

## 【42】

氏 名	辻 英 一
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第821号
学位授与の日付	令和4年2月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	<b>Beneficial effects of ischemic preconditioning on renal hemodynamics in ischemia-reperfused rat kidneys : Role of two nitric oxide synthase isozymes in ischemic preconditioned kidneys</b> <b>（ラット腎虚血再灌流における前虚血操作の血行動態改善効果：前虚血操作腎における、2種の一酸化窒素合成酵素アイソザイムの役割）</b>
論文審査委員	（主査）教授 福 田 宏 嗣 （副査）教授 吉 富 秀 幸 教授 徳 本 直 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

腎移植や大血管の手術の際には、一過性の腎虚血が起こる。血流再開後に腎臓及び他臓器に生じる組織機能傷害は、虚血再灌流障害（ischemia/reperfusion : I/R）と称され、虚血腎組織の酸化的傷害に起因する。それに先立って短時間前虚血操作（ischemic preconditioning : IP）を行なうと、I/Rの際に生じる酸化的傷害が軽減される。IPは、I/R後の微小血管系に血管拡張を引き起こすことが知られている。しかし、IPの有無によるI/R後の組織血行動態に関する正確なデータは、ほとんど報告されていない。一方、一酸化窒素（nitric oxide : NO）は、血管拡張において重要な役割を果たすが、IPの作用に寄与するNO合成酵素（NO synthase : NOS）のアイソザイムもまだ決定されていない。

#### 【目 的】

IPによるI/R後の組織血流量の経時的変化を正確に調べるために、ラット腎I/Rモデルを用いてI/R中の腎血行動態を直接観察・測定しクリアランス法による腎機能評価も併せて行い、これらに及ぼすIPの効果を確認した。また、IP直後とIP後再灌流後の腎組織における2種のNOSアイソザイム蛋白の発現状況をウエスタンブロッティングにより解析した。

#### 【対象と方法】

本研究は、米国学術研究会の実験動物取扱いに関する倫理指針に従って行われた。

体重250～280gの雄性Wistarラットを用いて、腎I/Rモデルを作成した。ラットをペントバルビター

ル50mg/kgの腹腔内投与により麻酔し、動脈血採取用のポリエチレンカテーテルを右大腿動脈に留置した。また、もう1本のポリエチレンカテーテルを右大腿静脈に留置して、3%イヌリンと1%パラアミノ馬尿酸 (para-aminohippurate : PAH) を含む生理食塩水を30mL/kg/hで輸液した。続いて正中切開で開腹し、両側腎門部・左腎前面・膀胱を露出した。両側腎動脈を単離して、虚血操作の際にはそれらのみに血管クリップを掛けた。左腎表面にドップラー血流計を密着させて腎血流量 (renal blood flow : RBF) を測定し、膀胱内にシリコンカテーテルを留置して尿量計測及び尿検体を採取した。輸液開始後60分とI/R後60分に、20分間のクリアランステストを行った。ラットを以下の5群 (各6匹) に分けて、それぞれのRBF、PAHクリアランスによる有効腎血漿流量 (effective renal plasma flow : ERPF)、及び、イヌリンクリアランスによる糸球体濾過量 (glomerular filtration rate : GFR) 腎血管抵抗 (renal vascular resistance : RVR) を測定した。1群 : 30分間の両側腎虚血後に再灌流した群、2群 : 40分間の両側腎虚血再灌流群、3群 : 5分間のIP後に30分間のI/R、4群 : 5分間のIP後に40分間のI/R、そして、5群 : 偽手術群。また、1群・3群・5群にIPのみ施行した群を追加して、各群の操作終了後に腎臓を摘出し、western blot (WB) 法によって、腎組織中のNOS-2 (inducible NOS : iNOS) 及びNOS-3 (endothelial NOS : eNOS) 発現量を測定した。

データは平均値±標準誤差で表記した。各群間の多重比較は分散分析による片側検定で行い、post hoc testにはScheffeの検定を用いた。P<0.05を有意とした。

## 【結 果】

IPなしの虚血群 (1群及び2群) では再灌流後のRBFが低下し続け、I/R前の値に戻ることはなかった。特に40分間虚血の2群では、1群に較べても有意に低下していた。一方、IPを加えた3群・4群では、再灌流後のRBFは両群とも著明に増加しており、90分後まで、ほぼ5群と同程度に保たれた。ERPFについては、I/R群 (1群 :  $3.3 \pm 0.4$  mL/min、2群 :  $2.3 \pm 0.3$  mL/min) で有意な低下が認められたが、IPにより有意に軽減 (3群 :  $5.3 \pm 0.8$  mL/min、4群 :  $4.6 \pm 0.6$  mL/min) された。GFRに関しても、同様 (1群 :  $0.5 \pm 0.1$  mL/min、2群 :  $0.3 \pm 0.1$  mL/min、3群 :  $1.4 \pm 0.2$  mL/min、4群 :  $1.0 \pm 0.2$  mL/min、5群 :  $2.2 \pm 0.2$  mL/min) であった。RVRはIP群で有意に改善した。またWB法により、正常腎組織ではNOS-3 (eNOS) のみ発現しており、5分間のIPのみではNOS-3の発現が増強するがNOS-2 (iNOS) は発現しないことが示された。I/R群では、IPの有無にかかわらず、NOS-3及びNOS-2ともに、発現が増強することが判明した。

