

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670358

研究課題名(和文)心腎連関の分子機構の解析-法医診断に有用な指標の探索-

研究課題名(英文)Molecular mechanism of cardiorenal syndrome -search of useful diagnostic markers in forensic medicine-

研究代表者

木村 章彦(Kimura, Akihiko)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60136611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心臓への圧負荷により惹起される腎障害、すなわち1型心腎連関の病態形成においてIFN-gammaが保護的に機能することを明らかにした。野生型マウスとIFN-gamma-KOマウスに強い圧負荷をかけるとIFN-gamma-KOマウスにのみ尿管上皮細胞のアポトーシスを伴った腎障害が惹起された。IFN-gamma-KOマウスでは野生型マウスの心臓で見られるANPの発現増強が有意に抑制されていた。IFN-gamma-KOマウスにANPを持続投与下に圧負荷をかけると腎障害は有意に軽減したことから、IFN-gammaはANPの発現を介して保護作用を発揮することが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the pathogenic role of IFN-gamma in type 1 cardiorenal syndrome in mouse model of transverse aortic constriction (TAC). Severe TAC induced renal injury in IFN-gamma-KO mouse but not in wild-type (WT) mouse, suggesting that IFN-gamma plays a protective role in TAC-induced renal injury (type 1 cardiorenal syndrome). Severe TAC enhanced intracardiac ANP gene expression in WT mice, which was significantly reduced in IFN-gamma-KO mice. ANP infusion significantly attenuated severe TAC-induced renal injury in IFN-gamma-KO mice, indicating that IFN-gamma plays a protective role in type 1 cardiorenal syndrome through enhance of ANP gene expression.

研究分野：法医学

キーワード：心腎連関 IFN-gamma ANP apoptosis

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会をいち早く迎える我が国では、心血管病や慢性腎不全にとってリスクの高い高血圧症や糖尿病などの患者の増加は避けられない。心血管病と慢性腎不全は相互に密接に関連することから心腎連関と言う新しい疾病概念が生まれ、臨床医学の領域で注目を集めている。心血管病は法医学が取り扱う内因性急死の大半を占め、極めて重要な死因であり、心腎連関は法医学にとっても重要な疾患概念と思われる。しかし、法医学分野において心腎連関を念頭に置いた診断や、基礎研究はこれまでのところ殆ど見られない。

2. 研究の目的

大動脈弓部結紮による心臓圧不負荷で誘起される腎不全マウスモデルを用いて心腎連関の分子機構を解析し、心腎連関における新しい分子生物学的変化および病理組織学的変化を見出し、得られた新しい指標を法医学における死因究明に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 大動脈弓部結紮(TAC)による心肥大モデルの作製

8-10 週齢雄の Balb/c マウス(野生型マウス)と IFN- γ -KO マウスに気管挿管し、ベンチレーターでイソフルラン麻酔および呼吸を維持しながら正中を開胸する。7-0 号絹縫合糸で大動脈弓部を 28G の注射針の太さに結紮した。閉胸縫合の後、1 日目から毎日採血し、血清尿素窒素(BUN)、血清クレアチニン(CRE)を測定した。また、1 - 3 日後にイソフルランの過麻酔により安楽死させ、心臓、腎臓を採取し、一部をホルマリン固定、残りを液体窒素で急速に凍結し-80 度で保存する。更に、IFN- γ に対する中和抗体を投与した野生型マウスおよびマイクロ浸透圧ポンプを用いて ANP を持続投与した IFN- γ -KO マウスについても同様に大動脈結紮実験を行った。

2) 心臓超音波検査による心機能解析

TAC を施行したマウスをネプタールイソフルラン麻酔下に心臓超音波検査を行い、心肥大および心機能を評価する。

3) ホルマリン固定パラフィン包埋マウス組織の切片について、HE 染色および Masson trichrome 染色を行い、病理組織学的に心臓の肥大および線維化の程度を評価する。腎臓については PAS 染色も行って、組織障害と線維化の程度を評価した。

