



Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury : The role of nitroxyl anion

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高平, 玲子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1174

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 3 2 1 号	学位授与年月日	平成 1 3 年 3 月 2 7 日
氏 名	高 平 玲 子		
論文題目	<p>Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury : The role of nitroxyl anion (ラット腎虚血再灌流障害におけるデキサメタゾンの腎組織への好中球浸潤抑制効果：ニトロキシルアニオンの役割について)</p>		

博士(医学) 高平 玲子

論文題目

Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury: The role of nitroxyl anion

(ラット腎虚血再灌流障害におけるデキサメタゾンの腎組織への好中球浸潤抑制効果：ニトロキシルアニオンの役割について)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

好中球は組織の炎症・虚血などの侵襲時には、好中球および血管内皮細胞上に発現した接着分子の作用により血管外組織へ浸潤し、そこでサイトカイン等を放出して組織傷害をひき起こすことが知られている。腎虚血再灌流障害に腎組織への好中球浸潤が関与している証拠は多い。例えば腎虚血再灌流モデルで、好中球に発現する接着分子の一つであるCD11b/18に対するモノクローナル抗体(抗CD11b/18抗体)や血管内皮細胞に発現する接着分子の一つであるintercellular adhesion molecule (ICAM)-1に対する抗体(抗ICAM-1抗体)を投与し好中球浸潤を抑制した場合、組織傷害は軽減されることが証明されている。糖質コルチコイドは虚血再灌流時にICAM-1の発現抑制を介して局所への好中球浸潤を抑制し、組織傷害を軽減することが報告されているがその機序は不明である。

一酸化窒素(NO)は血管拡張物質として広く知られているが、好中球機能の調節作用も有している。しかし虚血再灌流障害におけるNOの役割については一定の見解はない。最近Maらはラット心虚血再灌流モデルにおいて、NOは好中球浸潤を抑制し再灌流障害を軽減させる一方で、NOの前駆物質であるニトロキシルアニオン(NO⁻)は好中球浸潤を促進し、再灌流障害を増悪させることを報告した。そこで我々はラット腎虚血再灌流モデルを用いて、糖質コルチコイドであるデキサメタゾンによる腎組織への好中球浸潤およびICAM-1の発現量の抑制がみられるか否か、そしてこれらの抑制がNO⁻の抑制を介しているかどうかを検討した。

〔材料ならびに方法〕

NO⁻供与物質であるtrioxodinitrate (Angeli's salt)を精製した。

雄SDラット220-320gの両側腎動静脈血流を血管クリップで40分間遮断後、再灌流した。ラットは以下のように6群に分類した。1) sham operation群(Control群)、2) dexamethasone投与群(Dex群)、3) 虚血再灌流群(I/R群)、4) Angeli's salt投与群(AS群)、5) dexamethasone投与+I/R+AS群。dexamethasone(1mg/kg/体重)は虚血60分前に静注し、Angeli's salt(3 μ mol/kg/体重)は再灌流5分前に静注した。60分の再灌流後に摘出した腎はRT-PCRを用いてICAM-1 mRNAの発現量を測定した。

組織学的には、エステラーゼ染色を行い200倍にて30視野あたりの腎組織への浸潤好中球数を計測した。24時間の再灌流後に摘出した腎はhematoxylin and eosin (H&E)染色を行い組織傷害の程度を壊死尿管数により評価した。また、再灌流24時間時の血清を用いてcreatinine (Cr)値を測定した。

〔結果〕

腎組織への好中球浸潤数はI/R群ではControl群に比し著明に増加していた(60 \pm 19 vs 15 \pm 7/30視野、 $p <$

0.0001)が、dexamethasoneの前投与にて有意に減少した(60 ± 19 vs $24 \pm 15/30$ 視野、 $p < 0.0001$)。しかしdexamethasoneの好中球浸潤抑制効果はAngeli's saltにて消失した。AS+Dex+I/R群ではDex+I/R群と比べ有意に増加していた(54 ± 18 vs $24 \pm 15/30$ 視野、 $p = 0.005$)。同様にICAM-1 mRNAの発現量はI/R群ではControl群に比べ増加し、Dex+I/R群ではI/R群に比し有意に減少していた。AS+Dex+I/R群ではControl群に比べ増加し、Dex+I/R群ではI/R群に比し有意に減少していた。AS+Dex+I/R群ではDex+I/R群と比べ有意に増加していた。Dex群およびAS群の好中球浸潤数、ICAM-1 mRNA発現量は、ともにControl群と比較し有意差はなかった。再灌流24時間後の血清Cr値はDex+I/R群とI/R群で有意差はなく($4.37 \pm 0.41 \text{ mg/dL}$ vs $4.15 \pm 0.78 \text{ mg/dL}$)、尿細管傷害の程度についても有意差を認めなかった。

〔結論〕

dexamethasoneにより好中球浸潤数およびICAM-1の発現量が抑制され、その抑制効果が NO^- 供与物質であるAngeli's saltにより消失したことから、腎虚血再灌流時のdexamethasone投与による好中球浸潤およびICAM-1 mRNA発現の抑制には NO^- が一部関与していることが示唆された。しかし組織傷害と腎機能障害はdexamethasone投与により軽減しなかった。この理由に関しては不明であるが、今回の研究で用いた腎虚血再灌流障害においては、1)好中球浸潤の腎虚血再灌流障害への関与は少ない 2)腎虚血再灌流障害を抑制するにはdexamethasone投与量が不十分である可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

