

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791716

研究課題名(和文) 新規ビタミンE誘導体ETS-GSを用いた腎虚血再灌流障害への治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for renal ischemic-reperfusion injury using ETS-GS, a novel vitamin E

研究代表者

日下 淳也 (Kusaka, Junya)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00567951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：腎虚血再灌流傷害の新規治療法開発を目標に、新規ビタミンE誘導体であるETS-GSを用いて、ラット腎虚血再灌流傷害モデルに対する有効性について検討を行った。生存率や血清中腎機能評価、HE所見、電子顕微鏡所見等にて検討を行い、ETS-GSの投与により虚血再灌流後の腎傷害軽減効果を証明した。また、このメカニズムのETS-GS投与による酸化ストレス抑制効果の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether ETS-GS, a novel vitamin E derivative, had therapeutic effect against renal ischemic-reperfusion injury in rat model. In this study, we found that ETS-GS improved the survival rates, renal dysfunction after renal ischemic-reperfusion, which was also demonstrated by histological evaluation. In addition, our results indicated that the mechanism of improvement effect against renal ischemic-reperfusion injury may be involved in antioxidant effect by ETS-GS.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生

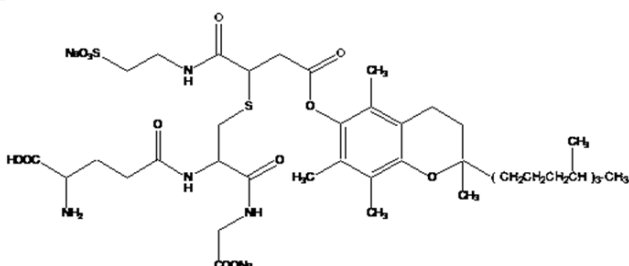
キーワード：腎機能障害 ビタミンE グルタチオン タウリン 酸化ストレス 急性障害

1. 研究開始当初の背景

腎疾患に対する外科治療学の飛躍的な進歩によって、慢性腎不全に対する移植手術の適応が増加しつつある。腎臓は特に血管に富む臓器であるが、移植手術時にはドナー側より臓器を摘出する必要があるため、一時的に腎臓が虚血状態となる。当然、レシピエント側に移植された後には、移植腎の血流を再開（再灌流）するが、再灌流後しばしば重篤な腎障害が発生することがあり、この病態（腎虚血再灌流障害）のメカニズム解明と克服が腎臓移植外科治療における大きな課題である。しかしながら現状では虚血再灌流障害に対して有効な医薬品は少なく新規薬剤の開発が待望されている。

我々は腎虚血再灌流障害の原因として再灌流時に産生されるラジカルに注目し、新規抗酸化物質 ETS-GS ( -L-Glutamyl-S-[2-[[[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltri-decyl)-2H-1-benzopyran-6-yl]oxy]carbonyl]-3-oxo-3-[(2-sulfoethyl)amino]propyl]-L-cysteinylglycine sodium salt ) が腎虚血再灌流障害時のラジカル産生を抑制し、本病態に効果を示すのではないかの仮説をたてた。ETS-GS は抗酸化物質として知られたビタミン E の誘導体である。ビタミン E は油性で水溶性には、リン酸エステル、コハク酸エステルなどの誘導体が知られている。しかし、ビタミン E リン酸エステルは 0.1% 以上の濃度では溶血作用が生ずるため、注射剤としては好ましくない。また、ビタミン E コハク酸エステルのカルシウム塩は結晶性で水に不溶性であり、そのナトリウム塩は水溶性ではあるものの不安定である。このようにビタミン E はその強い抗酸化作用にもかかわらずその物質的不安定性のために薬剤としては問題があった。我々は大分大学医学部麻酔科客員研究員の緒方一美博士と共同でビタミン E に無水マレイン酸を作用させてビタミン E マレイン酸エステルを合成し、これにシステインやグルタチオンを付加させ、水溶性ビタミン E 誘導体として満足できる安定な化合物を合成し、これにマレイン酸残基にアミンやアミノ酸を結合させた ETS-GS の合成に成功した（下図に化学構造式を示す）。ETS-GS は水溶性で安定性がよく、溶血作用もなく、配合禁忌も見当たらない。我々は、これまでに ETS-GS の心虚血再灌流障害に対する劇的な効果に関していくつかの重要な発見を報告している。