4) 心腎連関に関わる特異的遺伝子発現変化の解析

採取したマウスの各臓器から Isogen を用いて RNA を抽出し、random 6 oligonucleotide を primer として逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、サイトカイン、ケモカイン、増

殖因子、転写因子、シグナル伝達分子に特異的なプライマーセットを用いて Real-time RT-PCR を行い、心腎連関に關与する遺伝子の発現変化を定量的に解析した。両系統のマウスから得られたデータを比較することで、心腎連関の鍵となる分子を検索した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスと IFN- γ -KO マウスの強い圧負荷に対する心臓の応答性

TAC 施術後 3 日目の心エコーでは、両系統のマウスは強い代償性の心肥大を示して、心室の縮小を認め、心機能の有意な低下を認めなかった(図 1)。

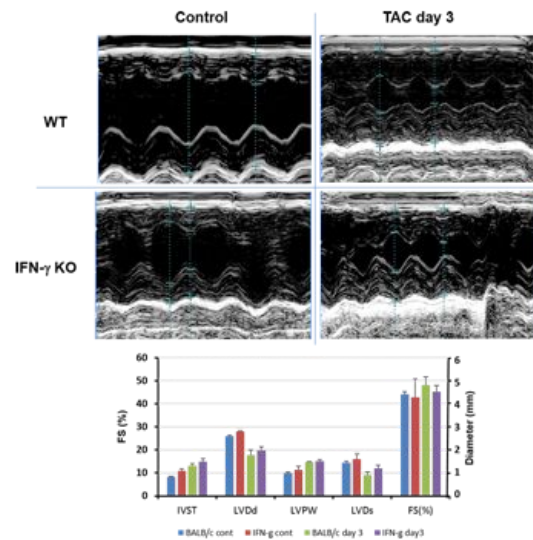


図 1. TAC 後 3 日の心エコー
両系統マウスの心エコー像に有意な差を認めない。

しかし、TAC 施術後 10 日以内に野生型マウスは 10%が

死亡するのみであったが、IFN- γ -KO マウスは 60%以上が死亡し、IFN- γ -KO マウスは有意(p<0.005)に TAC に対して感受性が高いことが明らかとなった(図 2)。

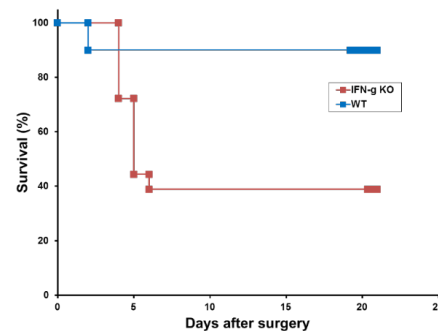


図 2. 両系統マウスの TAC における生存曲線
IFN- γ -KO マウスは野生型マウスに比較して TAC に対して有意に高い感受性を示した。

(2) 野生型マウスと IFN- γ -KO マウスの強い圧負荷に対する腎臓の応答性

IFN- γ -KO マウスでは TAC 施術後 1 日目から著明な BUN の上昇を認め、2 日目からは

CRE も有意に上昇した(図 3)。更に HE 染色および PAS 染色で著しい尿細管の障害を認めた(図 4)。免疫組織および TUNEL 染色により著明な好中球浸潤と尿細管上皮細胞のアポトーシスを認めた(図 5, 6)。しかし、これらの腎組織障害は野生型マウスでは殆ど認めなかった(図 3-6)。

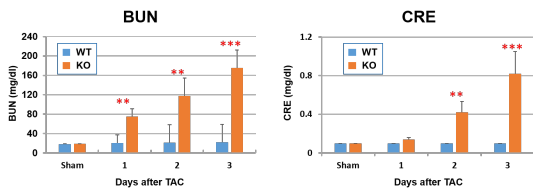


図 3. TAC による血清 BUN と CRE の変化
IFN- γ -KO マウスのみが TAC により血清 BUN と CRE 値が上昇した。means \pm s.e.m. (n= 6). **, $p<0.01$; ***, $p<0.005$. (WT vs KO)

