

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592380

研究課題名(和文) 前虚血操作の虚血再灌流障害に対する腎保護作用と remote 作用の検討

研究課題名(英文) A study to examine the renal protective effect and the remote effect of ischemic preconditioning for renal ischemia/reperfusion injury

研究代表者

井崎 博文 (IZAKI, HIROFUMI)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：00335811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎虚血再灌流障害モデルを作成し、ischemic preconditioningの有効性とその背景を明らかにすることを目的とし研究を行った。このモデルにより尿細管障害の程度はpreconditioningを行うことにより有意に改善することが分かった。

網羅的遺伝子発現解析を行った結果、虚血再灌流後の組織障害に関与する因子としてPICAに着目した。HK2細胞を低酸素状態におくとこの因子がmRNAレベルで発現上昇していることが確認できた。この分子はATF4などの小胞体ストレスに関わる分子を制御することが示されている。この結果に基づき、小胞体ストレスとこの遺伝子の関連について現在解析中である。

研究成果の概要(英文)：We made a rat model of renal ischemia/reperfusion and examined the effectiveness of ischemic preconditioning for preventing renal ischemia/reperfusion injury. We also sought to reveal the underlying mechanism of ischemic preconditioning.

We found that ischemic preconditioning could efficiently reduce the damage for uriniferous tubules by renal ischemia/reperfusion. We focused on Preconditioning inducible factor-A (PICA) as a factor that is related to the damage of uriniferous tubules after renal ischemia/reperfusion according to the results of comprehensive gene expression analyses with DNA microarray. We found that the expression of this gene was conspicuously elevated at mRNA and protein level in HK2 cells when the cells were exposed to the hypoxic condition. As this gene was shown to regulate the molecules that are related to endoplasmic reticulum stress, we are in progress for analyzing the relationship of this gene and endoplasmic reticulum stress.

研究分野：医歯薬学

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：腎虚血再灌流障害 ischemic preconditioning remote organ ischemic 腹腔鏡下腎部分切除 心筋保護作用

### 1. 研究開始当初の背景

泌尿器科領域における腹腔鏡下手術の進歩は著しく、種々の泌尿器科疾患に対して腹腔鏡下手術が取り入れられるようになってきた。近年、画像診断の進歩により、これまで発見されなかった無症状の腎癌が発見されるようになり、現在では、腎癌全体の38%が腫瘍径4cm未満(T1a)である。T1aの腎癌症例に対する腎部分切除の5年癌特異的生存率は97.8-100%、再発率は0.8-1.6%と根治的腎摘除術と比較して遜色ない。さらに術前に腎機能障害の危険因子が同等であった患者に対し根治的腎摘除術と腎部分切除を施行後、10年間の腎機能を比較した結果、根治的腎摘除術で有意に腎機能障害を引き起こす可能性が高く、腎部分切除は長期の腎機能保持に有用であったとの報告がなされている。これらのことから、腎部分切除術は根治的腎摘除術と同等の制癌性があり、腎機能温存の面では優れており、その低侵襲性からも今後腹腔鏡下腎部分切除術が施行される症例が増えていくと予想される。一方、腹腔鏡下腎部分切除術は開腹手術に比べ、阻血時間が長く、術中合併症が多く、術後の泌尿器合併症も多い。我々は阻血時間延長に伴う虚血再灌流障害をいかに克服するかで、腹腔鏡下腎部分切除術での腎機能保護及び術後合併症の軽減を図られるものと考え、虚血再灌流障害を軽減する研究を行う事とした。虚血再灌流障害を軽減する手段として、比較的短時間の前虚血操作を行う ischemic preconditioning(IP)が近年注目されている。我々は、腹腔鏡下腎部分切除術での平均阻血時間である40分前後を虚血時間とし、今まで欧米でも報告のみられない腎の冷却も加えた最も簡便で有効なIPの方法を見出す研究を行うものである。