ETS-GS



現在までの研究成果から、ETS-GS は心臓以外の臓器における各種臓器障害の治療薬への応用が可能であり、本物質は各種臓器障害に広く応用が可能であると考えた。そこで、本研究では、周術期や急性期治療において難治性疾患の一つである、急性腎不全をターゲットとし、ラット腎虚血再灌流傷モデルを用いた研究を計画し、急性腎障害への治療薬としての応用のための基礎研究を計画した。

2. 研究の目的

腎臓の臓器移植手術において腎虚血再灌流障害は移植直後において最も重大な合併症の一つであるが、発症リスクを低減させる予防薬は存在せずまた発症例に対する適切な治療薬も存在しない。我々は最近新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS が強力な腎保護効果を有し、虚血再灌流による腎障害に対して著しく有効であることを発見した。ETS-GS はビタミン E 誘導体であるが、水溶性でかつ安定であり、これまでの同種誘導体の欠点がみられない。本研究では、培養細胞ならびにラットを用いた毒性実験ならびに薬理作用の分子メカニズムの解明を推進し、新規薬剤としての臨床応用への道を切り開くことを目的とする。

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット(体重 250-300g)を用いて、ラット腎虚血再灌流傷害モデルを作成した。モデル作成には、セボフレンを用いた全身麻酔下に右腎臓を摘出し、そして、左腎臓の腎門部を剖出した後、血管用クリップにて血流を遮断し、その後開放することで作成した。なお、コントロール群として、虚血再灌流を行わない群も作成した。ラットはモデル作成後、無作為に以下の 3 各群に分けた。a) コントロール群・・・全身麻酔下に生理食塩水のみを投与、b) 腎虚血再灌流群・・・腎虚血再灌流を施行し、生理食塩水のみを投与、c) ETS-GS 投与 + 腎虚血再灌流群・・・腎虚血再灌流施行した群で ETS-GS を投与。ETS-GS は 10 mg/kg、静脈内投与し以降 24 時間ごとに投与した。

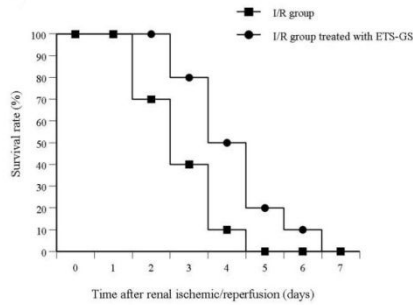
モデル作成後、以下の項目を測定。

- 1) 生存率
- 2) 血液中の BUN 及び Cr
- 3) 腎臓の HE 所見
- 4) 腎臓の電子顕微鏡所見
- 5) 血清中の NOx 量
- 6) 腎臓の MDA 含量

更に、本薬剤の抗酸化能を測定するため、マウスマクロファージ系の RAW264.7 細胞を用いて以下の検討を追加した。

- 7) ROS 除去能の測定

これらの実験を行うことで、急性腎障害における酸化ストレスの影響を明らかにし、最終的には、ETS-GS の急性腎障害における有効



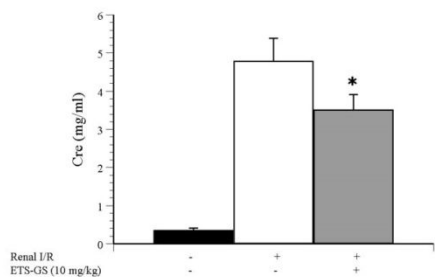
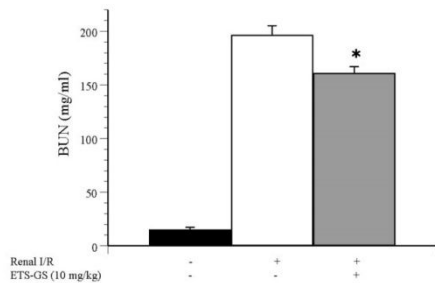
性や有用性を証明することで、本疾患群における新たな治療法の候補としての基礎的研究を行う。

