** Antioxidant,  $\alpha$ -lipoic acid, decreases tissue TGF- $\beta$  and improved tubular apoptosis and renal fibrosis

but not macrophage infiltration in UUO. Alfa-lipoic acid may be a clinically useful agent for the treatment of UUO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
2012年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,400,000		3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：腎臓

## 1. 研究開始当初の背景

閉塞性腎症(UUO)は尿管が閉塞することにより起こる腎臓の機能的、器質的変化を総称した病態である。尿管結石、泌尿器科癌などの様々な原因により起こり、臨床の場で非常に多く遭遇する病態である。尿管が閉塞すると急性期には腎盂内圧の上昇とともに、腎血流の減少とGFRの低下が起こる。閉塞が持続すると尿細管腔の拡張が起こり、尿細管内圧の上昇というストレス下におかれた尿細管細胞はアポトーシスに陥り、また尿細管や炎症細胞から放出されたTGF- $\beta$ などのメディエーターの上昇により腎臓の間質には線維化が起こる。尿細管の萎縮と間質の線維化がさらに進むと腎機能の喪失は不可逆的なものとなる。このため腎障害を抑制し機能するネフロンを温存し、腎機能の廃絶を防ぐために何らかの治療が必要になる。現在、UUOに対して、臨床応用されている薬剤は無く、有用な治療法の開発、導入が急務である。UUOによる腎機能の不可逆的喪失をできるだけ少なくすることは、患者の慢性腎不全への移行、さらには透析導入にいたる患者の数を減らす可能性があり大いに意義がある。

UUO治療におけるこれまでの薬理学的アプローチとして、基礎研究においてACE

inhibitor、angiotensin II receptor blocker (ARB)、抗TGF-beta抗体、Cox-2 inhibitor、NF-kappa-B inhibitor、L-arginine (Ito K. J Urol. 171: 926, 2004) (Ito K. Kiney Int. 68(2), 515, 2004)などが使用され、動物モデルでも有用性が確認されてきた。さらに我々はUUOにおける尿細管アポトーシスや間質線維化を抑制するために新たな治療法の試みを行ってきた。閉塞性腎症モデルや閉塞解除後モデルにおける一酸化窒素(NO)の役割を過去に検討し、NOの基質であるL-arginineを用いてNOの腎機能温存効果、腎障害抑制効果を証明してきた (Ito K et al. J Urol. 171: 926, 2004) (Ito K et al. Kidney Int. 68, 515, 2004)。またNO合成酵素であるiNOS遺伝子を腎臓に遺伝子導入を行うことにより、閉塞性腎症における遺伝子治療の可能性を示すとともに、iNOS遺伝子導入による閉塞性腎症急性期の腎機能改善効果を証明した(Ito K, et al. Kidney Int 66, 1365, 2004)。ACE inhibitorやARBは高血圧性腎症や慢性腎炎などで臨床的にすでに使用されており、腎障害の進行を抑制する作用が臨床的に確認されている。しかし、これらの薬剤を投与しても腎障害をもつ患者の腎機能は徐々に悪化するケースが多く、いずれは腎機能の廃絶し、透析が導入されているのが現状である。さらに有用な薬物治療の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

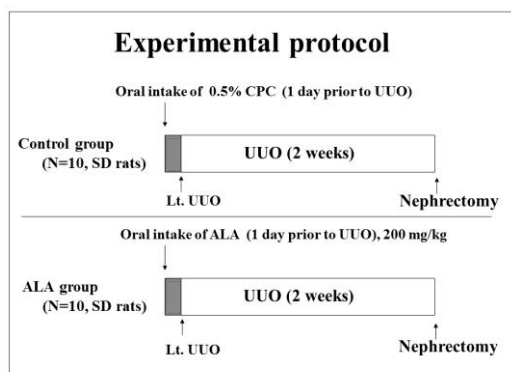
今回我々は、ALAに注目し、新しい閉塞性腎症に対する薬物治療の可能性について検討することを目的とした。ALAは抗酸化物質であり、内服できるという点で臨床応用しやすい。現在、市販もされておりその

