

誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)をターゲット  
としたアンチセンス療法の  
ラット虚血性急性腎不全モデルに対する効果

野入英世

誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) をターゲット  
としたアンチセンス療法の  
ラット虚血性急性腎不全モデルに対する効果

野入 英世

## はじめに

急性腎不全は、急激な糸球体濾過率の低下に伴ない、高窒素血症、電解質異常、代謝性アシドーシスが急速に進行し、いわゆる尿毒症症状を引き起こす病態を総称した症候群である。急性腎不全の成因は、①腎血流量の減少による腎前性腎不全、②腎実質性病変による腎性腎不全、③尿路閉塞による腎後性腎不全の3つに大別するのが一般的である。腎性急性腎不全の中で急性尿細管壊死を起こすものを、特に狭義の急性腎不全と定義しているが、虚血再灌流によって生じる虚血性急性腎不全モデル、造影剤による急性腎不全モデル、ノルエピネフリンによる急性腎不全モデル等は、尿細管壊死、円柱形成、間質の浮腫を伴うため典型的な狭義の急性腎不全の動物モデルと考えられている。急性腎不全の病態生理を構成する因子としては、腎血流量の減少、糸球体毛細血管透過性の低下、円柱による尿細管閉塞、尿細管液の逆拡散が挙げられている。しかし、それぞれの因子が同じ程度で急性腎不全の成立に寄与しているわけではないことはよく知られている。

虚血性急性腎不全を起こした腎臓に剖面をいれてみると、肉眼的に必ずといっていい程、図1のように腎髓質に一致して血液が認められる。一方、腎皮質部はこれに反して青白く血流が流れていないことが想像される。正常腎では一様な赤みを帯びており、このような所見を認めることはない。どのようにしてこのような血流の不均衡が虚血腎にもたらされるのであろうか？虚血によって多量のATPが消費されて作られたプリン代謝産物とxanthine oxidaseは、再灌流によって供給された酸素と共に反応してオキシダントを生成する。このようにして酸化的ストレスが腎臓にかかる時、ミトコンドリアの最も多い近位尿細管が最も早く障害を受ける。近位尿細管細胞は、腫脹、脱落し、脱落細胞は互いに集簇しながら、proximal straight tubulesがthin descending loop of Henleに移行し、尿細管腔が著しく狭くなる皮髓境界部につまり、いわゆる尿細管閉塞を引き起こす。尿細管閉塞を起こしたネフロンが増えるに従い、これに沿って走行している小葉間動脈は強く圧迫され阻血されるようになるため、腎皮質への血流は低下し、一方、髓質のvascular bundleは周囲にvascular smooth muscleを持たないので、血流調節機構がなくこちらへ血流は流れ込んでしまい、相対的に血流が増加して鬱血状態を作り出してしまうのである。実際Hellbergらによって、超音波ドップラー法で虚血腎での血流分布が確かめられているが、正常腎との比較で、髓質では約1.3倍の血流の増加を認め、皮質では1/2~1/5の血流低下

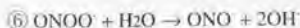
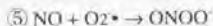
を認めたと報告されている<sup>1</sup>。更に、腎血流の減少は再灌流前後で25%の減少を示すのに対して、糸球体濾過率は90%の減少を示すといった観察から<sup>2</sup>、腎血流量の低下の奇与の度合いは尿細管閉塞と比べて低いと考えられ、糸球体毛細血管透過性の低下も、血管腔とポーマン囊の間のfenestrationの数やサイズの減少が報告されてはいるものの、これが糸球体濾過率低下の最大の理由であると考えているnephrologistは殆どいない現状である<sup>3</sup>。従って以上のように、急性腎不全の増悪因子のなかで特に尿細管障害に伴う尿細管閉塞が、再灌流時の血管収縮の悪化と共に、初期病像の進展の大事な鍵を握っているといっても過言ではない<sup>4,5</sup>。一方、急性腎不全からの回復過程の促進には、EGF、PDGF、HGF、FGFなどの成長因子が関与しており細胞分裂能を亢進させたり、コラゲナーゼ分泌を促進させることが分かっている<sup>6</sup>。

現在では、虚血性急性腎不全モデルでの尿細管壊死は、虚血再灌流によって腎臓にもたらされたオキシダントによるものであると考えられている。即ち、虚血下では、細胞内に蓄積されたATPの消費により、これが代謝されてプリン代謝産物を細胞内に蓄積する。また、近位尿細管は、腎臓の中では最もミトコンドリアの多い部位であるが、ミトコンドリアは虚血により電子伝達系の中間代謝産物が還元作用を受け、自由電子を多量に発生する。更に、虚血によってCa<sup>2+</sup> ATPasesの活性化が低下するため細胞内Ca濃度は上昇する傾向となる。その上Na-K-ATPaseの再分極により機能低下を生じるため、細胞内外のNaの濃度勾配は低下し、Na-Ca exchangerの作用により細胞内Caを上昇させるメカニズムが働き、細胞内Caの上昇はミトコンドリア膨化作用も引き起こすが、Ca<sup>2+</sup>依存性proteasesやphospholipasesの活性化も引き起こされ、xanthine dehydrogenaseがxanthine oxidaseへと変換されて細胞内に蓄積される。このような条件が揃っているところで、再灌流が生じると、xanthine oxidaseはプリン代謝産物由来のhypoxanthineを酸化する際に、自由電子を酸素分子へと受け渡すため、



反応式①のように、活性酸素O<sub>2</sub><sup>•-</sup>を発生する。生理的な条件下では、このようにし

て発生した活性酸素は、superoxide desmutase (SOD) によって反応式②のように過酸化水素として消去され、更に反応式③、④のように、過酸化水素はcatalaseやGSH peroxidaseにより代謝されてしまう。しかし、虚血再灌流モデルでは、このようにして生じるオキシダントが腎臓に過剰負荷されるため一連の消去系作用が充分でなく、細胞障害作用を引き起こすと考えられる。つまり、ここで生じた過剰の過酸化水素はNO産生を誘導し、産生されたNOは、すぐに $O_2\cdot$ と反応して反応式⑤のように過酸化窒素に変換され、更に反応式⑥の反応により2分子のhydroxyradicalを生じる。



hydroxyradicalは非常に強力なオキシダントで強い細胞障害性を有することは周知の通りで、これが腎尿細管障害を進行させる有害なオキシダントの一つである。

腎臓でのNOの局在については、constitutive NO synthase (cNOS) は血管内皮以外では、macula densa<sup>7</sup>とinner medullary collecting duct (IMCD)<sup>8</sup>で報告されており、またinducible NO synthase (iNOS) はproximal tubulesやIMCD、メサンギウム細胞での発現が報告されている<sup>9</sup>。虚血再灌流による急性腎不全の*in vitro*の系であるhypoxia-reoxygenation injuryモデルでは、NO及びその代謝物の過酸化窒素がproximal tubulesにおいて早期に発現し細胞障害性に働くことが示された。そこで、Lアルギニンはこの障害を助長し $\text{N}^\text{G}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) は抑制したこと、更にproximal tubulesにはiNOSしか存在しないことなどより、ここで関与するNOはiNOS由来であると考えられた<sup>10</sup>。このことは、虚血性急性腎不全の血流再灌流後、iNOS由来のNOが産生開始され、これがproximal tubulesを障害するため、腎不全が起きてくることを想定させる。従って、このような形でのNO産生を抑制すれば、虚血性急性腎不全での尿管障害は防げるはずである。一方、*in vivo*の急性腎不全モデルで $\text{N}^\text{G}$ -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) やL-NAMEなどのLアルギニンアナログを用いると、いずれも急性腎不全が増悪することが報告されていた<sup>11,12</sup>。

では、このような*in vitro*と*in vivo*での観察の相違は、どうして生じたのであろうか？ NO抑制剤の選択性の低さは以前から指摘されていたが<sup>13,15</sup>、一つの仮説としては、上述のように、腎臓では、cNOSとiNOSは役割に応じて異なった分布をしているため<sup>10</sup>、L-NAMEやL-NMMAが非選択的にNO産生を抑制してしまうと、生理的に必要な血管拡張に働くcNOSの発現も抑制し、却って腎機能悪化を招いてしまう可