虚血再灌流障害を軽減し、細胞保護に重要な役割を果たしている酵素・蛋白として注目されているのは、Nitric Oxide(NO)や細胞が低

酸素状態に陥ると酸素感受性エレメントを介して発現する転写因子の hypoxia inducible factor(HIF) 1の target gene である Erythropoietin(EPO)、VEGF が挙げられる。特に腎虚血再灌流障害は、活性酸素が組織内の微小血管内皮細胞に障害を与え、血管の狭小化や閉塞が起こることによりもたらされるため、VEGFの血管内皮細胞の増殖をはじめとした血管新生過程の促進、血管透過性の亢進作用による血管新生は、虚血再灌流障害の軽減に重要な役割を果たす可能性がある。我々は、VEGFだけでなく、腎保護作用の背景にある分子機構にも注目し、ラット in vivo モデルを用いて、各条件下でのPC早期と遅延期の腎保護作用を比較し、最も有効で短時間でのPCの方法を見出す研究を行うものである。

さらに、ある臓器に preconditioning を行い、それにより preconditioning を受けていない臓器が虚血に対して抵抗性を獲得する remote organ IP が、心筋・脳・肝などで報告されている。本研究では、腎動脈のIPを行い、remote organ IPによる心筋保護作用の確認と最も有効で短時間のPCの方法を見つけることも目指す。これらより、腎部分切除時の阻血時間延長に伴う虚血再灌流障害をいかに克服するかを腎の ischemic preconditioning に注目し、in vivo, in vitro で検討し、さらに腎による remote organ ischemic preconditioning による心筋保護作用の臨床応用を最終目標としたい。

### 2. 研究の目的

阻血に伴う腎機能の低下を最小限にすることを目的として、ischemic preconditioning の腎保護作用とその機序の解明、および心臓への remote 作用の解明を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

腎虚血再灌流障害モデル作成し、腎虚血再灌

流障害に対する ischemic preconditioning の至適設定条件の検索を行った。このモデルから、血液、腎、心臓などの臓器を摘出し解析に用いた。まず、腎組織を使用し、網羅的遺伝子発現解析を行い、preconditioning が腎機能保護に関わる機序についての解析を行った。

#### 4. 研究成果

腎機能障害の高度であったモデルにおいては、組織全体の障害の程度には差は認めないものの、摘出腎での尿細管壊死の所見も高度であり、相関が認められた。一方で、ischemic preconditioning による血液学的検査の腎機能障害および組織障害の程度はコントロール群と比較して低減される傾向はみられるものの有意差が認めなかった。このため preconditioning の有無による腎機能障害の程度を組織切片の尿細管障害をスコア化することにより評価した。その結果、尿細管障害の程度は preconditioning を行うことにより有意に改善することが分かった。

続いて、この組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、虚血再灌流後の組織障害に関与する可能性のある因子として

Preconditioning inducible factor-A (PICA)に着目した。虚血再灌流にこの因子が関わることを示すためにヒト正常尿細管由来細胞である HK2 を用いて in vitro での実験を行った。HK2 細胞を低酸素状態におくとこの因子が mRNA レベルで発現上昇していることが確認できた。この Preconditioning inducible factor-A (PICA)は ATF4 などの小胞体ストレスに関わる分子を制御することが示されている。

今後はこの Preconditioning inducible factor-A (PICA)と HIF-1 との関係の解明、下流分子の制御機構の解明を通して、虚血再灌流後の腎尿細管障害からの再生メカニズムに関わる重要な遺伝子であるかどうか、また、この因子が誘導される背景についても解

析を行い、preconditioning の remote 効果についても検討していく予定である。

#### 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7件)

Tomoteru Kishimoto, Tomoya Fukawa, Kuniyoshi Yamaguchi, Yasuyo Yamamoto, Hiroyoshi Nakatsuji, Hirofumi Izaki, Masayuki Takahashi, Tomoharu Fukumori And Hiro-omi Kanayama

Mineralocorticoid receptor expression in human penile corpus cavernosum  
The Journal of Medical Investigation  
(査読有) 60・1,2 2013 21-26