組織における虚血再灌流においては、接着分子の発現増強によって好中球の浸潤が生じ、組織傷害を促進することが知られている。一方、一酸化窒素(NO)は血管拡張物質として知られているが好中球機能の調節作用もある。最近、 NO は好中球の浸潤を抑制して再灌流障害を軽減させるが、 NO の前駆物質であるニトロキシルアニオン(NO^-)は好中球の浸潤を促進し再灌流障害を増悪させることも報告されている。

申請者は、ラットの腎虚血再灌流モデルを用いて、糖質コルチコイドであるdexamethasoneによる腎組織への好中球浸潤および接着分子であるICAM-1の発現量の抑制がみられるか否か、そしてこれらの抑制が NO^- の抑制を介しているかどうかを検討することを目的とした。

雄SDラット220-320gの両側腎動静脈血流を血管クリップで40分間遮断後、再灌流することにより、虚血再灌流モデルを作成した。dexamethasone投与とAngeli's salt投与群を次のように組み合わせて実験群を分類した。 NO^- 供与物質であるAngeli's salt(trioxodinitrate)は独自に精製したものを実験に供した。

- 1) sham ope群(Control群)、2) dexamethasone投与群(Dex群)、3) 虚血再灌流群(I/R群)、
- 4) Angeli's salt投与群(AS群)、5) dexamethasone投与+虚血再灌流群(Dex+I/R群)、
- 6) dexamethasone投与+虚血再灌流+Angeli's salt投与群(Dex+I/R+AS群)。

これらの群において、再灌流60分後に摘出した腎は、組織学的に腎組織への浸潤好中球を計測し、RT-PCRを用いて、ICAM-1 mRNAの発現量を測定した。また、再灌流24時間後の血清クレアチニン濃度の測定および摘出腎における壊死尿細管数の計測を行い組織傷害の程度を評価した。

腎組織への好中球浸潤数はI/R群ではControl群に比し著明に有意に増加していた(60 ± 19 vs $15 \pm 7/30$ 視野、 $p < 0.0001$)がdexamethasoneの前投与はこれを有意に減少させた(60 ± 19 vs $24 \pm 15/30$ 視野、 $p < 0.0001$)。しかしdexamethasoneの好中球浸潤抑制効果はAngeli's saltにて有意に減少した(54 ± 18 vs $24 \pm 15/30$ 視野、 $p = 0.005$)。同様にICAM-1 mRNAの発現量はI/R群ではControl群に比べ増加し、Dex+I/R群では

I/R群に比し有意に減少していた。AS+Dex+I/R群ではDex+I/R群と比べ有意に増加していた。Dex群およびAS群の好中球浸潤数、ICAM-1 mRNA発現量は、ともにControl群と比較し有意差はなかった。再灌流24時間後の血清Cr値はDex+I/R群とI/R群で有意差はなく($4.37 \pm 0.41 \text{ mg/dL}$ vs $4.15 \pm 0.78 \text{ mg/dL}$)、尿細管傷害の程度についても有意差を認めなかった。

この研究により、dexamethasoneによって虚血再灌流による腎内好中球浸潤数およびICAM-1 mRNAの発現量は抑制されるが、その抑制効果はNO⁻供与物質であるAngeli's saltにより消失することが分かった。このことから、腎虚血再灌流時のdexamethasone投与による好中球浸潤およびICAM-1 mRNA発現の抑制にはNO⁻が一部関与していることが示唆された。組織傷害と腎機能障害はdexamethasone投与により軽減しなかったことについては、今回の研究で用いた腎虚血再灌流障害においては、1) 今回のモデルでは虚血再灌流による組織傷害が強すぎた 2) 好中球浸潤の腎虚血再灌流障害への関与は少ない 3) 腎虚血再灌流障害を抑制するにはdexamethasone投与量が不十分である可能性が考えられた、としている。

これに対して審査委員会では、本研究によって、腎臓での虚血再灌流における障害において好中球の浸潤が関与し且つ接着分子であるICAM-1の発現が関与していること、dexamethasoneの抑制効果にはニトロキシルアニオンが一部関与していること、を示唆した知見が得られたことが評価された。

本論文の審査過程において、次のような質疑が行われた。

- 1) dexamethasone投与量(1mg/kg)の決定根拠
- 2) Angeli's salt単独投与による変化がなかったことの説明
- 3) nitroxyl anionがNOから生じる可能性
- 4) 好中球の浸潤の定量的測定方法
- 5) 虚血—再灌流におけるサイトカイン関連物質の関与
- 6) 腎臓での虚血再灌流の傷害と他の組織との相違
- 7) dexamethasoneによる再灌流24時間後の腎組織および腎機能障害の改善が少なかった理由
- 8) 虚血再灌流障害に関与する他の因子(物質)
- 9) この実験では虚血のみの障害はどの程度関与しているか
- 10) 好中球の浸潤は虚血再灌流障害において主要な役割を果たしているのか否か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 平 光 忠 久

副査 藤 田 公 生 副査 渡 邊 裕 司