能性が考えられた。

本研究では、このような従来のNO抑制剤の問題点を克服するためiNOSをターゲットとしたantisense oligodeoxynucleotide を作製し<sup>17</sup>、まず腎尿細管細胞由来のBSC-1細胞を用いた*in vitro*の系で、antisense oligodeoxynucleotideの効果を確認したうえで、これを*in vivo* のラット腎虚血再灌流モデルに適用して、急性腎不全時の尿細管におけるNOの特異的な役割を明らかにすることを目的とした。

## 研究方法

### 細胞培養

培養細胞による実験では、アフリカミドリザル腎由来の尿細管上皮細胞であるBSC-1細胞を用いた。培養溶液はDMEM (GIBCO BRL) を基本とし、10% ウシ胎児血清 (Hyclone)、penicillin 100 units/ml / streptomycin 100 mg/ml (GIBCO BRL) を補った<sup>18</sup>。

### *In vitro* (ヒト) 用 oligodeoxynucleotide の設計と合成

iNOS に対する antisense oligodeoxynucleotide は、5'-untranslated region と開始コドン、open reading frame を含むよう 5'-ACA GGC CAT CTC TAT GGA TTT ACA-3' と 85-62 のヌクレオチドで設計され、対照群として、sense oligodeoxynucleotide は 62-85 で 5'-TGT AAA GCC ATA GAG ATG GCC TGT-3'、scrambled oligodeoxynucleotide は 5'-TGT CCA ATT AGC TCC GAG TCA TAC-3' をそれぞれ設計した。Phosphorothioated oligodeoxynucleotides は DNA 合成器 (Applied Biosystems) で合成した。ターゲットとした配列は報告されている全てのヒト iNOS cDNA で保存されていた<sup>19</sup>。一方、BSC-1細胞はアフリカミドリザルの細胞であるが、アフリカミドリザル iNOS cDNA は報告されていないので、両種の間でターゲットとした開始コドンは保存されているものと考えこれを用いた。Blast program により、以上のヌクレオチド配列は、GenBank に既に登録された哺乳類の配列にホモロジーがないことを確認した<sup>20</sup>。Antisense oligodeoxynucleotide の一部は、BSC-1細胞への取り込みを調べるために、3' 末端をカラム処理 (Glen research) によってビオチン化した。

### *In vitro* NO<sub>2</sub> 産生

96ウェルプレートにフェノールレッド無添加のDMEMを用いてBSC-1細胞を培養した。細胞がconfluentの状態、0.5 mM過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または HP) を1時間または10 μg/mlリポポリサッカライド (LPS) (B:027) (Sigma) を7時間作用させた。これに対して、antisense、sense、scrambled oligodeoxynucleotideをそれぞれ20時間前処理した後に過酸化水素あるいはLPSを同様に作用させて、これらのoligodeoxynucleotideの効果を検討した。反応終了後、100 μlの培養液をそれぞれのウェルから取り、これに200 μlのGriess反応液 (1% sulfanilamide / 5% phosphoric

acid : 0.1 % naphthylendiamine dihydrochloride / 5 % phosphoric acid = 1 - 1 ) ( Alexis )  
を加え<sup>21</sup>、10分インキュベーション後、NO<sub>2</sub>産生を546 nmの吸光度で測定した。  
キャリブレーション・カーブはNaNO<sub>2</sub>により求めた。結果は細胞1000当たりで表わ  
したが、それぞれのウェル内の細胞数をBCA ( Bicinchoninic acid ) 法 ( Pierce ) に  
よってタンパク量に補正してこれを求めた<sup>22</sup>。

#### NADPH-diaphorase及び免疫組織学的染色

Lab-Tecチャンパー ( Nunc ) 内でBSC-1細胞を培養した。ConfluentのBSC-1細胞を  
対照群、0.5 mM過酸化水素群、antisense oligodeoxynucleotide群、antisense oligodeoxy-  
nucleotide10時間前処理 + 0.5 mM 過酸化水素群に分けて反応後、それぞれ3.75 %  
paraformaldehyde ( PFA ) で固定し、更にNADPH-diaphorase反応用溶液 ( 0.3 % Triton  
X-100, 0.1 mg/ml nitroblue tetrazolium + 1.0 mg/ml β-NADPH / 0.1M Na-phosphate buffer,  
pH 7.4 ) で37℃、2時間インキュベートした<sup>23</sup>。Phosphate buffered saline ( PBS ) で洗  
浄後、カバー・ガラスで封入した。

同様に固定された細胞は1 % BSAで30分間、0.1 % Triton X-100で30分間処理した  
後、ヒトiNOS及びeNOSに対するモノクローナル抗体 ( Transduction Laboratory ) を  
60分間作用させ、二次抗体にgoat-anti-mouse rhodamine IgG ( Molecular Probes ) を  
用いて発色させた。

#### Oligodeoxynucleotideの細胞毒性

Live and dead assayを用いて、ここで使用したoligodeoxynucleotideの細胞毒性の検  
討を行なった。

BSC-1細胞を96ウェルプレートにconfluentに培養し、血清無添加のDMEMに培養液  
を交換してから*in vitro*用antisense、sense、scrambled oligodeoxynucleotideを10 mMの  
濃度で加え、12~24時間インキュベートした。細胞培養液をKrebs-Ringer緩衝液 ( 10 mM HEPES, pH 7.4 ) に交換し、0.5 mM 過酸化水素水30~60分間作用させた。  
更に、Krebs-Ringer緩衝液で3回洗浄し、2 μM calceinと4 μM ethidium homodimer ( Molecular Probes ) を加え30分間インキュベート後、蛍光顕微鏡下で細胞300あたり  
の生細胞 ( calceinにより緑に染色される ) と死細胞 ( ethidium homodimerにより赤  
に染色される ) を数え集計した。



### *In vivo* (ラット) 用 oligodeoxynucleotide の設計と合成

*In vitro* 用 oligodeoxynucleotide 同様に、phosphorothioated oligodeoxynucleotides は DNA 合成器 (Applied Biosystems) で合成した。iNOS の cDNA は、マウス及びラットのマクロファージ由来のもので、ラット腎特異的なものが報告されていたので、これらにホモロジーの認められる open reading frame をターゲットとして、1829-1809 の antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN-ORF) 5'-CTT GAG AGT CTG CCC ATT GCT-3' を設計した<sup>24,25,26</sup>。一方、コントロールとして、3種類の oligodeoxynucleotide を用意した。即ち、sense oligodeoxynucleotide 5'-AGC AAT GGG CAG ACT CTG AAG-3' 及び scrambled oligodeoxynucleotide 5'-TCT CAG TGA GCC CTC ATT CTG-3'。更に、ラット血管平滑筋型 iNOS の開始コドン をターゲットとした 6-26 の antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN-VSM) 5'-GCA AGC CAT GTC TGT GAC TTT GTG-3' を設計した。

Blast program により、以上の oligodeoxynucleotide 配列は、GenBank に既に登録された哺乳類の配列にホモロジーを認めないことを確認した<sup>20</sup>。antisense oligodeoxynucleotide の一部は、腎での動態を調べるために、3' 末端をカラム処理によってデオキシ化された。以上4種類の oligodeoxynucleotide を、iNOS の誘導を伴うことが確認されているラット腎虚血再灌流モデルに経動脈的に注射投与した<sup>24</sup>。

### 急性腎不全モデル

Sprague-Dawley ラット、雄、体重 110~130 g を用いた。環境適応のため手術前5日間、飼育室 (夜9時間、昼15時間、室温  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ ) にて、自由に飲水、摂食 (rat chow) をさせた。また、手術前夜より飲水のみとした。

既に報告されているように<sup>27</sup>、麻酔は、体重 100 g 当たり ketamine HCl 11.6 mg 及び xylazine HCl 0.77 mg の組合わせで開始し、その後術中の覚醒状況に応じて適宜追加した。腎虚血開始30分前に 200 U/kg の heparin を筋注した。また、術中の体温は直腸温を指標に  $37^\circ\text{C}$  にコントロールした。約 2.5 cm の正中切開後、左右腎動脈を45分間結紮し、腎虚血再灌流モデルを作成した。その後創部は 4-0 腸糸、3-0 絹糸により閉じた。