<http://dx.doi.org/10.2152/jmi.60.21>  
Originals

MASAYUKI TAKAHASHI, RUMI KAWABATA  
AKIRA KAWANO, TOSHIHIDE MURAKAMI  
YASUSHI SUTOU, TOHRU INAI, SEIJI  
AKAZAWA, TAKUMI HAMAOKA, HIDEKI  
HAYASHI, TOKMOYA FUKAWA, MASAHIKO  
TAKEMURA, YASUYO YAMAMOTO, KUNIYOSHI  
YAMAGUCHI, HIROFUMI IZAKI, TOMO HARU  
FUKUMORI and HIROOMI KANAYAMA

Substitution of anti-androgens and tegafur-uracil combination therapy for castration-resistant prostate cancer: Result of a multi-center randomized phase study

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY  
(査読有) 43・2013 713-720  
10.3892/ijo.2013.1997

Tomoya Fukawa, Masaya Ono, Taisuke Matsuo, Hisanori Uehara, Tsuneharu Miki, Yusuke Nakamura, Hiro-omi Kanayama, and Toyomasa Katagiri  
DDX31 Regulates the p53-HDM2 Pathway and rRNA Gene Transcription through

Its Interaction with NPM1 in Renal Cell Carcinomas  
AACR (査読有) 72(22)2012 5867-5877  
10.1158/0008-5472.CAN-12-1645  
Takahashi Hisaya, Hiroyoshi Nakathuji,  
Masayuki Takahashi, Shiirevnyamba  
Avirmed, Tomoya Fukawa, Masahiko  
Takemura, Tomoharu Fukumori, and  
Hiroomi Kanayama  
Up-regulation of Plakophilin-2 and  
Down-regulation of Plakophilin-3  
are Correlated With Invasiveness  
in Bladder Cancer  
UROLOGY(査読有)79・1 2012  
240e1-240e8  
[http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.  
2011.08.049](http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2011.08.049)  
A Shiirevnyamba, T Takahashi, H Shan,  
H Ogawa, S Yano, H Kanayama, K Izumi,  
H Uehara  
Enhancement of osteoclastgenic  
activity in osteolytic prostate  
cancer cells by physical contact with  
osteoblasts  
British Journal of Cancer  
(査読有) 104 2011 505-513  
10.1038/sj.bjc.6606070  
Kawabata R, Oie S, Takahashi M,  
Kanayama H, Itoh K  
Hydroxyflutamide enhances cellular  
sensitivity to 5-fluorouracil by  
suppressing thymidylate synthase  
expression in bicalutamide-resistant  
human prostate cancer cells  
International Journal of Oncology  
(査読有) 38 2011 665-676  
10.3892/ijo.2011.909  
Kawabata R, Oie S, Takahashi M, Kanayama  
H, Oka T, Itoh K  
Up-regulation of insulin-like growth  
factor-binding protein 3 by

5-fluorouracil(5-FU) leads to the  
potent anti-proliferative effect of  
androgen deprivation therapy combined  
with 5-FU in human prostate cancer cell  
lines  
International Journal of Oncology  
(査読有) 38 2011 1489-1500  
10.3892/ijo.2011.991

[学会発表](計13件)

大豆本圭, 中達弘能, Tsogt-ochir Dondoo,  
小森政嗣, 布川朋也, 武村政彦, 高橋久弥  
福森知治, 高橋正幸, 金山博臣  
膀胱癌浸潤における HGF-MET signaling  
in bladder cancer invasiveness  
泌尿器科分子・細胞研究会 2014.3.14  
ホテルメトロポリタン山形・霞城セント  
ラル

(山形県)

Dondoo Tsogt-ochir, 福森知治, 大豆本圭  
小森政嗣, 布川朋也, 武村政彦, 高橋久弥  
井崎博文, 高橋正幸, 金山博臣  
前立腺癌における Galectin-3 in  
prostate cancer  
泌尿器科分子・細胞研究会 2014.3.14  
ホテルメトロポリタン山形・霞城セント  
ラル

(山形県)

大豆本圭, 中達弘能, 布川朋也, 高橋正幸  
福森知治, 金山博臣

膀胱癌浸潤における HGF の役割とその分子  
機構の解明

日本癌学会学術総会 2013.10.3

パシフィコ横浜(神奈川県)

