

## 論文の内容の要旨

論文題目 虚血性腎障害後の CKD 進展のメカニズムについての検討

氏名 真弓健吾

### 1. 背景

2004年に急性腎障害(Acute Kidney Injury; AKI)の概念が提唱されて以降、AKIの疫学や病態解明を目的とした多くの臨床研究が行われるようになり、その高い発症率、死亡率が注目されることとなった。さらに、AKIの長期予後に関するメタアナリシスで、一過性AKIであっても慢性腎臓病(Chronic kidney disease; CKD)および末期腎不全(end stage renal disease; ESRD)への進展頻度は高く、そのハザード比はそれぞれ8.82、3.10と高率であることが示され、AKI後にCKDへ進展するAKI to CKD transitionという概念が誕生した。AKI to CKD transitionの発症メカニズムをテーマとした基礎研究は多くされているが、採用されている動物モデルが報告により様々であり、臨床におけるAKIを再現できている動物モデルかどうかの判断は常に必要となる。腎虚血再灌流障害は臨床における腎性AKIの原因として多いことから動物モデルとして採用される頻度も高いが、腎虚血再灌流障害を誘導する方法も様々ある。すなわち、両側腎動脈遮断、片側腎動脈遮断、片側腎動脈遮断+対側腎摘出を行うモデルが報告されており、さらに腎動脈の遮断時間と腎障害の程度を検討した報告や、腎動脈、腎静脈、腎動静脈の3種の遮断方法で腎障害の程度を検討した報告がある。このように腎虚血再灌流障害モデルの作成方法は様々であるが、動物モデル間で比較検討した報告は数少なく、どういった動物モデルが適しているかの検討も十分できていないのが現状である。

### 2. 研究の要旨

#### 実験1. AKI to CKD transitionを再現可能な2種類の腎虚血再灌流障害モデルの作成

8-10週齢のC57BL/6雄マウスを2群に分け、30分間の片側腎虚血再灌流障害を加えたUIR群と片側腎虚血再灌流障害後1週間後に対側腎臓摘出を行ったモデル(UIR+Nx群)を作成した。血清学的評価でのBUNはUIR+Nx群では上昇していたが、UIR群では上昇していなかった。腎間質の線維化領域はUIR+Nx群ではUIR群に比して有意に軽減していた。

Phenylhydrazine chloride投与による貧血誘導に対する虚血腎でのEPO-mRNA発現量は

UIR+Nx 群の方が UIR 群よりも高値であったが、血清エリスロポイエチン濃度は非虚血側腎が存在する UIR 群で有意に UIR+Nx 群よりも高値であった。

## 実験2. 腎虚血再灌流障害後亜急性期の傍尿細管毛細血管(PTC)血流量の評価

虚血腎の亜急性期評価のために腎虚血再灌流障害後7、8、9、10日目に多光子励起レーザー顕微鏡を用いて、PTCの観察を行った。UIR群は7、8、9、10日目全てにおいてsham群と比べてPTC血流速度は有意に低下していたが、UIR+Nx群では腎摘6時間後、1日後でsham群より有意にPTC血流速度は上昇し、その後もsham群と比べて有意な低下を認めなかった。PTC血管径はUIR群で7、8、9、10日目全てにおいてsham群と比べて有意に低下していた。一方、UIR+Nx群では腎摘6時間後、腎摘1日後(8日目)でsham群と有意差を認めなかったが、その後徐々に低下し、9、10日目では有意に低値となった。UIR+Nx群とUIR群との比較では測定期間中は有意にUIR+Nx群の方がPTC血管径は高値であった。PTC血流量は7、8、9、10日目全てにおいてUIR群はsham群と比べてPTCの血流量は有意に低下していた。一方、UIR+Nx群では腎摘6時間後、腎摘1日後(8日目)でsham群より有意にPTCの血流量は上昇したが、9、10日目にはsham群と比べて有意に低下した。UIR群との比較では測定期間中のPTC血流量は有意に高値であった。

## 実験3. 腎虚血再灌流障害後亜急性期の線維化関連因子の評価

UIR群とUIR+Nx群間での間質線維化マーカーの遺伝子発現を評価するため、腎虚血再灌流障害後7、8、10、14日目に虚血腎でのTGF- $\beta$ 1 mRNAの発現量を測定した。両群ともにSham群に比べて高値であったが、UIR+Nx群は10、14日目においてUIR群より有意にTGF- $\beta$ 1 mRNA発現量が低値であった。次に腎虚血再灌流障害後のCell cycle arrestの評価するため、腎虚血再灌流障害後7、10、14日目に採材した腎臓組織を用いて抗Ki67抗体、抗pH3抗体による免疫抗体染色およびTOPRO-3による核染色を行ったところ、抗pH3抗体陽性細胞/抗Ki-67抗体陽性細胞の比は10、14日目ともにUIR群に比してUIR+Nx群で低値となった。

## 実験4. Infra-renal aortic constriction model (IRAC) におけるPTC血流の評価と腎虚血再灌流障害後の腎間質の線維化に対する効果

PTC血流量を増加させる動物モデルとして心肥大モデルとして知られているIRACモデルを作成した。8-10週齢のC57BL/6雄マウスに対しIRACを施行したところ、IRAC施行4週後の心重量はSham群に比してIRAC群で有意に増加していた。多光子励起レーザー顕微鏡によるPTC観察ではIRAC施行6時間後にsham群と比べてPTC血流量は有意に上昇し、

その後7日目まで同様の状態が持続していた。次に片側腎虚血再灌流障害モデル(UIR 群)と片側腎虚血再灌流障害1週間後にIRACを施行したモデル(UIR+IRAC 群)を作成し、PTC血流量増加が腎虚血再灌流障害後の腎間質の線維化に及ぼす影響を検討した。腎虚血再灌流障害28日後のUIR+IRAC 群の腎重量はUIR 群よりも有意に増大し、腎間質の線維化領域はUIR+IRAC 群ではUIR 群よりも有意に軽減していた。虚血腎におけるTGF- $\beta$ 1 mRNA 発現量はUIR+IRAC 群で10、14日目においてUIR 群より有意に低値であった。次に腎虚血再灌流障害14日後の抗pH3抗体陽性細胞/抗Ki-67抗体陽性細胞の比は、UIR 群に比してUIR+IRAC 群で低値となった。

### 3. 結語

本研究より同程度の腎虚血障害後の2つの動物モデルにおいて亜急性期(虚血障害7-14日後)のPTC機能、線維化関連因子の発現量、慢性期(虚血障害28日後)の間質線維化、エリスロポイエチン産生能に差異が存在することがわかった。また、亜急性期のPTC血流量の変化がAKI後の腎間質線維化の進展に影響していることを明らかとした。これらの違いよりAKI to CKD transitionの研究をするにあたり、動物モデルの選定は注意深く行う必要があると同時に、複数のモデルを用いることでAKI to CKD transitionの病態解明がより効率的に進められることが示唆された。