24時間後、血漿クレアチニン (Cr)、血清尿素窒素 (BUN) 用採血を行ない、

屠殺後、PBS及び3.75 % PFA / PBSにより順次灌流し、各群の腎臓を摘出し、一部は凍結切片用として、3.75 % PFA / PBSに4 °Cで5時間固定後、4 °C、30 %蔗糖 / PBS溶液に一晚、Tissue-Tekに包埋した。他の一部はmorphological scoringのため10 % formalin / PBSで固定後、paraffinに包埋した。Morphological scoringは既に報告したように、blind fashion 形式で行なった。他方の虚血腎は、それぞれ腎皮質尿管（isolated cortical tubules）採取及びWestern analysisのために用いた。oligodeoxynucleotideは後述のデータに基づいて、1 mg/kg の濃度で腎虚血開始10時間前に左心室に前投与した。また、L-NAMEは75 mg/kg の濃度で腎虚血開始10時間前に腹腔内に前投与した。以上の実験は、各群6~9匹の動物を用いて行なった。

#### 腎皮質尿管によるNO<sub>2</sub>産生

0 °C DMEM内で、採取された各群の腎より腎皮質を切り出し、既に報告されているように<sup>11</sup>、これを粉々に切り刻んだ後、150 µmと75 µmのナイロン・メッシュを通して皮質尿管のフラクションを得た。このフラクションを37 °C、CO<sub>2</sub>インキュベーター内でフェノール・レッド無添加のDMEMに6時間浮遊培養した。インキュベーション後、遠沈により上清を集め、上記同様Griess反応によりNO<sub>2</sub>産生を測定した。同時に、それぞれの検体のタンパク量をBCA（Bicinchoninic acid）法によって測定し、NO<sub>2</sub>値を補正した。

#### 腎におけるiNOSの発現

採取された腎は、即座に液体窒素で凍結し、氷上でhomogenize後、5 % SDS-polyacrylamide gelにより電気泳動し、ラットiNOSに対するモノクローナル抗体（Transduction Laboratory）を用いてWestern blottingを行なった。

iNOSあるいはeNOSの免疫組織学的染色は、8 µm の凍結切片を用い、蛍光抗体法により行なった。凍結切片は室温に戻した後、0.1 % Triton-Xで20分間、0.1 % BSAで30分間処理し、iNOSあるいはeNOSに対するモノクローナル抗体で60分間インキュベートし、二次抗体にはrhodamine-conjugated anti-mouse IgGを用いた。

#### In vivo NO 測定

腎虚血再灌流モデルを作成後24時間して、各群のラットは麻酔（Inactin-Byk 100

mg/kg) 下に、頸静脈ラインを留置、左腎を剖出し、更に呼吸性変動を抑制するために腎をカップ内に固定した。また、術中の体温は、直腸温を指標に、37 °Cにコントロールした。

予めキャリブレーションをした直径30  $\mu\text{m}$ の*in vivo*用NO微量電極 (Inter Medical) を腎皮質に挿入し<sup>28</sup>、baseline recordingを測定後、bradykinin 25 nmol/100 gを頸静脈ラインより注入し<sup>29</sup>、約5-10分後、L-NAME50 mmol/100 gを更に注入した。微量電極のキャリブレーションには、NOドナーのS-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) (Molecular Probes) を用いた<sup>28</sup>。

#### 腎光顕組織標本のmorphological scoring

標本は、10 % formalin / PBSで固定後パラフィン包埋し、2  $\mu\text{m}$  の厚さでスライドガラス上に切り出し、ヘマトキシリン-エオジン染色及びPAS染色した。急性腎不全の重症度の評価には、既に確立されている基準を用いblind fashionで評価、点数化した<sup>30</sup>。ここで評価した項目は、vasa recta内の好中球数、尿細管壊死、尿細管再生、尿細管細胞分裂、ボーマン嚢の拡張、ボーマン嚢壁側上皮細胞のtubularization、尿細管腔内の石灰化様細胞破砕物、間質の炎症、円柱、juxtaglomerular apparatusの膨隆、間質の浮腫、brush bordersの喪失の11項目で、その変化はそれぞれ0~2のスケールで表わした。

## 実験結果

まず、*in vitro*の実験系において、合成したoligodeoxynucleotideが実際に細胞に取り込まれるかどうかを検討した。3'末端をビオチン化したoligodeoxynucleotideを1 $\mu$ M、5 $\mu$ M、10 $\mu$ Mの濃度で20時間BSC-1細胞に作用させると、図2に示したように、濃度依存性に細胞内へ取り込まれていることがわかった。図2Dでは核内へも取り込まれていた。そこで、次にNOを誘導することが知られているLPS<sup>31</sup>と過酸化水素<sup>32</sup>をBSC-1細胞へ加え、NO産生が亢進していることを確認した上で、oligodeoxynucleotideを前処理した場合の効果を検討した。図3に示したように、LPS投与群では250.3  $\pm$  16.7 pmol / 1000 cells / hourのNO<sub>2</sub>産生を認め、対照群と比較して著しい増加を示した。また、過酸化水素投与群でも同様の著しいNO<sub>2</sub>産生を認めた。これに対して、antisense oligodeoxynucleotide 10  $\mu$ Mを7時間前処理しておく、これらの刺激によるNO<sub>2</sub>産生はほぼ対照群のレベルまで抑制されることがわかった。一方、sense、scrambled前処理群は抑制作用が認められなかった。また、合成したoligodeoxynucleotide自体のNO<sub>2</sub>産生能は対照群と比較して有意差はなかった。更に、NADPH-diaphorase染色によりantisense oligodeoxynucleotideの効果を検討した。対照群（図4A）と比べて0.5 mM過酸化水素1時間処理後には図3Cのように明らかな発色を認めたが、antisense oligodeoxynucleotide前処理群では抑制された（図4D）。尚、antisense oligodeoxynucleotide自体での発色の増強は認められなかった（図4B）。また、LPS（10  $\mu$ g/ml, 15時間）でもほぼ同様の観察を得た。以上より、ここで設計及び合成して用いたiNOSに対するantisense oligodeoxynucleotideは、BSC-1細胞に取り込まれ、しかもLPSあるいは過酸化水素により誘導されるNO<sub>2</sub>産生を、選択的かつ効果的に抑制することが証明された。

次に、合成したoligodeoxynucleotideの細胞に対する影響を検討した。Live and dead assayでは、図5に示したように合成したoligodeoxynucleotide自体の細胞毒性は有意差がないことがわかった。即ち、死細胞の占める割合は、対照群では2.6  $\pm$  1.7%であるが、過酸化水素投与群では27.6  $\pm$  2.4%と明らかな増加を示した。一方、antisense oligodeoxynucleotide前処理後に過酸化水素を投与した群では、対照群と同程度までこれが抑制されることがわかった。しかしながら、sense、scrambled前処理群ではこのような抑制作用が認められなかった。

以上のような、*in vitro*での基礎実験データをもとに、ラット用のoligodeoxynucleo-

tideを作成し、*in vivo* 実験を行なった。まず、ラットに全身投与されたoligodeoxynucleotideの腎臓での最適化を計るために、注射後の腎での蓄積の程度を、3'末端をビオチン化したoligodeoxynucleotideを用いて時間経過とともに検討した。図6に示したように、全身投与後4時間で近位尿管を中心とした皮質尿管への蓄積が顕著に認められるようになり、8時間後にはほぼ最大に達していることが確認された。

この情報をもとに、oligodeoxynucleotideは腎虚血開始約10時間前に投与した。図7Aから分かるように、AS-ODN-ORF前投与群では、血清Cr及びBUNの値が対照（sham）群と変わらず、AS-ODN-VSM前投与群及びsense前投与群、scrambled前投与群と比較して値の上昇が有意に抑制された。即ち、AS-ODN-ORF前投与により選択的にiNOSの発現を抑制することにより、虚血再灌流による腎障害を軽減させうる可能性が示唆された。そこでこれに対して、非選択的なNOS抑制効果を持つL-NAMEを前投与してみると、図7Bのように虚血性急性腎不全に対する治療効果は認められず、むしろ増悪した。

