

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592046

研究課題名(和文)腎虚血再灌流障害過程におけるユビキチン・プロテアソーム系の機能解析と臨床応用

研究課題名(英文)Functional analysis and clinical application of the Ubiquitin - Proteasome pathway in the process of renal ischemia reperfusion injury.

研究代表者

本吉 直孝 (MOTOYOSHI, NAOTAKA)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：40375093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈手術手技中に生じる腎虚血再灌流を模倣する為の両側腎動脈遮断によるブタ腎虚血再灌流モデルを確立した。Control群について術前にプロテアソーム阻害薬であるBortezomib 1.3mg/m²を経静脈的に投与した群において各種サンプルを採取した。腎障害度評価は全身血でNGALをELISA法により測定し各尿細管毎に病理学的スコアリングを行い比較評価した。PPAR- α 及びその標的遺伝子であるLXR- α の発現は免疫染色によって定性real-time RT-PCR法により定量評価を行った。下流の転写調節因子であるNF- κ B, AP-1, NFAT, STAT-3に対しても定性・定量評価を行った。

研究成果の概要(英文)：We have established the porcine renal ischemia-reperfusion injury model clamping bilateral renal arteries. The pigs were allocated in the two groups; control and Bortezomib (proteasome inhibitor) administration group. We assessed the degrees of kidney damage and expression of PPAR- α and LXR- α (PPAR- α 's target gene) in the kidney comparing the Bortezomib administration group with control group. Serum Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) was used as an indicator of acute kidney injury. Histopathological changings were evaluated by the pathological scoring. Qualification and quantification of the expression of PPAR- α , LXR- α , and downstream regulatory factors(NF- κ B, AP-1, NFAT and STAT-3) were evaluated by immunohistochemical staining and real-time RT-PCR method.

研究分野：外科系臨床医学、心臓血管外科学

キーワード：腎虚血再灌流障害 腎保護 ユビキチン・プロテアソーム系 PPAR- α LXR- α 心臓大血管外科

1. 研究開始当初の背景

心臓大血管手術における周術期腎障害は、術後の合併症や死亡率上昇に強く関連していることが知られており、いまなおその克服・予防戦略の確立が重要な課題となっている。

心臓大血管周術期腎障害の要因としては大きく2つにまとめられ、1つは人工心肺を使用した体外循環を確立することによる全身性炎症の惹起であり、1つは大動脈の遮断や一時的循環停止を行うことによる腎虚血再灌流障害である。特に、手術侵襲が最も大きい胸部大動脈瘤、胸腹部大動脈瘤等に対する手術においては、術中の腎虚血再灌流障害の影響が最も重大な危険因子とされ、その機序解明と腎保護ストラテジーの確立は治療成績向上と予後改善の為に重要となる。

腎保護効果が期待される新たな物質として、現在糖尿病性腎症治療薬や降圧薬として臨床応用されている nuclear peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) agonists が挙げられ、近年小動物実験系を中心に種々の報告を認める (Ahila Sivarajah et al. Am J Nephrology 2003, Doi et al. Transplantation, 2007)。

そこで著者らの研究室では、周術期腎保護の根幹に PPAR γ を据え、この物質が腎虚血再灌流障害過程でピボットの役割を果たしているとの仮説の下に研究を進めてきた。よりヒトに解剖学的、生理学的に近似したブタを用いた大動物腎虚血再灌流実験系を確立し、再灌流後の時間経過に伴う腎組織での PPAR γ 及びその標的遺伝子 (LXR α) の発現を免疫染色等の方法で解析すると、再灌流直後からその発現は上昇しその後時間経過に伴いさらに上昇することが分かってきた。しかし従来の研究では、通常の PPAR γ の転写活性化やその先の標的遺伝子の発現には一定の時間を要し、この素早い PPAR γ および LXR α の発現を説明する事が難しく、何らかの発現システムが特異的に関与している可能性が考えられた。

