

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462836

研究課題名(和文) マウス腎虚血再灌流障害モデルにおけるEgr-1の役割

研究課題名(英文) Elucidation of the role of Early growth response factor (Egr)-1 in renal ischemia reperfusion injury in mice

研究代表者

新井 正徳 (Arai, Masatoku)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60267127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6Jマウスを用い、右腎を摘出した後、左腎に45分間の虚血を行い、採血および左腎の摘出を施行した。再灌流後12時間以降においてBUN、Cre値の有意な上昇とHE染色による急性尿細管壊死像を認めた。腎組織中のTNF- α およびMPO活性の測定では、各々再灌流後3時間と6時間において有意な上昇を認めた。また、ウェスタンブロットによる解析では、再灌流後60～90分においてEgr-1の発現の促進が認められた。これらの結果から、マウスにおける腎虚血再灌流によるTNF- α の産生上昇、好中球の集積および腎障害の形成にEgr-1の発現の促進が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of early growth response factor-1 (Egr-1) in renal ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice. Serum levels of BUN and creatinine, and histologic changes of kidneys were significantly increased at 12～48 hours after renal I/R. Renal tissue levels of TNF and MPO activity were significantly increased at 3 and 6 hours after renal I/R respectively. The expression of Egr-1 by Western blot analysis, significantly increased at 60-90 min after renal I/R and decreasing thereafter. These observations suggest that the increase of Egr-1 expression may be involved with renal I/R injury through the production of TNF and accumulation of neutrophils in mice.

研究分野：救急医学

キーワード：虚血再灌流障害 腎障害 腫瘍壊死因子 Egr-1

1. 研究開始当初の背景

近年外傷初期診療の標準化等にともない、出血性ショックを呈する重症外傷に対する初期治療において著明な進歩がみられている。しかしながら、出血性ショック離脱後の虚血再灌流障害の発生機序については未だ明らかではなく、治療法についても未だ論争的である。

出血性ショックによる急性腎不全は致死的となる病態である。その発症機序においては、おもに血管内皮由来の活性酸素種により活性化された単球、およびマクロファージによる TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が重要な役割を果たすことが知られている(Okajima K, Immunol Rev 2001)。これにより活性化された好中球は、好中球エラスターゼや活性酸素種を放出し、血管内皮細胞障害を惹起する。腎虚血再灌流障害においては、後毛細血管細静脈における血管内皮細胞障害により近位尿細管壊死が引き起こされ、急性腎障害となることが示されている(Okajima K, Immunol Rev 2001)。マウスの腎虚血再灌流障害モデルにおいて、抗 TNF- α 抗体の投与により腎障害が軽減されることが示されている(Daemen MA et al, Transplantation 1999)。Early growth response factor (Egr-1) は、単球において様々な刺激により、NF κ B、および AP-1 とともに発現する転写因子のひとつであり、TNF- α の産性を促進することが知られている(Guha M et al, Blood 2001)。我々は、ヒト単球において、Lipopolysaccharide (LPS)刺激による Egr-1 の発現を抑制することにより、単球の TNF- α の産生が抑制されることを報告してきた(Komura H, Arai M et al, J Thromb Haemost 2008) (Arai M et al, J Pharmacol Exp Ther 2010)。また、肺、および心筋における虚血再灌流障害モデルにおいては、Egr-1 の発現を抑制することにより、臓器障害が軽減されることが

示されている(Yan SF et al, Nat Med 2000) (Bhindi R et al, J Thromb Haemost 2006)。しかしながら、腎虚血再灌流障害モデルにおいては、Egr-1 が臓器障害にどのような影響を与えるかについては未だ明らかではない(Ouellette AJ et al, J Clin Invest 1990)。

2. 研究の目的

出血性ショックによる臓器障害発現のメカニズムについては、様々な虚血再灌流障害モデルにより、これまでも多くの研究がなされてきたが、TNF- α の転写因子のひとつである Egr-1 をターゲットとした研究は未だ少ない。本研究では、腎虚血再灌流障害モデルにおいて、腎組織中の Egr-1 の発現が臓器障害に関与しているか否かについて検討し、Egr-1 が、マウスにおける腎虚血再灌流障害の発生にどのように関与するかを明らかにし、これをターゲットとした治療の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス腎虚血再灌流障害モデル