経口投与の安全性も確認されている。ALA は抗酸化作用により、angiotensin II induced の腎障害の改善効果が証明されており、閉塞性腎症の腎障害に対しても効果がある可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### ラット閉塞性腎症モデルの作成

SD ラット(250~300 グラム)を麻酔下に腹部正中切開で開腹し、左腎および左尿管を確認、尿管を 3-0 シルクで 2 重に結紮する。その後、閉腹し麻酔からの覚醒を待った。



#### ALA の投与およびそのスケジュール

ALA 投与群とコントロール群(C群)をそれぞれ 10 頭ずつ用いた。ALA の投与に関しては 200mg/kg で投与する。C 群に関しては 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC)を ALA と同様の量(ml)を内服する。ALA および CMC は尿管の閉塞の 1 日前か経口投与を開始し、翌日に閉塞性腎症を作成する。閉塞性腎症作成後 14 日目に再び開腹し、両側の腎臓を切除する。腎臓の摘除標本に関してはパラフィン包埋切片の作成とアッセイ用の組織の保存 (-80°C) を行った。

#### 腎臓の重量の測定

腎臓の摘出後、腎周囲の組織を切除し、腎盂から生理食塩水を注入し洗浄する。その後長軸に沿って、外側から切開し腎臓を

二分割する。ガーゼで水分を吸収後、腎臓の重量を測定する(wet weight)。

#### 組織中の TGF-β1 の測定

TGF-β1 の測定に関しては ELISA キット(R&D systems, Minneapolis, MN)を用いた。TGF-β1 を活性型に変換するために腎組織を 1N HCl でホモジナイズした後 1.2N NaOH/0.5M HEPES で中和した。アッセイは、説明書に従って行われた。

#### 免疫染色

4μmのパラフィン包埋切片を作成し、キシレンにより脱パラフィン化を行った。その後エタノールで処理し、抗原の賦活化を high pH target retrieval solution (Dako, Carpinteria, California) で行った。内因性のペルオキシダーゼ活性をブロックし、10% 正常ヤギ血清で60 分処理後、1次抗体をovernight で処理した。Simple Stain Max PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan) で処理し、DABで発色を行った。

#### 腎線維化の評価

腎間質線維化は Masson Trichrome 染色および FSP-1 染色(anti-human S100A4, Dako)で検討した。Masson Trichrome 染色の評価は point counting method (強拡大視野で 100 マス中に青色に染色される部分をカウント) で評価した。さらに FSP-1 染色で線維芽細胞を評価した。白血球も同様に染色されるため紡錘形細胞のみを計測した。

#### 尿細管アポトーシスの評価

尿細管アポトーシスの評価は single strand DNA(ssDNA)染色を用いて行った。一次抗体は抗 ssDNA 抗体(DAKO)を用いた。強拡大視野におけるアポトーシスの細胞数を ALA 投与群と C 群で比較した。

### 炎症細胞浸潤の評価

炎症性細胞浸潤は ED-1 染色(抗 ED-1 抗体, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California)により評価した。強拡大視野におけるマクロファージの数を計測した。

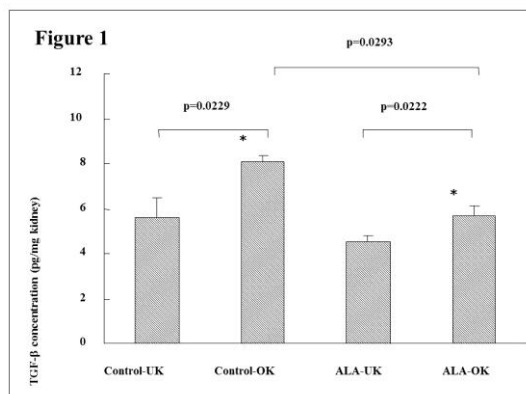
## 4. 研究成果

### 腎臓の重量

C 群と ALA 投与群の腎臓の重量(両側腎)の測定を行った。C 群においても ALA 投与群においても、閉塞腎の重量が対側腎と比較して有意に重量が高かった( $p < 0.05$ )。また閉塞腎において、ALA 投与群と C 群で腎重量に有意差はなかった( $p = 0.659$ )。ALA の投与は閉塞腎の重量に影響を与えなかった。

