

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461991

研究課題名(和文) 低出力超音波パルスによる腎尿細管細胞再生促進法の開発

研究課題名(英文) New method of renal tubular regeneration by low intensity pulsed ultrasound.

研究代表者

牛込 秀隆 (Ushigome, Hidetaka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90405283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨再生に有効性のある低出力超音波パルス(low intensity pulsed ultrasound; LIPUS)に着目し、LIPUSの腎尿細管に対する再生促進作用について解析、検討した。in vivoでの病理学的等の実験では、有意に腎尿細管再生促進作用を認めしたが、in vitroでの実験で有意差を認めなかった。in vitroの実験系に問題あり、再度解析を行っており、今後メカニズムの解明につなげる計画である。

研究成果の概要(英文)：Our study investigated if low intensity pulsed ultrasound; LIPUS that was known to be effective for bone regeneration was also effective for renal tubular regeneration. We got the data of renal tubular regeneration by LIPUS histologically and now we are investigating the mechanism of that regeneration function.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎再生

### 1. 研究開始当初の背景

様々な原因で腎障害から腎不全になり、腎障害の程度が注目されがちであるが、腎尿細管細胞の再生速度も非常に重要である。再生が障害よりも遅れると不可逆性に腎不全にいる。現在の治療法は進行性の障害を抑える治療が中心で腎尿細管再生を促す効果的な治療法はない。病原治療とともに新規腎尿細管再生促進法の開発も重要である。

### 2. 研究の目的

骨折、軟骨、靭帯の修復、最近では創傷治癒に対する LIPUS の研究は徐々に行われているが、腎尿細管細胞再生促進に及ぼす LIPUS の効果に関する研究、報告はなく、本研究の学術的な特色・独創的な点として意義があると考えられる。LIPUS が骨細胞や肝細胞の細胞分裂シグナル増幅作用があるため、腎尿細管細胞に対しても同様な作用が考えられ、申請者らの preliminary の実験でも EGF mRNA の増幅を認めた。しかし、臨床応用には、臓器の厚みや腹壁厚を考慮した超音波の条件変更の必要性も考えられる。その場合、新たな超音波機器開発が必要となり、企業と連携した研究が必要となる。実際の臨床の場に応用が可能になれば、急性腎障害に対する新たな治療法となる、非侵襲性、患者さんの場所移動が不要で簡便、機器以外は消耗品が少なく低コストなどの利点があり、臨床の様々な局面で有効に機能する治療法になり得ると考える。

### 3. 研究の方法

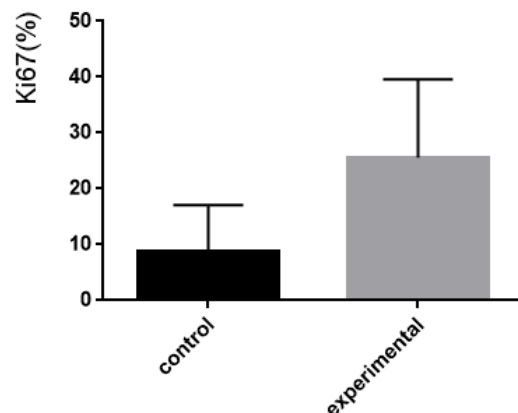
LIPUS の腎尿細管細胞再生に及ぼす影響を調べるためにマウス虚血性急性腎障害モデルを作製し、LIPUS 照射群・非照射群で腎再灌流後の腎組織障害の程度、腎機能、腎尿細管細胞の増殖能、腎尿細管再生増殖因子の発現の 4 項目を中心に比較検討する。LIPUS の再生促進作用の確認と作用している

細胞を特定するため、マウス虚血性急性腎障害モデルから採取した初代培養腎尿細管細胞に対して LIPUS 照射群・非照射群で培養腎尿細管細胞の増殖能、培養液中の腎尿細管再生増殖因子の含有量、腎尿細管再生増殖因子の活性程度の 3 項目を中心に比較検討する。また、LIPUS により強い腎尿細管再生促進を認めた場合、cDNA マイクロアレイ遺伝子発現を各実験群で調べる。

### 4. 研究成果

1) マウス虚血性急性腎障害モデルによる *in vivo* 実験で、再灌流後の腎機能障害の程度を血清学的に検討した結果、LIPUS 非照射群実験群では再灌流後 2 週間で血清尿素窒素およびクレアチニン値が通常時に改善したのに対して LIPUS 照射群では 1 週間で血清尿素窒素およびクレアチニン値の改善が認められた。特に再灌流後 72 時間において実験群で有意に血清尿素窒素およびクレアチニン値の改善に有意差が認められた。