### 3. 結果

以下に、今回の研究により得た結果を順次示す。

#### 1) 生存率

上段に、腎虚血再灌流群を に腎虚血再灌流 + ETS-GS 群を とし、虚血再灌流施行後 7 日

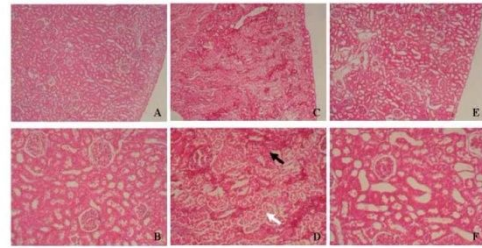


間後における生存率を示す。両群とも、7 日目までにすべて死亡したが、腎虚血再灌流 + ETS-GS 群においてその生存期間を延長することが示された。

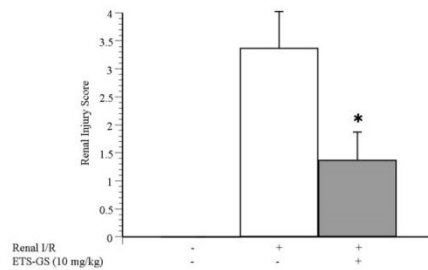
#### 2) 血液中の BUN 及び Cr

各群における、実験開始 24 時間後の血液中 BUN 並びに Cr の値を示す。左から、コントロ

ール群、腎虚血再灌流群、腎虚血再灌流 +

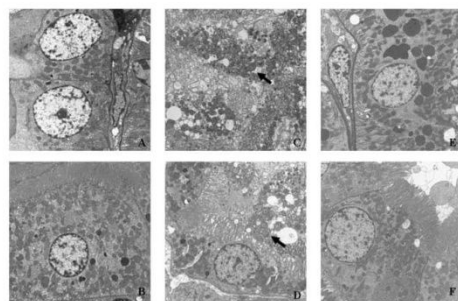


ETS-GS 群を示している。コントロール群に比べて、腎虚血再灌流を施行することで、BUN, Cr 共に有意に上昇したが、ETS-GS を同時投与することで上昇を抑制することが出来た。上段のグラフが、BUN。下段のグラフが Cr を示している。



#### 3) 腎臓の HE 所見

左からコントロール群、腎虚血再灌流群、腎虚血再灌流 + ETS-GS 群の HE 所見を示す。腎虚血再灌流を施行した真ん中の写真では、糸球体の破壊や尿細管の上皮剥離等の急性腎障害の像を示したが、ETS-GS を投与することで、これらの変化を抑制することが出来た。さらに、この像を定量的に Renal Injury Score を用いて評価した結果を下図に示す。

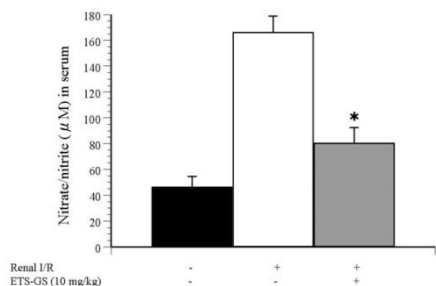


HE 所見にて確認できた内容と同様にコントロール群に比べて、腎虚血再灌流を施行する

ことで、スコアの上昇を認め、ETS-GSを投与することでこの上昇を抑制することが出来た。

#### 4) 腎臓の電子顕微鏡所見

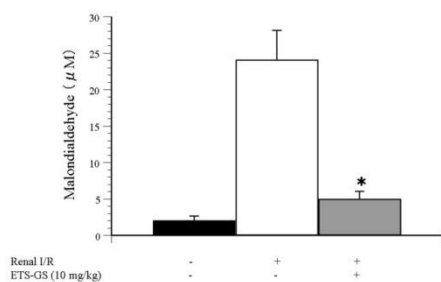
左からコントロール群、腎虚血再灌流群、腎虚血再灌流 + ETS-GS 群の電子顕微鏡所見を示す。腎虚血再灌流を施行した真ん中の写