AS-ODN-ORFの効果を確認する目的で、腎皮質尿管によるNO<sub>2</sub>産生を検討した。図8Aに示したように、対照群と比較して、虚血腎では約6倍のNO<sub>2</sub>産生を認めた。一方、AS-ODN-ORF前投与をしておくと、虚血腎でのNO<sub>2</sub>産生は有意に軽減されることが示された。また、Western analysisによる腎homogenatesでの検討では、図8Bに示したように、虚血腎と比較してAS-ODN-ORF前投与腎ではiNOSの発現が殆ど認められないことが示された。更に、免疫組織学的にも同様の観察が認められた。即ち、図9に示したように、虚血腎ではiNOSの強い発現が観察されたが（図9C）、AS-ODN-ORF前投与された虚血腎では抑制された（図9E）。一方、cNOSの発現は対照群、虚血群、AS-ODN-ORF前投与群で違いを認めなかった。

更に、AS-ODN-ORFのiNOSに対する選択性を調べる目的で、NO測定用微量電極を用いて対照群、虚血群、AS-ODN-ORF前投与群の腎におけるNO産生能を検討した。虚血再灌流から24時間後、左腎を剥出し腎皮質にキャリブレーション済（図10A）のNO測定用微量電極を刺入した（但し、刺入した電極の位置が、糸球体、尿管、血管、間質のどこであるかを特定することはできないが、NOはガス状物質であるので電極の近傍からの発生を捕らえていることになる）。図10B-Dに示されているように、cNOS由来のNO産生を促進することが知られているbradykininを頸静脈ラインより注入すると、対照群でのNO産生が確認された（図10B）。これに対して、虚

血群でのbradykininの効果はごく僅かであった（図10C）。一方、AS-ODN-ORF前投与群でのbradykininに対する反応は、対照群とほぼ同程度であった。そこで、図11に各群でのbradykininによるNO産生量を集計した。図11AはbaselineのNO産生量を示す。この図からも分かるように、虚血腎のbaselineは対照群やAS-ODN-ORF前投与群と比較して有意に高かった。これに対して、bradykinin注入後のNO産生量は、虚血腎では著しく抑制されていたが、AS-ODN-ORF前投与群では対照群とほぼ同じ程度に保存されていることが確認された。以上より、AS-ODN-ORFは機能的にはcNOSに何ら影響しておらず、AS-ODN-ORFはiNOSを選択的にブロックしていることが確認された。また、図10Cでの記録では、L-NAME i.v. 後図10A、Cと同じ程度にまで下降していないが、これは電極の特性によるものと考えられる。即ち、本NO電極はガス状物質を効率よく補足するために電極表面をポルフィリンによりコートしているため、ピーク値はNO産生量を反映しているが、ピーク後の値は、電極表面からのNOの消失が実はそれ程スムーズではないため、この部分での評価は正確さを欠くため、このような差が生じる結果となっている。

最後に、AS-ODN-ORFの効果を病理組織標本で検討した。図12に示したように、AS-ODN-ORFは、主に虚血性急性腎不全における尿細管壊死及びbrush border membrane喪失、尿細管細胞による円柱形成を軽減する作用があることが示された。

## 考察

NO及びその代謝物である過酸化窒素の障害性は、動脈硬化の促進作用<sup>35</sup>、リンパ芽球細胞でのmutation作用やDNA障害作用<sup>36</sup>、脂質の過酸化作用<sup>36</sup>などの細胞レベルでの障害作用、種々のウィルス性脳炎による細胞障害<sup>36</sup>などにおいて報告されてきた。我々の*in vitro*の実験系でも、過酸化水素を用いた低酸素性の障害やLPSを用いたendotoxemicな刺激により、明らかにNOの代謝産物であるNO<sub>2</sub>産生は上昇し、過酸化水素を用いた場合には死細胞数の増加、即ち細胞障害性が確認された。*In vivo* では、虚血再灌流モデルでのNOによる障害作用が神経<sup>37</sup>、心臓などの臓器で示されてきた<sup>38,39</sup>。一方腎臓では、近年、腎尿細管上皮細胞におけるNOの細胞障害作用がhypoxia-reperfusionモデルで報告されている<sup>11</sup>。そこで、従来より用いられているL-NAMEやL-NMMAなどのLアルギニンアナログのNOの抑制剤を用いると、これらは*in vitro*の実験系では抗炎症効果を示し、特に、低酸素性の障害に対して腎上皮細胞を保護する効果が認められたが、不思議なことに*in vivo*で種々の急性腎不全モデルにL-NAMEやL-NMMAを投与すると、いずれも急性腎不全が増悪することが報告されていた。既に知られているように、腎臓では、cNOSのうちconstitutive isoformは血管内皮とIMCDに発現が認められ、neuronal isoformはmacula densaに限局し、iNOSは近位尿細管やメサングウム細胞に発現していることが報告されている<sup>11,12,13</sup>。つまり、3種類のNOSの分布は、機能分担に応じて異なった局在を示していると想定される<sup>16,40</sup>。*in vitro*での結果からの予想に反して、急性腎不全モデルにL-NAME及びL-NMMAを投与すると、むしろ増悪効果が生じてしまう最大の原因は、Lアルギニンアナログが非選択的にNOSを抑制してしまうため、このような3種類のNOSの機能的分担を非選択的に全て抑制したために生じている可能性が推測された。antisense oligodeoxynucleotideは、目的とした遺伝子の発現を、遺伝子配列に基づいて特異的に抑制することができ、実験の解析や治療効果からの病因の検討に極めて有用な方法である<sup>41</sup>。我々はiNOSの発現を選択的に抑制するantisense oligodeoxynucleotideを設計し、phosphorothioated derivativesとした。Phosphorothioated oligodeoxynucleotidesは、従来のantisense oligodeoxynucleotideと比べて細胞膜の透過性が良好で、しかもantisense oligodeoxynucleotideがRNA-DNA duplex形成して遺伝子配列を抑制している際に、RNA配列側を破壊しようとするribonuclease Hに耐性であるといった特徴があることが知られている<sup>42</sup>。実際、ここで用いたantisense oligodeoxynucleotideは、明ら

かに細胞内に取り込まれ、しかも目的としたタンパクの発現の低下がGriess反応を用いたNO<sub>2</sub>産生、NADPH diaphorase染色法により確認された。また、phosphorothioated oligodeoxynucleotidesの細胞毒性は、従来のantisense oligodeoxynucleotideとの比較で高いといわれているが、Live & dead assayによる検討ではphosphorothioated oligodeoxynucleotidesで前処理した細胞群での細胞毒性は有意に高いものではなかった。

まず*in vivo*にphosphorothioated oligodeoxynucleotidesを投与すると、経時的に腎臓での取り込みが促進されるが、ここで興味深いことにbrush border membraneへのantisense oligodeoxynucleotideの結合が早期から認められる。この現象については、Klotmanらが、詳細にphosphorothioated oligodeoxynucleotidesの腎臓での動態を検討しているが、その中でも同様の観察について触れられており、異なった配列でも生じるという観点から、ここで我々が用いたantisense oligodeoxynucleotide配列に特異的な現象と考えるよりも、少なくともphosphorothioated oligodeoxynucleotidesそのものの性格であると推察される<sup>44</sup>。また、早期においては、尿細管細胞内にはphosphorothioated oligodeoxynucleotidesの取り込みは認められないところから、この結合については糸球体濾過されて瞬時に結合したものであろうと考えた。

我々が設計したantisense oligodeoxynucleotideの効果は、結果から明らかのように、選択的にiNOSの発現が抑制されるので虚血性急性腎不全による腎障害の程度は軽く、これに対して非選択的抑制剤L-NAMEを前投与しておく、既報告のように却って増悪することが示された。非選択的NO抑制剤L-NAMEもiNOSの発現を抑制するので、虚血再灌流による腎障害を抑制する作用があるはずであるが、cNOSも同時に抑制してしまうので、そのための増悪効果のほうが主体となってしまったと考えられた。明らかにこれはNOSの機能分担の存在を示すもので、腎障害の程度はiNOSと相関し、一方腎障害からの回復はcNOSと相関することを示唆するものである。

虚血再灌流障害時の腎におけるcNOSの発現については、CongerとWeilはマウスのモノクローナル抗体を用いた検討で、cNOSの発現が虚血腎の血管内皮細胞で有意な強い発現を認めるとしている<sup>44</sup>。本検討では抗体の特異性のためか対照腎、虚血腎、antisense腎で有意な差が認められなかったが、NO微小電極による検討では、虚血腎でのbradykininによるNO産生は僅かであり、cNOSの発現が虚血腎で既に増強しているため、更にbradykininを負荷してもNO産生が得られないものと推察された。

従来より用いられているphosphodiester oligodeoxynucleotidesと比較してphospho-



rothioated oligodeoxynucleotidesの排泄経路及び臓器分布は腎臓が主であることが知られており、しかもphosphorothioated oligodeoxynucleotidesは近位尿細管に蓄積しやすいことも報告されている<sup>43</sup>。腎光顕組織標本の morphological scoring からは、AS-ODN-ORF前投与で示された腎保護作用は、尿細管壊死の軽減、尿細管内に脱落した尿細管上皮細胞の減少、これによる尿細管拡張や間質浮腫の軽減、brush border lossの減少で、主に腎尿細管上皮細胞の虚血再灌流モデルにおける致死的細胞障害が、防がれたためであると推測される。このような組織学的な検討より、アンチセンス療法のターゲットが、虚血再灌流障害を被りやすい近位尿細管上皮細胞であったことが効を奏し、通常の*in vivo*投与量<sup>43,46</sup>の約1/10である1 mg/kgのphosphorothioated oligodeoxynucleotides投与で十分な治療効果を得ることができたものと思われる。また、NOは蛋白合成やDNA合成を抑制することが報告されているので<sup>47,48</sup>、AS-ODN-ORFによるアンチセンス療法がこのような機転も抑制して虚血再灌流による腎障害が軽度となった可能性も考えられる。

本研究では、iNOSをターゲットとして、アンチセンス療法を初めて急性腎不全モデルで試みその効果を報告した。近年では、iNOS遺伝子のTATA box から55塩基対ほど上流に、転写因子NF- $\kappa$ Bの結合領域が存在することがわかっている<sup>49,50</sup>。それによると細胞質ではNF- $\kappa$ B:I $\kappa$ B複合体として存在するが、これが活性酸素やサイトカイン（IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ ）などにより活性化されたprotein kinaseの作用でリン酸化されると、NF- $\kappa$ Bの核内移行が促進されてiNOS上の結合部位に結合し、iNOSの発現が開始する<sup>51,52,53</sup>。従って、iNOS遺伝子のこの部分を特異的にブロックして、iNOSの産生を抑制することも可能で、同様のアンチセンス療法として期待される。

以上のような、虚血再灌流モデルでの、iNOSをターゲットとしたアンチセンス療法の効果は、移植腎で血流再灌流後早期に生じる急性尿細管壊死の問題を克服する可能性があり、臨床的にも価値の高い結果であると考えられる。また本研究では、iNOSに対するアンチセンス療法の効果を虚血再灌流モデルでのみ検討したが、造影剤による急性腎不全モデル、グリセオールにより生じた横紋筋融解壊死による急性腎不全モデル、シスプラチンによる急性腎不全モデルなどでの検討も期待される。更に、iNOSが関わるその他の病態としては、糸球体腎炎でもnephrotoxic serumによる腎炎、Thy-1腎炎では既にNOの関与が示唆されており<sup>54,55,56,57</sup>、これをターゲットとしたアンチセンス療法が有効である可能性が示唆される。

## まとめ

- 1) iNOSの開始コドンターゲットにしたantisense oligodeoxynucleotideをヒトcDNAをもとに作製し、BSC-1細胞で細胞取り込みを確認。更にLPS、過酸化水素水によるNO産生に対する抑制効果を検討した。
- 2) Open reading frame内のconserved sequenceをターゲットとし、しかもラット及びマウス、ラット腎特異的iNOSにホモロジーを有するantisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN-ORF) の前投与により、虚血性急性腎不全モデルでの著しい腎機能の改善を認めた。
- 3) 虚血性急性腎不全モデルにおいて、L-NAMEは全く治療効果を示さず、むしろ増悪効果があった。
- 4) Bradykininにより誘発されるcNOS由来のNO産生はAS-ODN-ORFを投与した場合でも、保存されることより、このoligodeoxynucleotideのiNOSに対する選択性が確認された。
- 5) AS-ODN-ORFの虚血性急性腎不全モデルでの腎保護作用は、腎尿細管壊死を防ぐことであることが形態学的評価より示された。

## 結論

虚血性急性腎不全モデルでは、iNOS由来のNOが腎尿細管に対する細胞障害性に働くことが病態の成因の鍵を握っており、これを選択的に抑制する方法としてのアンチセンス療法を提示し、その効果を報告した。

## 参考文献

- 1 Hellberg POA, Källskog Ö, Wolgast M: Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Difference between the cortex, outer and inner medulla. *Kidney Int* 40: 625-631, 1991
- 2 Riley AL: Effect of ischemia on renal blood flow in the rat. *Nephron* 21: 107-113, 1978
- 3 Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW: Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circ Res* 37: 558-568, 1975
- 4 Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW: Nephron stop-flow pressure response to obstruction for 24 hours in the rat kidney. *J Clin Invest* 53: 1479-1500, 1974
- 5 Finn WF, Arendshorst WJ, Gottschalk CW: Pathogenesis of oliguria in acute renal failure. *Circ Res* 36: 675-681, 1975
- 6 Toback GF: Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 41: 226-246, 1992
- 7 Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W: Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42: 1017-1019, 1992
- 8 Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F: Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. *J Clin Invest* 90: 659-665, 1992
- 9 Markewitz BA, Michael JR, Kohan DE: Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *J Clin Invest* 91: 2138-2143, 1993
- 10 Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW: Nitric oxide: A mediator in rat tubular hypoxia / reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1691-1695, 1994
- 11 Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M: Nitric oxide and prostanooids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest* 94: 1069-1075, 1994
- 12 Schwartz D, Blum M, Peer G, Wollman Y, Marce A, Serban I, Grosskopf I, Cabili S, Levø Y, Iaina A: Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 267: F374-379, 1994
- 13 Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, Lopez P, Mendoza S, Garcia-Torres R, Alvarado JA, Herrera-Acosta J: Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 46: 773-779, 1994
- 14 Knowles RG and Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258, 1994
- 15 Marletta MA: Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37: 1899-1907, 1994
- 16 Bachmann S, Bosse H, Mundel P: Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 268: F885-F898, 1995
- 17 Wagner RW: Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372: 333-335, 1994
- 18 Noiri E, Peresleni T, Srivastava N, Weber P, Bahou WF, Peunova N, Goligorsky MS: Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in

- epithelial cells. *Am J Physiol* 270: C794-C802, 1996
- 19 Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER: Purification and cDNA sequences of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 32: 11600-11605, 1993
  - 20 Altshul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410, 1993
  - 21 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138, 1982
  - 22 Tuszyński GP and Murphy A: Spectrophotometric quantitation of anchorage dependent cell numbers using the bicinchoninic acid protein assay reagent. *Anal Biochem* 184: 189-191, 1990
  - 23 Vincent S and Kimura H: Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-758, 1992
  - 24 Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC: Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 46: 653-665, 1994
  - 25 Lyons CR, Orloff G, Cunningham JM: Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267: 6370-6374, 1992
  - 26 Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S: Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 89-94, 1993
  - 27 Noiri E, Gailit J, Sheth D, Magazine H, Gurrath M, Muller G, Kessler H, Goligorsky MS: Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 46: 1050-1058, 1994
  - 28 Ichimori K, Ishida H, Fukabori M, Nakazawa H, Murakami E: Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-sensitive electrode. *Rev Sci Instrum* 65: 1-5, 1994
  - 29 Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Rees DD: Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br J Pharmacol* 98: 646-652, 1989
  - 30 Conger J, Shultz M, Miller F, Robinette J: Responses to hemorrhagic arterial pressure reduction in different ischemic renal failure models. *Kidney Int* 46: 318-323, 1994
  - 31 Moncada S and Higgs EA: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2019, 1993
  - 32 Markert M, Carnal B, Maüel J: Nitric oxide production by activated human neutrophils exposed to sodium azide and hydroxylamine: the role of oxygen radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1245-1249, 1994
  - 33 White R, Brock T, Chang Y-L, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley W, Gianturco S, Gore J, Freeman B, Tarpey M: Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1044-1048, 1994
  - 34 Nguyen T, Brunson D, Crespi C, Penmann B, Wishnok J, Tannenbaum S: DNA damage and mutation in human cells exposed to NO in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3030-3034, 1992

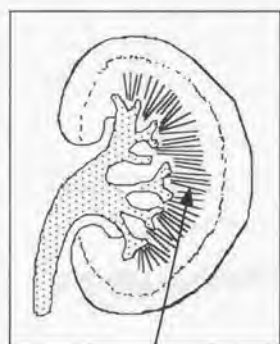
- 35 Radi R, Beckman J, Bush K, Freeman B: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481-487, 1991
- 36 Kaporowski H, Zheng Y, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu Z, Hanlon K, Dietzschold B: In vivo expression of inducible NO synthase in experimentally induced neurological diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3024-3027, 1993
- 37 Malinsky T, Bailey F, Zhang Z, Chopp M: Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 355-358, 1993
- 38 Dinerman J, Lowenstein C, Snyder S: Molecular mechanism of nitric oxide regulation: Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 73: 217-222, 1993
- 39 Patel VC, Yellon DM, Singh KJ, Neild GH, Woolfson RG: Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 234-238, 1993
- 40 Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA: Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885, 1994
- 41 Gold L: Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem* 270: 13581-13584, 1995
- 42 Helene C, Toulme JJ: Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochem Biophys Acta* 1049: 99-125, 1990
- 43 Rappaport J, Hanss B, Kopp JB, Copeland TD, Bruggeman LA, Coffman TM, Klotman PE: Transport of phosphorothioate oligonucleotides in kidney: Implications for molecular therapy. *Kidney Int* 47: 1462-1469, 1995
- 44 Conger JD, Weil JV: Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investig Med* 43: 431-442, 1995
- 45 Agrawal S, Tamsamani J, Tang JY: Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7595-7599, 1991
- 46 Cossum PA, Sasmor H, Dellinger D, Truong L, Cummins L, Owens SR, Markham PM, Shea JP, Crooke S: Disposition of the <sup>14</sup>C-labeled phosphorothioate oligodeoxynucleotide ISIS 2105 after intravenous administration to rats. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 1181-1190, 1993
- 47 Nussler AK and Billiar TR: Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukocyte Biol* 54: 171-178, 1993
- 48 Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, et al: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254: 1001-1003, 1991
- 49 Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russel SW, Murphy WJ: Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9730-9734, 1993
- 50 Xie Q-W, Whisnant R, Nathan C: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial

lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177: 1779-1789, 1993

- 51 Hayashi T, Sekine T, Okamoto T: Identification of a new serine kinase that activates NF kappa B by direct phosphorylation. *J Biol Chem* 268: 26790-26795, 1993
- 52 Li C-C, Dai RM, Chen E, Longo DL: Phosphorylation of NF-kB1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding. *J Biol Chem* 268: 30089-30092, 1994
- 53 Li S and Sedivy JM: Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9247-9251, 1993
- 54 Cook HT, Ebrahim H, Jansen A S, Foster GR, Largen P, Cattell V: Expression of the gene for inducible nitric oxide synthase in experimental glomerulonephritis in the rat. *Clin Exp Immunol* 97: 315-320, 1994
- 55 Ferrario R, Takahashi K, Fogo A, Badr KF, Munger KA: Consequences of acute nitric oxide synthesis inhibition in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 4: 1847-1854, 1994
- 56 Narita I, Border WA, Ketteler M, Noble NA: Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 72: 17-24, 1995
- 57 Waddington S, Cook HT, Reaveley D, Jansen A, Cattell V: L-arginine depletion inhibits glomerular nitric oxide synthesis and exacerbates rat nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 49: 1090-1096, 1996

图1

## Heterogeneity of blood flow due to tubular obstruction



Congestion

• Hypoxia-reperfusion injury



• Oxidative stress



• Renal tubular damage

Cell swelling

Cell exfoliation



• Tubular obstruction

Outer-medulla



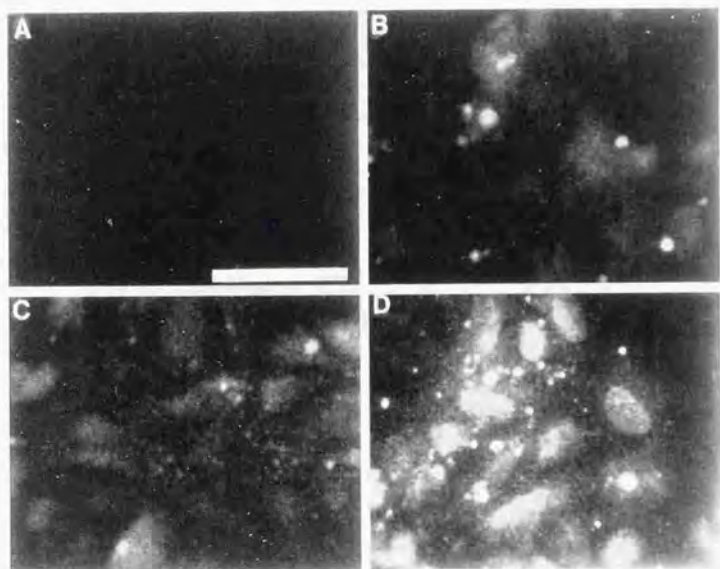
• Inappropriate blood flow

Interlobular artery ↓

Vascular bundle ↑



図2 誘導型NOSに対するビオチン化アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドのBSC-1細胞への取り込み



A: Control (無添加)

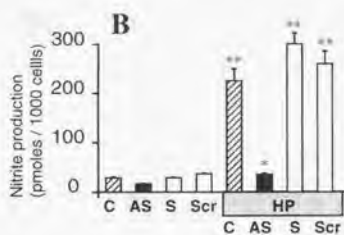
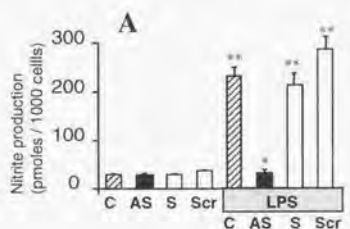
B: 1 μM投与群

C: 5 μM投与群

D: 10 μM投与群



図3 LPS及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により誘導されたNO産生に対するiNOSをターゲットとしたアンチセンス療法の効果

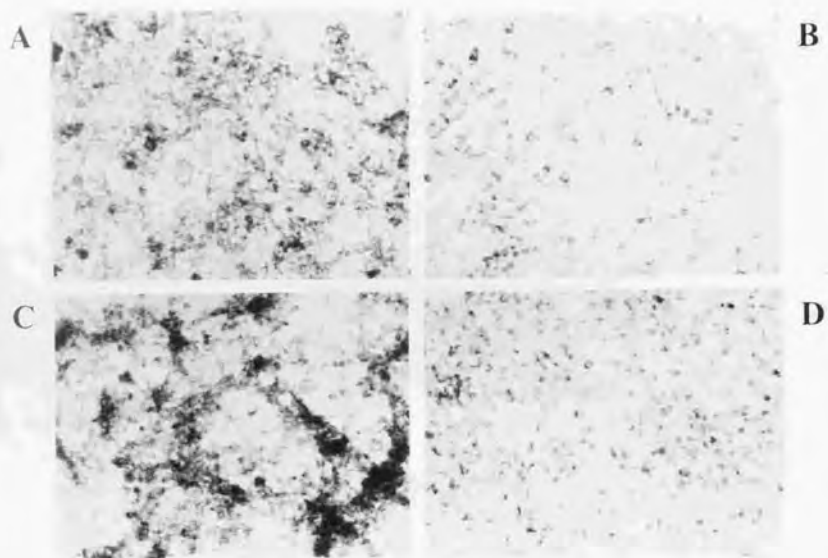


\*\*  $p < 0.05$ ; C vs HP+C, S vs HP+S, Scr vs HP+Scr

\*  $p < 0.05$ ; AS vs HP+C, HP+S, HP+Scr

Data are means  $\pm$  SE of 4 separate experiments, each performed in triplicate.