2) 病理組織学的検査における腎尿細管組織 (HE 染色、Ki67 染色) では、再灌流後 72 時間の摘出腎尿細管組織の HE 染色で LIPUS 照射群では腎障害が改善に向かうに分岐時点であるのに対して非照射群は再灌流後 7 日後と優位に早く腎障害の改善分岐に至ることが認められた。また、LIPUS 照射群では非照射群と比較して有意に多く核分裂像を遠位

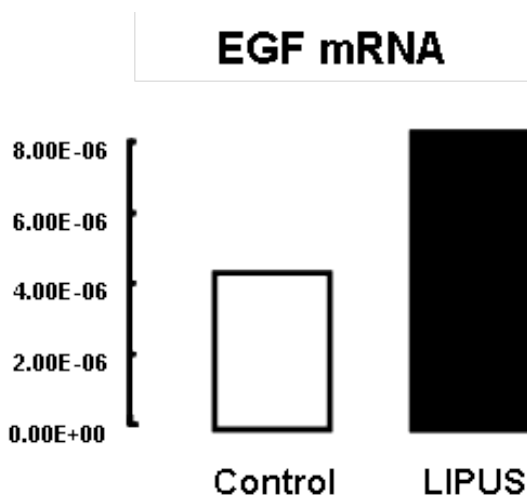


尿管中心に認められた。また、Ki67 染色による摘出尿管組織では、再灌流後 72 時間の病理組織検査で、LIPUS 照射群で非照射群に比して Ki67 値の有意な上昇を尿管中心に認めた。

	control	experimental	P
Ki67	6.2±4.9	19±8.9	0.02

3) 増殖因子、サイトカインの測定検査では、EGF mRNA、HGF、TNF- $\alpha$ 、IL-6 PCR 検査で、摘出尿管組織の一部の mRNA 値は再灌流後 48 時間にて LIPUS 照射群で非照射群に比して有意な上昇を認めた。

今回我々の研究で、LIPUS 照射による尿管細胞再生促進を初めて確認した。その後、LIPUS の再生促進作用の対象細胞の特定を目的としたマウス虚血性急性腎障害モデルから採取した初代培養尿管細胞に対する



LIPUS 照射実験を行ってきたが、細胞採取法や培養法に問題があり、十分に確かな細胞の採取や培養継体ができず、結局、現在でも in vitro による培養尿管細胞に対する LIPUS 照射実験で明確な結果が得ず、そのメカニズムの解明に至っていない。

LIPUS の再生促進作用のメカニズムに関して明確なものはなく、LIPUS のようなパルス状超音波は、温熱作用より非温熱作用を有している。非温熱作用は細胞の拡散率、細胞膜の

浸透性に影響を及ぼし、Microstreaming と Cavitation という2つの現象によりその効果を発揮する。しかし、いずれの現象にかんしても再生促進に関与する明確なメカニズムに言及した論文はなく、また内臓細胞に対する LIPUS 照射に関する研究は見られない。

4) 培養尿管細胞による LIPUS 照射実験が停滞しているため、尿管幹細胞をターゲットにした実験として、チミンアナログである Brdu 注入後のマウス虚血性腎障害モデルに LIPUS 照射実験を行った。再灌流後組織染色すると LIPUS 照射群では対照群と比べて再灌流後 48 時間において有意に Brdu 陽性細胞の増加を認めており LIPUS 照射による尿管幹細胞の増加から再生を促進したと考えられる。再灌流後 7 日でも同様に Brdu 染色を施行したが、LIPUS 照射群での有意な Brdu 陽性細胞数の上昇は認めなかった。

現時点までの結果を論文投稿や産業財産権の出願予定ではあるが、再生細胞特定やメカニズムの解明のための in vitro の培養細胞に対する LIPUS 照射実験を今後も継続して LIPUS の再生促進作用のさらなる確認と再生促進のメカニズムの解析に、cDNA マイクロアレイ遺伝子発現の解析を検討している。

#### 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）

なし（ ）

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

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

牛込 秀隆 (Hidetaka Ushigome)

京都府立医科大学・医学研究科 准教授

研究者番号：90405283

(2)研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

なし（ ）

研究者番号：

(4)研究協力者