真では、ミトコンドリア構造の破壊等の細胞破壊像を示したが、ETS-GSを投与することで、これらの変化を抑制することが出来た。

#### 5) 血清中の NOx 量

左からコントロール群、腎虚血再灌流群、腎虚血再灌流 + ETS-GS 群の血清中 NOx 量を示す。腎虚血再灌流により血清中の NOx 量が増加したが、ETS-GS を投与することで抑制することが出来ており、酸化ストレスの抑制を間



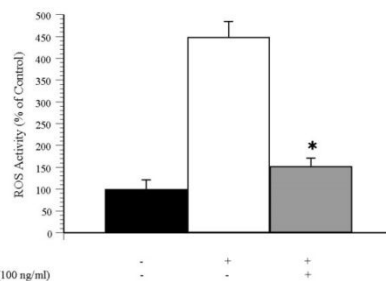
接的に示していると考えられる。

#### 6) 腎臓の MDA 含量

左からコントロール群、腎虚血再灌流群、腎虚血再灌流 + ETS-GS 群の細胞内酸化ストレスを定量化するために MDA 濃度の測定した結果を示す。腎虚血再灌流傷害を施行することで、細胞の酸化ストレスが上昇し、MDA が増加したが、ETS-GS を投与することで、細胞内の酸化ストレスを抑制でき、結果として MDA の変化を抑制することが出来た。

#### 7) ROS 消去能の測定

以上の結果より、ETS-GS による腎虚血再灌流傷害における抗酸化作用を介した腎保護効



果が証明されたが、ETS-GS の抗酸化能の強さを検討するため、細胞培養を用いた活性酸素発生系を用いて、ETS-GS の抗酸化能を測定した。

アンチマイシン A (AMA) を投与し、活性酸素を発生させ、そこに ETS-GS を投与することで有意に活性酸素を抑制できることが示された(次図)。

最後に、新規ビタミン E 誘導体に毒性がないかについて検討を行った。セボフルレン吸入全身麻酔下に前述の薬剤を 1 日 2 回 7 日間連日皮下に投与し、臓器障害が生じるかについて検討を行った。新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS を 10mg/Kg 投与した時、腎障害をはじめとした臓器障害を生じることもなく安全に使用できることを示した。このことは、今回用いた新規ビタミン E 誘導体誘導体は副作用がなく、安全に使用できる薬剤である事を示した。

本年度までの科学研究費を用いた研究を行うことで、当初目標としていた新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS のラット腎虚血再灌流傷害による急性腎不全モデルにおける有効性並びに基礎的なレベルであるが本誘導体の安全性を評価することが出来たと考えている。しかし、今回の研究では、1) 人での有効性に対する検討が行われていない。2) 様々な要因で生じる急性腎障害に対して、今回はあくまでも虚血再灌流傷害のみのデータであり、他のタイプの腎障害に本研究結果が応用できるかの検討が行われていないこと 3) 安全性についても比較的短期の安全性のみであり、長期の安全性や催奇形性などの更なる安全性を検討していくことが求められるなどの研究の限界が存在している。しかしながら本研究結果は、世界で初めて合成された新規ビタミン E 誘導体である ETS-GS の可能性を示した事実は変わらず、今後は、最終目標としている新規薬剤として急性腎傷害という病気と闘っている多くの患者様に届けられるよう、上記点を解決すべく更なる研究を計画している。

この研究計画を実行するために、本研究結果を元に、科学研究費への継続的な応募や厚生労働省科学研究費などの他の研究費へ応募するなどし、研究費を継続して獲得するこ

とで実験を強力に推進していくことで、最終的な目標に早く近づくよう研究・検討を続けていく予定にしている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

日下 淳也 (Kusaka Junya)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00567951

(2)研究分担者