その過程で、より短い経過で作用する系であり、かつ腎組織においても確実に存在するものとしてユビキチン・プロテアソーム系が挙げられた。

腎虚血再灌流障害の機序としては、NF- κ B をはじめとする各種転写因子、及びサイトカイン、ケモカイン、接着分子の関与が考えられており、PPAR γ はそれらを抑制する最上流の物質と想定されている。しかしこれらの詳細な機序に関してはいまだ不明である。ユビキチン・プロテアソーム系の関与を明らかにすることで、腎虚血再灌流障害及び PPAR γ の腎保護作用の新たな機序を解明することができ、新たな腎保護治療戦略につなげたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究は腎組織での虚血再灌流障害過程におけるユビキチン・プロテアソーム系の関連とその機能を解析し、さらに新たな腎保護物質と考えられている PPAR γ の作用機序との関連までを明らかとすることで、心臓大血管周術期腎障害の治療応用へ展開することを目的とする。計画している具体的な研究項目としては、①既に確立しているブタを用いた大動物腎虚血再灌流モデルにおいて、プロテアソームインヒビターを投与することによる、PPAR γ を含む各種転写因子発現への影響解析及び腎障害度評価、②PPAR γ ノックアウトマウスを用いた小動物実験系でのユビキチン・プロテアソーム系の影響解析、③プロテアソームインヒビターの臨床応用の可能性の検証、の3つである。

3. 研究の方法

(1) 既に確立している大動物(ブタ)を用いた両側腎動脈遮断による腎虚血再灌流モデルを使用し、プロテアソーム阻害剤である Bortezomib を投与し、腎・虚血再灌流障害の時間的推移に沿って腎組織を採取し PPAR γ 、

その標的遺伝子である LXR- α 、下流の転写調節因子である NF κ -B, AP-1, NFAT, STAT-3 などの発現を免疫染色及び Real-time RT-PCR などの手法で定量化し、コントロール群と比較しどのような変動があるかを解析し、ユビキチン・プロテアソーム系の関連の有無と、作用機序を明らかにする。また同時に病理学的検索により腎障害度を評価し、腎保護作用につき検討する。

(2) PPAR- γ ノックアウトマウスを作製する。続いて小動物を用いた両側腎動脈遮断による腎虚血再灌流モデルを確立し、Bortezomib を投与し、上記と同様に下流の転写調節因子である NF κ -B, AP-1, NFAT, STAT-3 などの発現を免疫染色及び Real-time RT-PCR, Western blot などの手法で定量化する。また同時に病理学的検索により腎障害度を評価し、ユビキチン・プロテアソーム系の作用が PPAR- γ 特異的なものかを評価する。

(3) 1 と同様のモデルで、臨床的に用いている晶質腎保護液を、腎虚血操作中に一定間隔で間歇投与するプロトコールとし、PPAR- γ agonist やプロテアソームインヒビターである Bortezomib を保護液に混和して投与し、その効果を判定する。また、投与間隔や注入圧などを変動させ、腎障害の指標をフィードバックさせ、臨床応用可能な新たな腎保護ストラテジーを創造する。

4. 研究成果

大動物(ブタ)腎虚血再灌流モデルにおける評価

体重約30kgの大動物(ブタ:WL大ヨークシャー×ランドレース)を用いて、大動脈手術手技中に生じる腎虚血再灌流を模倣するための両側腎動脈遮断による腎虚血再灌流モデルを確立した。Control群、PPAR- γ 低用量投与群(LPIO)、PPAR- γ 高用量投与群(HPIO)について、術前にプロテアソームインヒビターである Bortezomib を投与した群において各種サンプルを採取している。Bortezomib の投与量・投与経路については、未治療の多発性骨髄腫に対

するヒトへの用量を参考に、1.3mg/m²を経静脈的に投与するプロトコールとした。腎障害度評価は全身血でNGAL(急性腎障害の早期バイオマーカー)をELISA法により測定し、加えて各尿細管毎に病理学的スコアリングを行い比較評価している。スコアリングは形態変化が軽度のものから0~3に点数付けし、腎皮質浅層及び深層からそれぞれ15尿細管ずつをランダムに選択し、スコア2~3の障害尿細管の割合を出し比較評価する方法とした。HPIO群ではControl群に比して血清NGALが定値となる傾向があり(図1)、病理学的スコアリングによる評価では時間経過に従ってControl群では高スコア(障害度が高い)の割合が上昇するのに対して、PPAR- γ 投与群では上昇が抑制されることが分かった(図2, 3)。