C57BL/6J 雄マウス(20-25g, 8-12 週)を使用し、麻酔した後、腹部正中切開をおき、まず右腎を摘出する。つぎに左腎基部において、血管鉗子によって動静脈を遮断し 45 分間の虚血を行い、これを解除し再灌流を行い、腹壁を縫合閉鎖する。

マウスを以下の 2 群に分け、タイムコースに従い、血液、左腎などのサンプルを採取しこれを保存する。

sham-operated group : 右腎摘出のみで、左腎に虚血再灌流を行わない群

ischemia/reperfusion (I/R) group : 右腎を摘出し、左腎に虚血再灌流を行った群

(2) 分析内容と方法

マウス腎虚血再灌流障害モデルの腎組織における Egr-1 の発現はウエスタンブロット

法により解析する。また、腎組織中の TNF- α の測定は ELISA キットを用い、腎組織への好中球の集積は myeloperoxidase (MPO) の活性を測定し評価する。臓器障害については、血清 BUN、Cre 値の測定および組織学的検討により評価を行う。

血清 BUN、Cre 値の測定、および HE 染色
血清 BUN、および Cre 値の測定は、腹部大動脈より採血し、それぞれウレアーゼ法、酵素法により測定する。また、HE 染色は、左腎摘出後 10% ホルマリンにて固定し、パラフィン切片 (5 μ m) を作成し、HE 染色を行い、outer medulla における尿細管壊死、血管うっ血、および好中球集積を組織学的に評価し、腎障害に関して検討した。

腎組織中の TNF- α の測定

腎組織中の TNF- α の測定は、再灌流後、それぞれの時間においてマウスを sacrifice し、左腎を摘出し直ちに凍結保存する。保存された試料の重量を測定し、0.05% のアジ化ナトリウムを含む、4 のリン酸緩衝液内でホモジナイズし遠心分離を行い、上清を ELISA キットを用いて測定した。

腎組織中の MPO 活性の測定

再灌流後 6 時間においてマウスを sacrifice し、左腎を摘出し直ちに凍結保存する。保存された試料の重量を測定し、リン酸緩衝液内でホモジナイズし、遠心分離を行い、0.1ml の上清に 1.25mg/ml の o-dianisidine、および 0.05% 過酸化水素を含む 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) を 0.55ml 加え、5 分後、吸光度計を用い、腎に集積した好中球の MPO 活性を測定する。

腎組織中の Egr-1 発現の解析

腎虚血再灌流後、0 分、60 分、90 分、120 分においてマウスを sacrifice し、左腎を摘出し直ちに凍結保存する。腎組織を 400 mM

NaCl, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加えホモジナイズし、遠心分離した。上清のタンパク濃度を測定した後、タンパク量 25 μ g を用い SDS-PAGE を施行し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。5% スキムミルクと 0.1% Tween-20 にて 60 分間ブロッキングしたのち、1 次抗体はウサギモノクローナル抗 Egr-1 抗体 (Cell signaling technology, 1:1000) を用い、4 で一晩インキュベートした。2 次抗体と室温で 1 時間インキュベートしたのち exposure を行った。

4 . 研究成果

C57BL/6J マウスを用い、右腎摘出後、左腎に 45 分間の虚血を行い、再灌流後 6、12、24、48 時間で採血および左腎の摘出を施行し、BUN, Cre 値の測定と HE 染色による組織学的評価を行った。再灌流後 12 時間以降において BUN, Cre 値の有意な上昇と急性尿細管壊死像を認めた。腎組織中の TNF- α および MPO 活性の測定では、それぞれ再灌流後 3 時間と 6 時間において有意な上昇を認めた。また、ウエスタンブロットによる解析では、再灌流後 60~90 分において Egr-1 の発現の促進が認められた。これらの結果から、マウスにおける腎虚血再灌流による TNF- の産生上昇による好中球の集積と腎障害の形成に Egr-1 の発現の促進が関与する可能性が示唆された。

今後、Egr-1 の発現を選択的に抑制した場合、腎虚血再灌流障害が軽減されるかどうかについて検討が必要と考えられた。

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)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新井正徳 (ARAI, Masatoku)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：60267127

(2)研究分担者

塚本剛志 (TSUKAMOTO, Takeshi)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：20626270

増野智彦 (MASUNO, Tomohiko)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：00318528

横田裕行 (YOKOTA, Hiroyuki)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：60182698