Tomoya Fukawa, Taisuke Matsuo, Masahiko  
Takemura, Yasuyo Yamamoto, Kunihisa  
Yamaguchi, Hisaya Takahashi, hirofumi  
Izaki, Masayuki Takahashi, Tomoharu  
Fukumori, Toyomasa Katagiri, Hiro-omi  
Kanayama

DDX31 regulates p53 tumor suppressor activity through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas  
2013.5.4 Convention Center  
(SANDIEGO,USA)

高橋久弥,高橋正幸,小森政嗣,香川純一郎,仙崎智一,布川朋也,武村政彦,山本恭代,山口邦久,中達弘能,井崎博文,福森知治,金山博臣

膀胱癌における Plakophilin-2 と Plakophilin-3 の関与

日本泌尿器科学会総会 2013.4.25

ロイトン札幌・札幌市教育文化会館・札幌プリンスホテル国際館パミール(北海道)

Hiroyoshi nakatsuji, Masayuki Takahashi, Masahiko Takemura, Yasuyo Yamamoto, Hirofumi Izaki, Tomoharu Fukumori, Hiro-omi Kanayama

The role of Actinin-4 in Bladder Cancer Metastasis

SIU 2011.10.16 ICC berlin  
(berlin,Germany)

布川朋也,尾野雅哉,上原久典,松尾泰佑,中村祐輔,金山博臣,片桐豊雅

Identification and characterization of RCCDH as a novel molecular target for clear renal cell carcinoma.

日本癌学会学術総会 2011.10.3

名古屋コンgresセンター(愛知県)

中達弘能,高橋正幸,アビルメドシーレンヤンバ,布川朋也,福森知治,金山博臣

The involvement of TLR4 on the increase of invasion and proliferation ability in bladder cancer treated with HGF

日本癌学会学術総会 2011.10.3

名古屋コンgresセンター(愛知県)

布川朋也,松尾泰祐,中村祐輔,金山博臣,片桐豊雅

腎細胞癌新規分子標的遺伝子 RCCDP の同定およびその機能解析

日本がん分子標的治療学会 2011.6.22

ホテル日航東京(東京都)

S Avirmed,Uehara H,Nakatsiji H, Fukawa T, Takemura M, Yamamoto Y, Yamaguchi K, Kishimoto T, Izaki H, Takahashi M, Fukumori T, Kanayama H

Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts

AUA 2011.5.14 Convention Center  
(Washington DC,USA)

アビルメド・シーレンヤンバ,中達弘能,津田恵,布川朋也,武村政彦,山本恭代,山口邦久,岸本大輝,井崎博文,高橋正幸,福森知治,金山博臣

Participation of N-caderin in bladder cancer

日本泌尿器科学会総会 2011.4.21

名古屋国際会議場(愛知県)

中達弘能,シーレンヤンバ アビルメド,津田恵,布川朋也,武村政彦,山本恭代,山口邦久,岸本大輝,井崎博文,高橋正幸,福森知治,金山博臣

HGFによる膀胱がん浸潤亢進における Toll like receptor 4 (TLR4) の関与

日本泌尿器科学会総会 2011.4.21

名古屋国際会議場(愛知県)

S Avirmed,Uehara H,Nakatsiji H,Fukawa T,Takemura M,Yamamoto Y,Yamaguchi K Kishimoto T,Izaki H,Takahashi M,Fukumori T,Kanayama H

MicroRNAs are reproducibly deregulated in prostate carcinoma and are potential regulators of signal transduction pathways like PI3-kinase or MAP-kinase pathways

EAU 2011.3.18 Centre Vienna  
(Vienna,Austria)

{図書}(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
6. 研究組織  
(1) 研究代表者

井崎 博文 (IZAKI HIROFUMI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：00335811

(2) 研究分担者

金山 博臣 (KANAYAMA HORO-OMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10214446

高橋 正幸 (TAKAHASHI MASAYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：50325255

福森 知治 (FUKUMORI TOMOHARU)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：10314874

中達 弘能 (NAKATSUJI HIROYOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：50437638

(3) 連携研究者  
なし