## 【考 察】

過酸化水素や、超酸化物とNOの反応生成物であるペルオキシ亜硝酸等をはじめとする、過剰に産生された活性酸素が、I/R傷害による急性腎不全の病態に関与していることは知られている。細胞膜損傷による血管透過性の亢進と内膜障害による血管内凝固が起こり、微小循環が阻害される。報告されている抗酸化剤・抗炎症剤・血管拡張薬等のI/R傷害軽減効果は限定的であったが、IPの著明な循環動態改善効果は我々の既存の研究で明らかとなっている。本研究では、1群と2群の比較から、虚血時間の長さが再灌流後の血行動態回復の重要な因子であることが判明した。また、短時間 (5分間単回) のIPがI/R後のRBFやERPFを劇的に改善させ、その効果はより虚血時間の長い群 (40分I/R)

でも同様に認められた。他の研究でもNOの血管拡張効果および血管内膜保護効果が、I/R障害を改善させた報告がある。しかし、NOSアイソザイムのいずれがIP効果を発揮しているかは不明であった。今回われわれはIP後の腎組織中のNOSアイソザイムを評価した。その結果I/R後にはiNOSとeNOS両者の発現が増強したが、短時間のIPのみではeNOSの発現のみが増強されていた。従って、IPの血流改善効果の機序として、eNOSが重要な働きをしているものと推察された。

#### 【結 論】

ラット虚血再灌流腎においてはIPによりI/R後の腎機能、腎血流動態が改善された。またIP直後にeNOS蛋白が増加しこれはI/R後も発現が維持された。以上よりIP後のeNOS発現による血管拡張効果によって腎の血行動態が著明に改善された可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

腎移植や大血管手術の際に生じる外科侵襲のひとつに、一過性の臓器虚血に起因する組織機能障害、即ち、虚血再灌流 (ischemia/reperfusion : I/R) 障害がある。I/Rに先立って前虚血操作 (ischemic preconditioning : IP) を行なうと、I/Rの際に生じる酸化的障害が軽減されることが知られているが、その際の正確な組織血行動態や機序は報告されていない。申請論文では、それらを解明することを目的として、ラット腎I/Rモデルを用いて、I/R後の腎血行動態を直接観察・測定し、それに及ぼすIPの効果を確認している。また、各操作前後での腎組織における2種の一酸化窒素 (nitric oxide : NO) 合成酵素 (NO synthase : NOS) 発現も解析している。結果、1) I/R群では再灌流後の腎血流量が低下し続け、I/R前の値に戻ることはなかったが、IPを加えると同血流量は著明に改善し、90分後まで偽手術群とほぼ同等に保たれたこと、2) I/Rによって著明に悪化する有効腎血漿量、糸球体濾過量、腎血管抵抗値の何れもが、IP付加によって有意に改善したこと、3) I/RではNOS-2 (inducible NOS : iNOS) 及びNOS-3 (endothelial NOS : eNOS) 両者の発現が増強されたのに対して、IP単独ではNOS-3のみの発現が増強していたことを明らかにしている。これらの結果から、ラット虚血再灌流腎においてはIPによって誘導されたeNOSが微小血管拡張効果をもたらし、それによって腎の血行動態が著明に改善されている可能性がある」と結論づけている。

#### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、ラット腎I/Rモデルを用いている。腎血流量は左腎表面に密着したドップラー血流計により直接測定し、有効腎血漿量、糸球体濾過量等は標準的なクリアランステストより算出、また、NOS蛋白発現についても標準的なwestern blot (WB) 法によって確認している。対照群である偽手術群を適切に設定して、各群とも十分な数の実験を行なっている。各群の数値は、分散分析を含む客観的な統計解析手法によって比較検討されている。以上より、本研究方法は妥当なものである。

#### 【研究結果の新奇性・独創性】

I/R障害の本態は、虚血組織の酸化的障害である。心筋組織等では、IPによってI/R後の組織障害が軽減され、微小血管拡張が起こることが確認されている。しかし、生体においてI/RやIPが臓器機

能にもたらす影響の詳細やその機序は、明らかではない。申請論文では、著者らが前施設にて作製・確立してきた動物実験モデルを用いて、I/R、IPが腎機能に及ぼす影響を、初めて経時的に正確に報告している。また、血管拡張を来たす因子としてNOに着目し、各操作による2種のNOS発現の相違についても、初めて明らかにしている。この点において、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文では、対照群である偽手術群を適切に設定し、確立された実験手法を用いて、各群とも十分な数の実験を行っている。腎血流量、各種腎機能等の各種データは、適切な統計解析法によって分析されている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、生理学、生化学、外科侵襲学などの関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

I/R障害の軽減のため、これまでに各種薬剤投与が試みられてきたが、効果は限定的であった。これに対し、何ら薬物を用いないIPの劇的な軽減効果が、近年注目されている。申請論文は、主に生理的機能に着目してI/R、IPの機序の解明を試みてe-NOSの関与を示した初めての研究報告である。組織学的分析も加え、各種薬剤投与下での生理的機能の変動解析等を行えば、I/R、IP機序の更なる解明や軽減療法の開発に向けて、大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、前職の東京大学医学部附属病院で、一般外科学、消化器外科学、乳腺内分泌外科学を学び実践し、更に同大学院で代謝栄養外科学を専攻して、主に各種外科侵襲に関する研究を続けてきた。今回の実験に関しても、同大学の当該研究グループと十分に討論を重ねた上で作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は、本学医学雑誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### **【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

#### **(主論文公表誌)**

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(48 : 151-159, 2021)