図4 BSC-1細胞でのNADPH-diaphorase染色



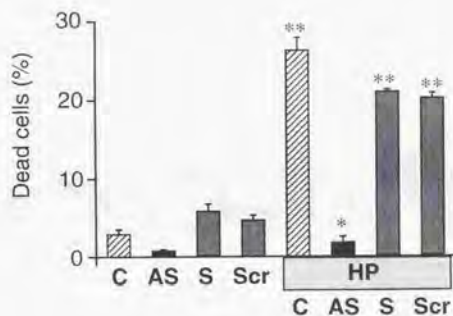
A: Control

C: 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与群

B: アンチセンス10 μM投与群

D: アンチセンス10 μM投与群+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与群

図5 オリゴヌクレオチドの細胞毒性の検討と酸化ストレスに対する効果



\*\*  $p < 0.05$ ; C vs HP+C, S vs HP+S, Scr vs HP+Scr  
 \*  $p < 0.05$ ; AS vs HP+C, HP+S, HP+Scr

Data are means  $\pm$  SE of 4 separate experiments, each performed in triplicate.

図6 誘導型NOSに対するビオチン化アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの腎臓への取り込み

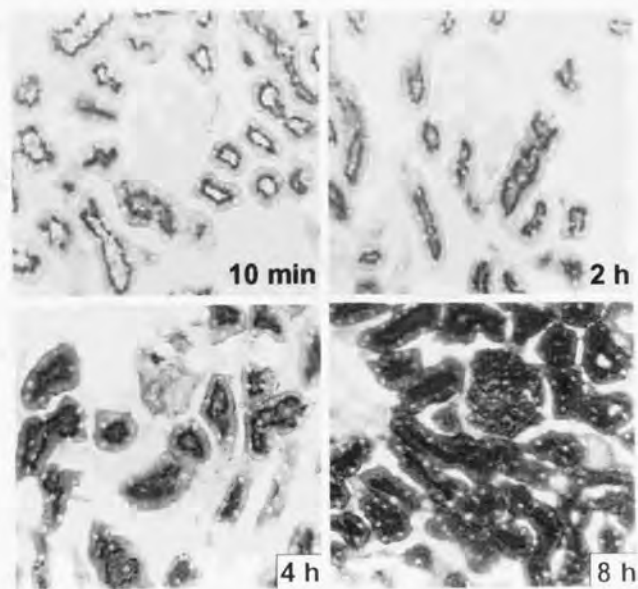
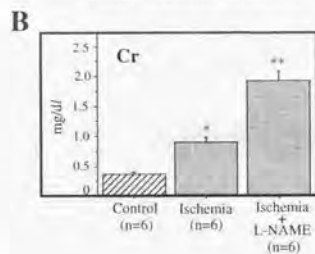
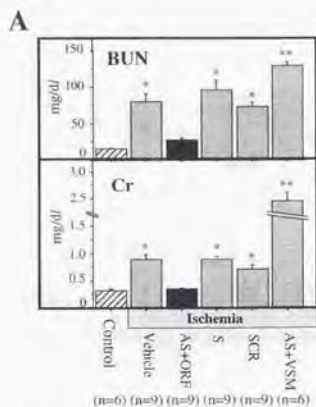


図7 オリゴデオキシヌクレオチドまたはL-NAMEの  
虚血性急性腎不全に対する効果



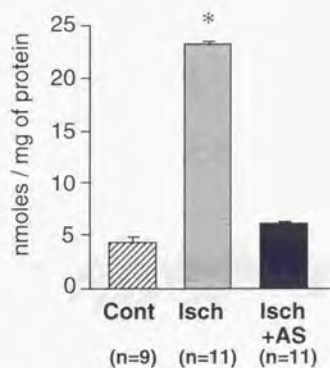
オリゴデオキシヌクレオチドまたはL-NAMEは手術2時間前に投与した。

\*  $p < 0.05$ ... 対照群(Control)との比較

\*\* $p < 0.05$ ... 該当項目以外の全てとの比較

図8 アンチセンスオリゴヌクレオチドによる  
誘導型NOS抑制効果の確認

A 皮質尿細管でのNO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生の検討



B Westernによる腎ホモジネートでのiNOS  
発現の検討

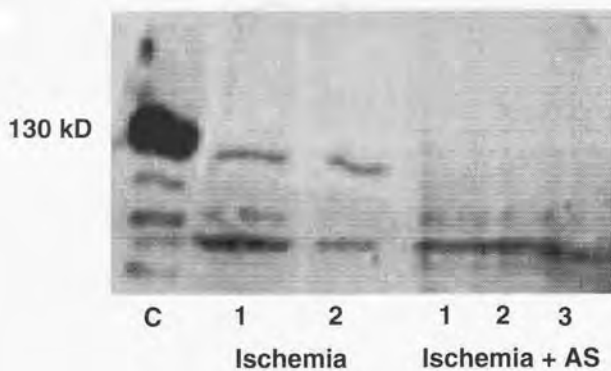


図9 正常腎 (A,B)、虚血腎 (C,D)、アンチセンス治療腎 (E,F) におけるiNOS (A,C,E) とcNOS (B, D,F) の免疫組織染色

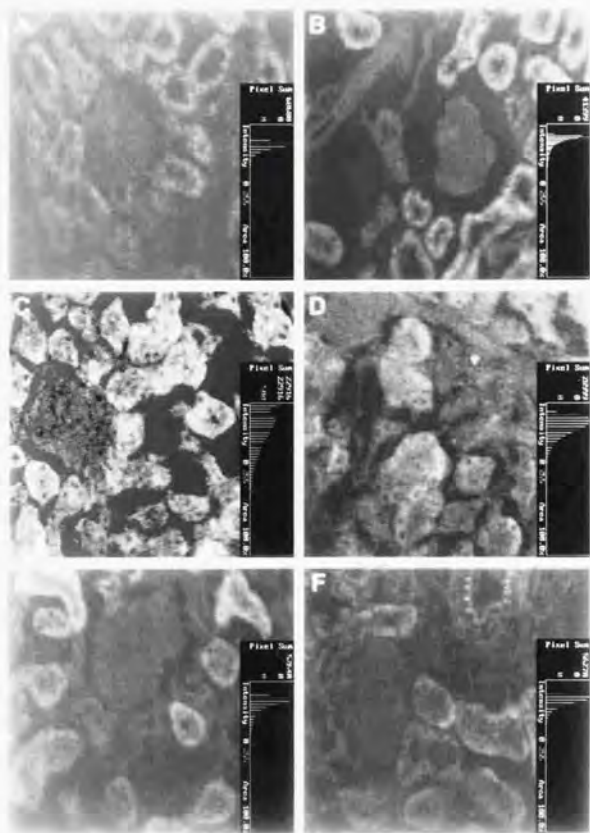
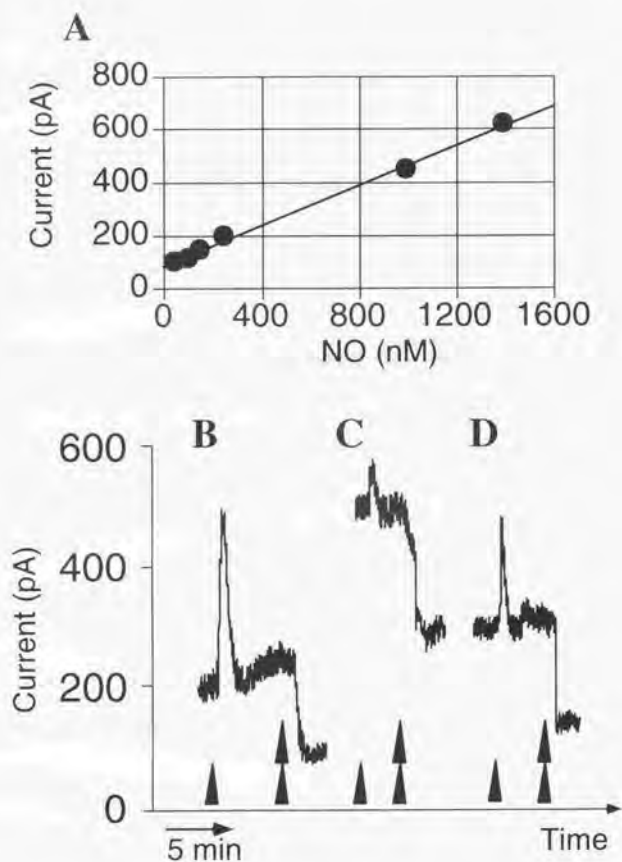