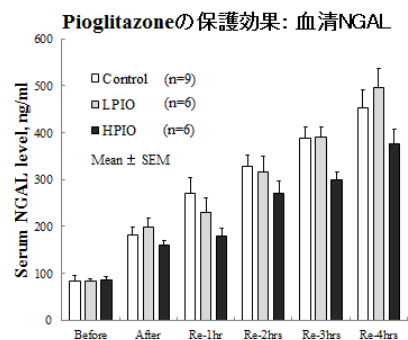


図 1

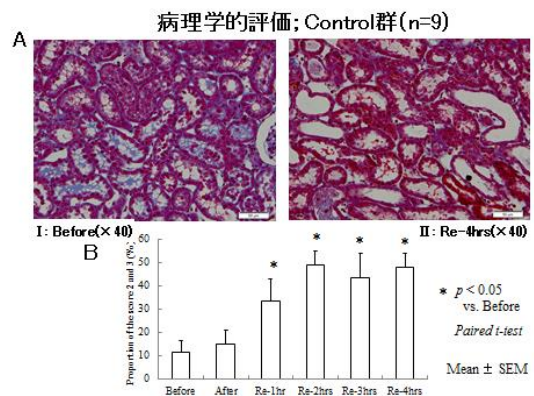


図 2

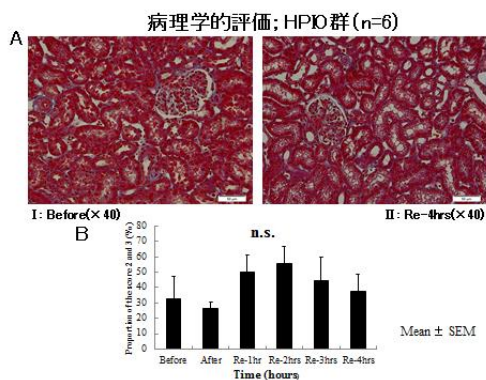


図 3

またPPAR- γ 及びその標的遺伝子であるLXR- α の発現は免疫染色によって定性、real-time RT-PCR法により定量評価を行っている(図4)。

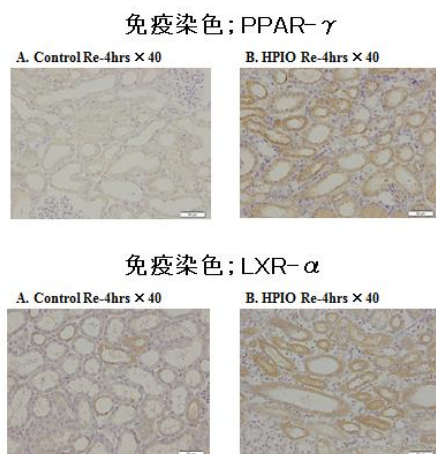


図 4

また、下流の転写調節因子であるNF κ -B, AP-1, NFAT, STAT-3に対するブタに交差する抗体を選定し、局在検討を終え、PPAR- γ 及びLXR- α と同様に定性・定量評価を進めている。これらのBortezomib投与群との比較解析を同時に進めているところである。

小動物腎虚血再灌流モデルにおける評価
PPAR- γ ノックアウトマウス作成のためにPPAR- γ のエキソン領域をLoxp配列で挟んだマウスと全身性Creトランスジェニックマウスを交配・繁殖を試みているが成功至っていない状況である。引き続き小動物実験系の確立を目指すとともに、大動物実験系での比較検討から結論を導き出すことが今後の研究展開に関して重要となる。

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:

出願年月日:

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

本吉 直孝 (MOTOYOSHI NAOTAKA)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 40375093

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

齋木 佳克 (SAIKI YOSHIKATSU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50372298

川本 俊輔 (KAWAMOTO SHUNSUKE)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20400244

阿部 高明 (ABE TAKAAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80292209

中山 啓子 (NAKAYAMA KEIKO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60294972

岡村 将史 (OKAMURA MASASHI)
東北大学・医学系研究科・特任助手
研究者番号：60547397