### 腎組織の TGF- $\beta$ 1 濃度

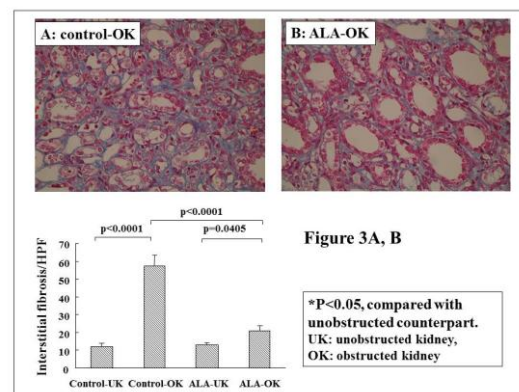
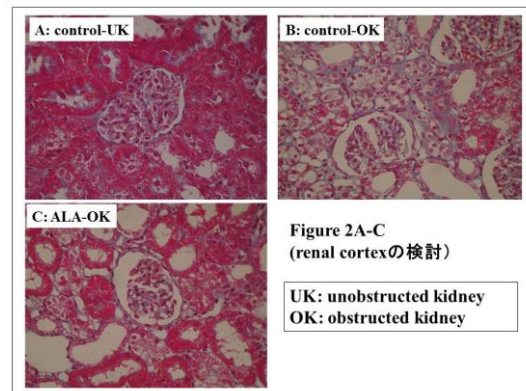
C 群と ALA 投与群いずれにおいても、閉塞腎において対側腎と比較して組織 TGF- $\beta$ 1 濃度は有意に上昇していた(Figure 1)。閉塞腎の組織を両群間で比較すると、組織 TGF- $\beta$ 1 濃度は ALA 投与群( $5.7 \pm 0.4$  pmol/mg)において C 群( $8.1 \pm 0.3$  pmol/mg)と比較し有意に低下を認めた ( $p = 0.0293$ )。



### 腎間質の線維化

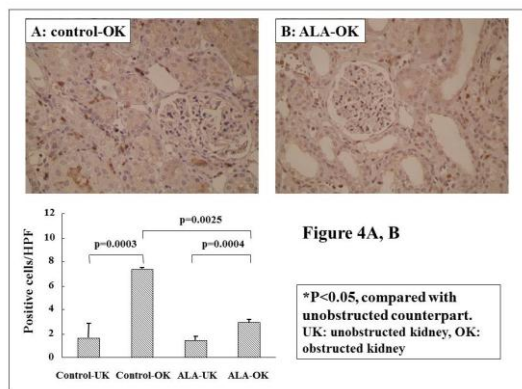
コラーゲンの沈着を

Masson-trichrome 染色で検討した。腎皮質、髄質いずれにおいても、閉塞腎のコラーゲン沈着が有意に増加した(Figure 2 および 3)。コントロール群と ALA 投与群との比較では、非閉塞腎ではコラーゲンの沈着に有意差はなかった (interstitial volume= $12.5 \pm 1.7$  vs.  $13.1 \pm 1.3$ ,  $p > 0.05$ )。一方、閉塞腎においては ALA 投与群において、コラーゲンの沈着は C 群と比較して有意に抑制された (interstitial volume= $57.4 \pm 6.0$  vs.  $13.1 \pm 1.3$ ,  $p < 0.0001$ )。