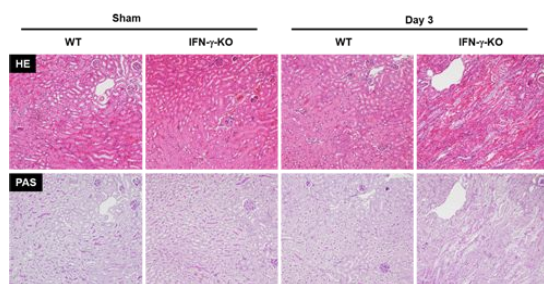


図 4. TAC により誘起される腎障害
著明な尿細管上皮細胞の壊死と刷子縁の喪失を TAC 3 日後の IFN- γ -KO マウスに認めた。

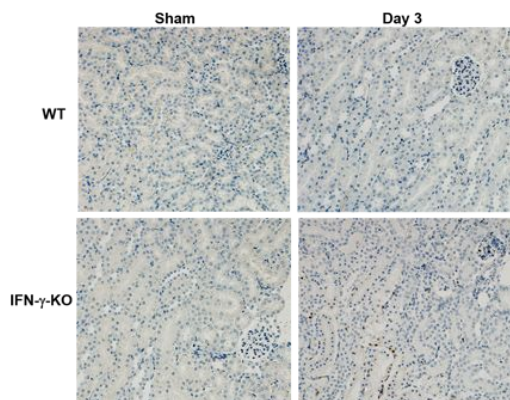


図 5. TAC により誘起される腎組織への好中球浸潤
IFN- γ -KO マウスの腎組織への著明な好中球浸潤を認めた(抗 MPO 染色)。

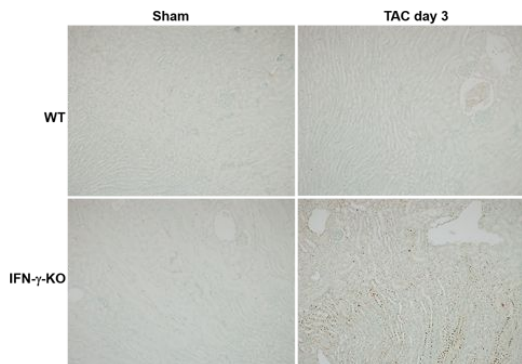


図 6. TAC により誘起される尿細管上皮細胞のアポトーシス。 IFN- γ -KO マウス腎組尿細管上皮細胞の著明なアポトーシス (TUNEL 染色)。

(3) 圧負荷による心臓と腎臓における遺伝子発現の変化

TAC 施術 3 日後の心臓における遺伝子発現を野生型と IFN- γ -KO マウスで比較すると、CC chemokine とその受容体および ANP の発現が IFN- γ -KO マウスで著明に低下していた(図 7)。

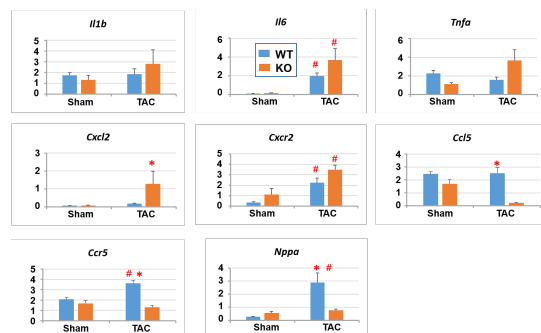


図 7. TAC 3 日後の心臓における遺伝子発現の Real-time RT-PCR による解析。represent means \pm s.e.m. (n= 6). *, $p<0.05$; **, (WT vs KO); #, $p<0.05$. (Sham vs TAC)

一方、腎臓における遺伝子発現は、炎症性 cytokine および CXCL2 とそのリガンドの遺伝子発現が IFN- γ -KO マウスにおいて著明に亢進していた。

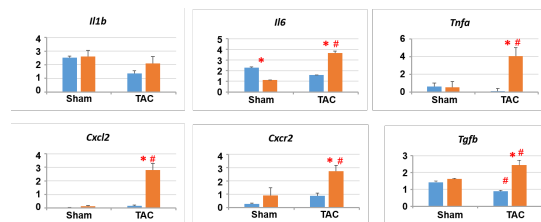
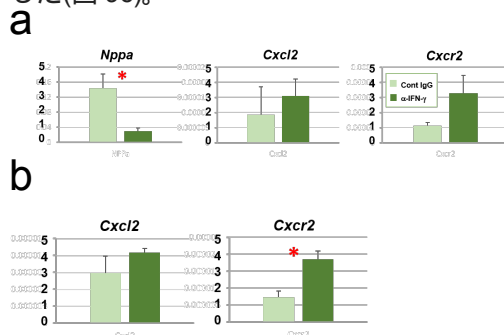


図 8. TAC 3 日後の腎臓における遺伝子発現の Real-time RT-PCR による解析。represent means \pm s.e.m. (n= 6). *, $p<0.05$; **, (WT vs KO); #, $p<0.05$. (Sham vs TAC)

(4) IFN- γ に対する中和抗体が野生型マウスに対する圧負荷に及ぼす影響

野生型マウスに IFN- γ に対する中和抗体を投与後、TAC を行い、術後 3 日目の遺伝子発現を解析すると、心臓において ANP の遺伝子発現が有意に低下し(図 9a)、腎臓においては CXCR2 の発現が有意に増加した(図 9b)。これに伴って、BUN, CRE も有意に高値を示した(図 9c)。



b

C

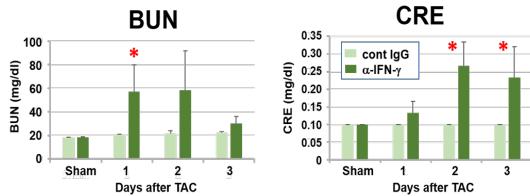


図 9. IFN- γ に対する中和抗体が野生型マウスに対する圧負荷に及ぼす影響

IFN- γ に対する中和抗体を投与した野生型マウスの TAC 3 日目の心臓(a)と腎臓(b)における遺伝子発現。および腎障害の指標の変化(c)。

(5) IFN- γ -KO マウスへの ANP 持続投与が TAC による腎障害に及ぼす影響

以上の結果より、IFN- γ マウスでは TAC により心臓で誘導される ANP の発現が野生型マウスに比較して抑制されていることが腎障害を誘起する可能性が考えられるので、IFN- γ -KO マウスに ANP 持続投与と TAC を施行した。図 10 に示す様に ANP 持続投与は IFN- γ -KO マウスの腎障害を有意に抑制した。

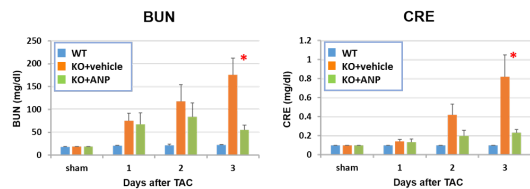


図 10. IFN- γ -KO マウスへの ANP 持続投与が TAC による腎障害に及ぼす影響

以上の結果から、心臓への圧負荷により誘起される腎不全(I 型心腎連関)において IFN- γ は ANP の発現を介して保護的に機能している可能性が示唆された。

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 3 件)

1. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 山本寛記, 近藤稔和. IFN- γ は ANP の発現を介して 1 型心腎連関の病態形成において保護的に機能する. 第 100 回日本法医学会学術全国集会. 東京. 2016.6 月.
2. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Mukaida N, Kondo T. IFN-gamma plays protective roles in the pathogenesis of cardio-renal syndrome type 1 through the induction of intercardiac ANP expression. Florence, Italy. 2016. May.
3. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 向田

直史, 近藤稔和. IFN- γ は 1 型心腎連関において保護的に機能する. 第 36 回日本炎症・再生学会. 東京. 2015. 7 月.

〔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

木村章彦 (KIMURA AKIHIKO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60136611

(2) 研究分担者

近藤稔和 (KONO TOSHIKAZU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70251923

石田裕子 (ISHIDA YUKO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10364077

野坂みずほ (NOSAKA MIZUHO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00244731

(3) 連携研究者

()

研究者番号: