




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 4 4 5 号	氏 名	古賀 寛教
審査委員会委員	主査氏名	小野 克重	
	副査氏名	大橋 京一	
	副査氏名	佐藤 文憲	
<p>論文題目 Human Atrial Natriuretic Peptide Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury (ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドは腎虚血再灌流傷害を軽減する)</p> <p>論文掲載誌名 Journal of Surgical Research</p> <p>論文要旨 急性腎傷害は、周術期や集中治療領域においてしばしば認められる病態であり、特に、その要因として腎虚血再灌流傷害が第一に挙げられる。ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (hANP) は、様々な薬理作用を持つことが知られており、その1つとして腎保護作用を持つとされるが、腎虚血再灌流 (I/R) に対する効果やその機序について、詳細には解明されていない。本研究では、ラット腎虚血再灌流傷害モデルを用い、hANP の腎の保護作用を検討し、その機序の解明を目的とした。実験は Wistar 系雄性ラットを用い、腎虚血再灌流 (I/R) モデルを作成した。全身麻酔下、右腎を摘出し、左腎のクランプによる1時間の虚血と、デクランプ後24時間の再灌流を行った。I/R 群では、生理食塩水 1ml/kg/h で、hANP 群では、hANP 0.1 μg/kg/min で持続投与を行った。また、右腎摘みのみの Sham 手術を行い、生理食塩水を持続投与した正常コントロール群を設定した。3群とも、虚血前30分から投与開始し、再灌流終了後まで持続投与を行った。再灌流後、ラットを犠牲させ、血清尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ラジカルによる DNA 傷害の指標となる血清 8-OHdG レベルを測定。加えて、腎 HE 染色による組織学的評価と、電子顕微鏡による細胞傷害の評価を行った。また、RAW264.7 培養細胞を用い、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシン A を添加して、細胞内活性酸素種 (ROS) を増加させた酸化ストレスモデルを作成。hANP 投与による細胞内 ROS レベルに与える影響を、フローサイトメトリーを用いて検討した。さらに、in vitro において、ROS の中でも最も細胞傷害性の強いヒドロキシルラジカルを人為的に発生させ、hANP のラジカル消去能を電子スピン共鳴 (ESR) 装置を用いて評価した。その結果、腎 I/R モデルにおいて、I/R 群では、血清 BUN、Cre、8-OHdG の増加が認められたが、hANP によって抑制された。腎組織では、I/R 群で糸球体病変を伴う急性尿細管壊死像を認めたが、hANP 投与群では、こうした傷害が軽減されていた。また、電顕像では、I/R 群で、ミトコンドリアの膨化、微絨毛の崩壊といった形態学的変化をきたしていたが、hANP 群でその変化が軽減されていた。培養細胞モデルにおいては、アンチマイシン A 投与により、細胞内 ROS の著明な増加を認めたが、hANP 投与によってそのレベルは低下した。さらに、ESR 測定の結果、hANP は、用量依存性にヒドロキシルラジカルを消去した。これらの結果から、hANP がラットモデルにおいて腎の I/R 傷害を軽減することが明らかとなった。I/R における組織傷害は、再灌流に伴う大量の ROS の発生と、それに引き続く炎症反応やアポトーシス誘導が最も大きな原因とされている。特に、ミトコンドリアにおける ROS の過剰産生は、細胞の機能不全を起し細胞傷害へとつながる。こうした、酸化ストレスを抑えることが、I/R 傷害の予防、治療のキーポイントと考えられるが、本研究の結果から、hANP がラジカル消去作用を介した抗酸化作用を有し、そのことが腎 I/R 傷害の軽減につながったと考えられる。</p> <p>本研究は、hANP がラット腎 I/R 傷害を軽減することを証明するものである。その機序として、hANP が、I/R 傷害の要因となる ROS を消去する作用を持つこと、ミトコンドリア保護作用もつことが考えられた。このことは、hANP に各種 I/R 傷害に関連する病態に対する予防、治療薬としての可能性があることを示唆するものであり、審査委員の合議により本研究は学位論文に値するものであると判断した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 古賀 寛教

論 文 題 目

Human Atrial Natriuretic Peptide Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury

(ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドは腎虚血再灌流障害を軽減する)

要 旨

【緒言】

急性腎障害は、周術期や集中治療領域においてしばしば認められる病態であり、特に、その要因として腎虚血再灌流障害が第一に挙げられる。ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (hANP) は、様々な薬理作用を持つことが知られており、その1つとして腎保護作用を持つとされるが、腎虚血再灌流 (I/R) に対する効果やその機序について、詳細には解明されていない。本研究では、ラット腎虚血再灌流障害モデルを用い、hANP の腎の保護作用を検討し、その機序の解明を目的とした。

【研究対象及び方法】

Wistar 系雄性ラットを用い、腎虚血再灌流 (I/R) モデルを作成した。全身麻酔下、右腎を摘出し、左腎のクランプによる1時間の虚血と、デクランプ後24時間の再灌流を行った。I/R 群では、生理食塩水 1ml/kg/h で、hANP 群では、hANP 0.1 μ g/kg/min で持続投与を行った。また、右腎摘のみの Sham 手術を行い、生理食塩水を持続投与した正常コントロール群を設定した。3 群とも、虚血前 30 分から投与開始し、再灌流終了後まで持続投与を行った。再灌流後、ラットを犠死させ、血清尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ラジカルによる DNA 障害の指標となる血清 8-OHdG レベルを測定。加えて、腎

HE染色による組織学的評価と、電子顕微鏡による細胞障害の評価を行った。また、RAW264.7培養細胞を用い、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンAを添加して、細胞内活性酸素種(ROS)を増加させた酸化ストレスモデルを作成。hANP投与による細胞内ROSレベルに与える影響を、フローサイトメトリーを用いて検討した。さらに、*in vitro*において、ROSの中でも最も細胞障害性の強いヒドロキシルラジカルを人為的に発生させ、hANPのラジカル消去能を電子スピン共鳴(ESR)装置を用いて評価した。

【結果及び考察】

腎I/Rモデルにおいて、I/R群では、血清BUN、Cre、8-OHdGの増加が認められたが、hANPによって抑制された。腎組織では、I/R群で糸球体病変を伴う急性尿細管壊死像を認めたが、hANP投与群では、こうした障害が軽減されていた。また、電顕像では、I/R群で、ミトコンドリアの膨化、微絨毛の崩壊といった形態学的変化をきたしていたが、hANP群でその変化が軽減されていた。培養細胞モデルにおいては、アンチマイシンA投与により、細胞内ROSの著明な増加を認めたが、hANP投与によってそのレベルは低下した。さらに、ESR測定の結果、hANPは、用量依存性にヒドロキシルラジカルを消去した。

これらの結果から、hANPがラットモデルにおいて腎のI/R障害を軽減することが明らかとなった。I/Rにおける組織障害は、再灌流に伴う大量のROSの発生と、それに引き続く炎症反応やアポトーシス誘導が最も大きな原因とされている。特に、ミトコンドリアにおけるROSの過剰産生は、細胞の機能不全を起し細胞障害へとつながる。こうした、酸化ストレスを抑えることが、I/R障害の予防、治療のキーポイントと考えられるが、本研究の結果から、hANPがラジカル消去作用を介した抗酸化作用を有し、そのことが腎I/R障害の軽減につながったと考えられる。

【結語】

本研究では、hANPがラット腎I/R障害を軽減することを証明した。その機序として、hANPが、I/R障害の要因となるROSを消去する作用を持つこと、ミトコンドリア保護作用もつことが考えられた。このことは、hANPに、各種I/R障害に関連する病態に対する予防、治療薬としての可能性があることを示唆するものである。