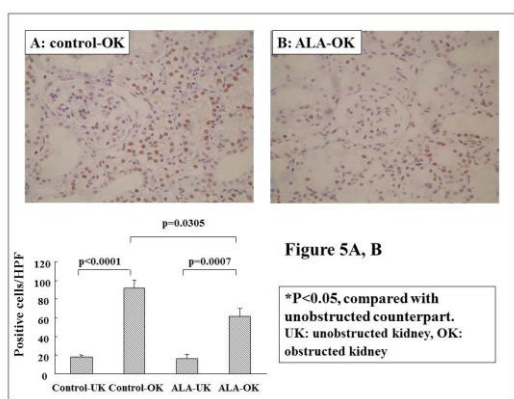
さらに FSP-1 染色で、腎間質の線維芽細胞数を定量した (Figure 4)。C 群と ALA 投与群との比較では、非閉塞腎では線維芽細胞数に有意差はなかった (control vs. ALA= $1.6 \pm 1.2$  vs.  $1.4 \pm 0.3$ )。一方、閉塞腎では ALA 投与により線維芽細胞数は有意に抑制された (control vs. ALA= $7.3 \pm 0.2$  vs.  $2.9 \pm 0.2$  cells/HPF,  $p = 0.0025$ )。





### ALA の投与が尿管アポトーシスに与える影響

ssDNA 染色を用いて、尿管細胞のアポトーシスの定量を行った(Figure 5)。C 群と ALA 投与群いずれにおいても、閉塞腎で尿管アポトーシスは有意に増加した(p<0.05)。C 群と ALA 投与群との比較では、非閉塞腎では尿管細胞のアポトーシスの数に有意差はなかった(control vs. ALA=17.9±2.5 vs. 16.2±4.7 apoptotic cells/HPF)。一方、閉塞腎では ALA 投与により尿管アポトーシスはC 群と比較して有意に抑制された(control vs. ALA=91.8±8.7 vs. 61.5±8.8 apoptotic cells/HPF, p=0.0305)。

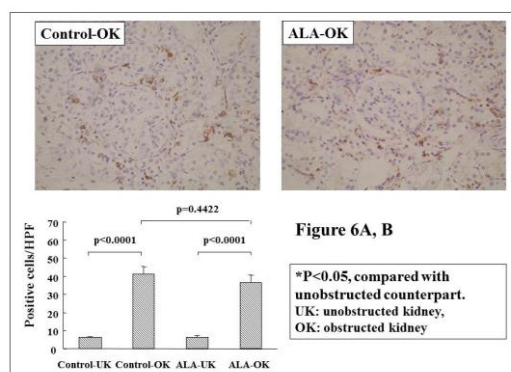


### ALA の投与が炎症性細胞浸潤に与える影響

ED-1 染色を用いて、浸潤するマクロファージの定量を行った(Figure 6)。C 群、ALA 投与群いずれも、閉塞腎では非閉塞腎と比較し尿管アポトーシスは有意に増加した(p<0.0001)。C 群と ALA 投与群の比較では、

非閉塞腎では浸潤するマクロファージ数に有意差はなかった(control vs. ALA=6.4±0.5 vs. 6.4±0.9)。閉塞腎においても、マクロファージ数はC 群と ALA 投与群で有意差はなかった(control vs. ALA=41.2±4.2 vs. 36.3±4.6, p=0.4422)。

ALA の投与は間質線維化を抑制し尿管アポトーシスを抑制するが、炎症細胞浸潤には影響を与えなかった。



### 結論

ラット閉塞性腎症モデルにおいて ALA の経口投与は腎組織の TGF-β1 濃度を低下させ、間質線維化と尿管アポトーシスを抑制した。ALA は閉塞性腎症に対する新しい薬物治療となりうると考えられた。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Ito K, Yoshii H et al. Adrenomedullin increases renal nitric oxide production and ameliorates renal injury in mice with unilateral ureteral obstruction. The Journal of Urology 183 : 1630-1635, 2010.
2. STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for renal cell carcinoma. Horiguchi A, Asano T, Kuroda K, Sato A, Asakuma J, Ito K, et al. Br J Cancer 102 : pp.1592-9, 2010.
3. Combination of suberoylanilide hydroxamic acid and ritonavir is effective against renal cancer cells. Akinori S, Asano T, Horiguchi A, Ito K, et al. Urology 76, e7-e13, 2010.
4. Antitumor effect of suberoylanilide

- hydroxamic acid and topotecan in renal cancer cells. Sato A, Asano T, Horiguchi A, Ito K, et al. *Oncology Research* 19, 217-223, 2010.
5. Ito K, Yoshii H, et al. Impact of postoperative C-reactive protein level on recurrence and prognosis in patients with NOM0 clear cell renal cell carcinoma. *J Urol.* 186: pp. 430-435, 2011.
  6. Sato A, Asano T, Ito K, Asano T. Ritonavir interacts with bortezomib to enhance protein ubiquitination and histone acetylation synergistically in renal cancer cells. *Urology.* 79:966.e13-21, 2012
  7. Ito K, et al. Impact of increased erythropoietin receptor expression and elevated serum erythropoietin levels on clinicopathological features and prognosis in renal cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 3: pp. 937-944, 2012.
  8. Sato A, Asano T, Ito K, Asano T. Vorinostat and bortezomib synergistically cause ubiquitinated protein accumulation in prostate cancer cells. *J Urol.* 188: pp. 2410-2418, 2012.
  9. Sato A, Asano T, Ito K, Asano T. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin and ritonavir inhibit renal cancer growth by inhibiting the expression of heat shock factor-1. *Int J Oncol.* 2012 Jul;41:46-52.
  10. Kushiya T, Oda T, et al. Alteration in the Phenotype of Macrophages in the Repair of Renal Interstitial Fibrosis in Mice. *Nephrology (Carlton)* 16 : 522-535, 2011.
  11. Higashi K, Oda T, et al. Additive antifibrotic effects of pioglitazone and candesartan on experimental renal fibrosis in mice. *Nephrology* 15: 327-335, 2010.
  12. Yamada M, Oda T, et al. Involvement of epimorphin in the repair of experimental renal fibrosis in mice. *Lab Invest* 90(6): 867-880, 2010.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Ito K, et al. Impact of postoperative C-reactive protein level on recurrence and prognosis in patients with NOM0 renal cell carcinoma. The 105th Am Urol Assoc. meeting, May, 2010.
  2. Ito K, et al. Impact of running suture between the rhabdosphincter and Denonvilliers' fascia on recovery of continence after laparoscopic radical prostatectomy (LRP). The 29th World Congress of Endourology, Nov., 2011.
  3. Ito K, et al. Risk factors for recurrence in patients with pathological T1a renal cell carcinoma The 32th Congress of the

- International Society of Urology, 2011.
4. Yamada M, Oda T, et al: Time Sequence of Protease Profile after the Release of Unilateral Ureteral Obstruction in Mice. 2010 American Society of Nephrology Annual Meeting, Colorad, USA, 2010.11.16-2010.11.21.
  5. 東 桂史、尾田 高志、ほか: 片側尿管閉塞マウス腎への pioglitazone 投与によるマクロファージの phenotype 変化, 第 54 回日本腎臓学会学術総会, 横浜. 2011.6.15-2011.6.17
  6. 山田 宗治、尾田 高志、ほか: 片側尿管閉塞 (UUO) 解除モデルにおけるプロテアーゼの経時的変化の検討, 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 神戸, 2010.6.16-2010.6.18
  7. 山田 宗治、山口 郁代、Bie Nga Tchao、Burger Megan、Nicosia Roberto、東 桂史、櫛山 武俊、山本 浩仁郎、尾田 高志、ほか: 片側尿管閉塞 (UUO) モデル腎における peritubular capillary (PTC) の構造的・機能的変化の検討, 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 神戸, 2010.6.16-2010.6.18
  8. 東 桂史、尾田 高志、ほか: 片側尿管結紮(UUO)マウス腎臓間質における、ピオグリタゾンとカンデサルタン併用の相加的な抗線維化効果, 第 33 回日本高血圧学会総会, 福岡, 2010. 10.15-2010.10.17
  9. 東 桂史、尾田 高志、ほか: pioglitazone と candesartan の併用による、片側尿管結紮(UUO)マウスでの抗線維化効果の検討, 第 14 回腎臓間質障害研究会, 東京, 2010.9.11

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤敬一 (ITO KEIICHI)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号 : 90260091

### (2)研究分担者

尾田高志 (ODA TAKASHI)

防衛医科大学校・病院・講師

研究者番号 : 90531187