図10 NO微小電極による腎皮質でのNOモニター

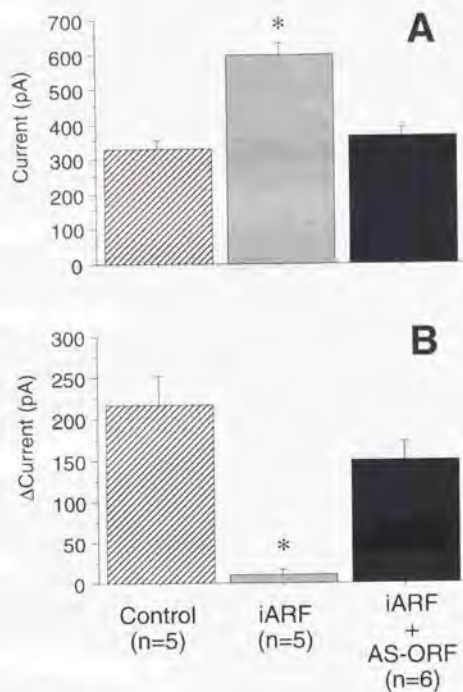


A: キャリブレーションカーブ  
 B: 正常腎(sham)での記録  
 C: 虚血腎(未治療)での記録  
 D: アンチセンス治療腎での記録

▲ プラジキニン 25nmol / 100 g, i.v.  
 ▲ L-NAME 50  $\mu$ mol / 100 g, i.v.



図11 腎皮質におけるNO由来の電流とブラジキニンにより誘発された電流上昇

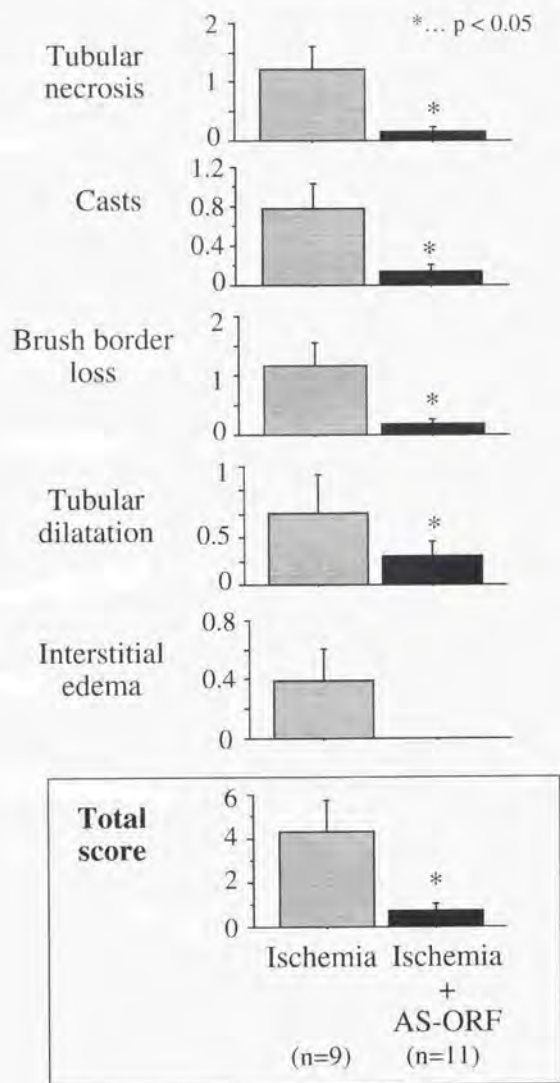


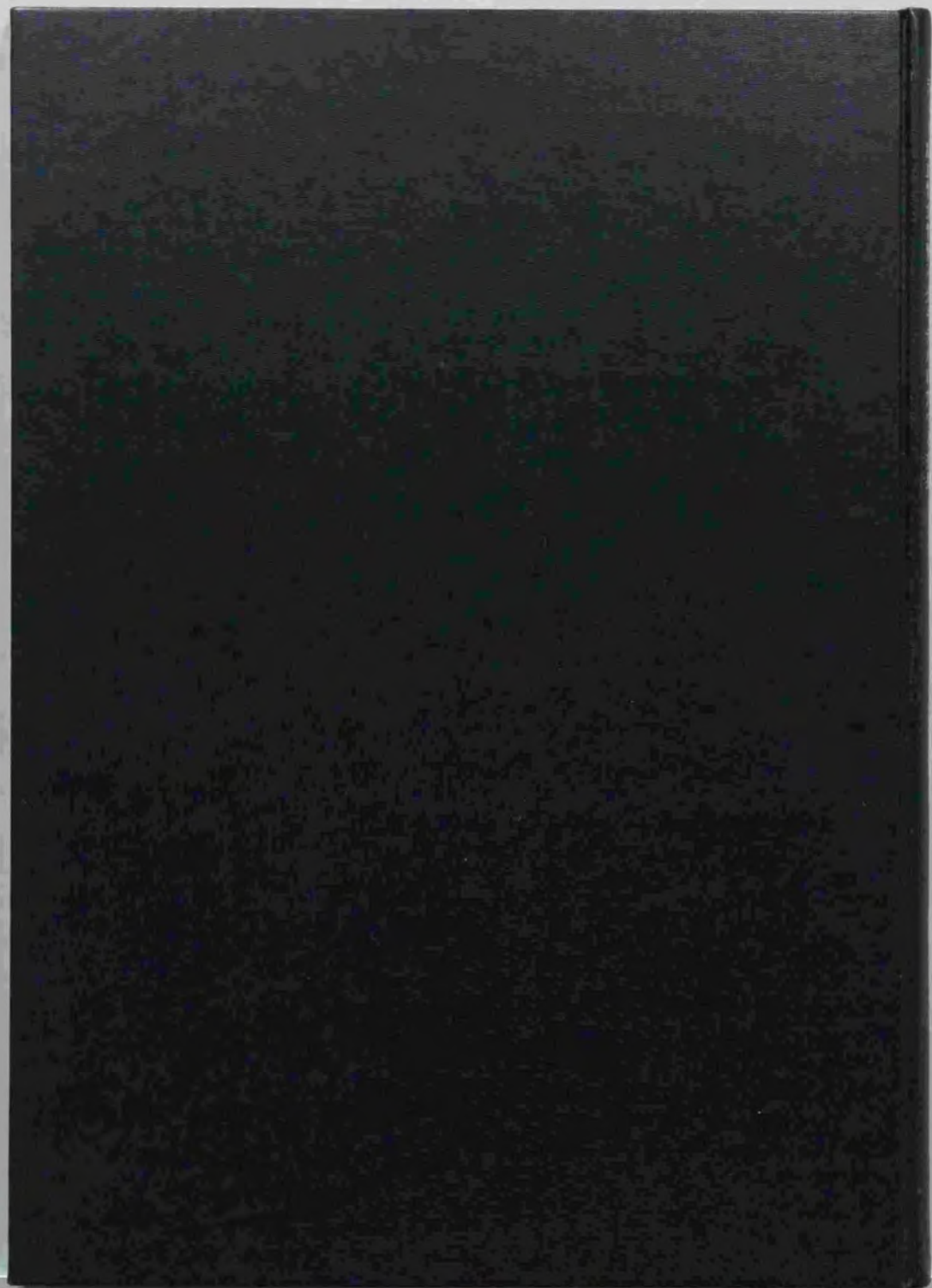
A: 正常腎(sham)、虚血腎、アンチセンス治療腎の皮質における電流のベースライン

B: ブラジキニンによって誘発されたcNOS由来の増加電流

\*  $p < 0.05$ を示す。

図12 Pathological scoringによる虚血腎とアンチセンス治療腎の組織学的検討







**Kodak** Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak