

論文要約

平成 29 年入学

医歯学総合研究科 先進治療学専攻

研究分野 侵襲制御学

氏 名 清永夏絵

【タイトル】

Effects of Landiolol in Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury in Rats and In Vitro

(Lipopolysaccharide 誘発性急性腎障害モデルラットと in vitro 実験におけるランジオロールの効果)

【序論および目的】

敗血症性急性腎障害は死亡率の高い病態であるが、これまで臨床において明らかな腎保護作用を示している薬剤はない。

これまでに敗血症性腎障害の病態に関与するものとして様々な因子が考えられている。TNF- α は敗血症性腎障害の発症や増悪に関して重要な役割を果たすとの報告がある。また、敗血症患者ではミトコンドリア機能障害が発生していて、その原因因子の一つが ROS であると示唆されている。Gomez らは、こういった様々な報告から、敗血症性急性腎障害の病因を統合的に提唱しており、炎症、酸化ストレス、微小循環障害の相互作用の中で、ミトコンドリアは適応反応を促進していると述べている。

近年、エスモロール (β 1 遮断薬) が敗血症性ショックに対して血行動態と臨床転帰を改善したとの報告があり注目を集めた。さらに、敗血症動物モデルにおけるランジオロール (超短時間作用型選択的 β 1 遮断薬) の臓器保護作用についての報告も散見されている。

本研究では、ランジオロールが敗血症性急性腎障害に与える効果について、動物モデルを用いて検討した。またそのメカニズムに関して、培養細胞を用いた実験で、炎症反応がミトコンドリア機能に与える影響とランジオロールの効果について検討した。

【材料および方法】

< In vivo 実験 >

Wister ラット (雄) を用い、Lipopolysaccharide (LPS) を経静脈投与して、急性腎障害モデルを作成した。ラットを①sham 群、②LPS7.5mg/kg 投与群、③LPS7.5mg/kg+ランジオロール 100 μ g/kg/min 投与群の 3 群に分けた (各群 n=8)。イソフルランによる全身麻酔下に総頸動脈、外頸静脈へそれぞれカニューレーションを行った。LPS 投与前、3 時間後、6 時間後に血圧、心拍数の測定を行い、血漿クレアチニン、乳酸、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 測定のため、血液を採取した。また、3 時間後、6 時間後に採尿し、尿中 8-OHdG を測定した。6 時間後に腎臓を採取し、病理標本を作成した。

< In vitro 実験 >

培養細胞である Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞に TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 をそれぞれ 0.5nM

ずつ添加し、24 時間後に細胞代謝測定機器（細胞外フラックスアナライザーXFp）で、ミトストレス試験（ミトコンドリア呼吸の測定）を行った。ミトストレス試験では、上記の培養細胞に oligomycin、FCCP、Antimycin A+Rotenone を順次添加して酸素消費速度（OCR: oxygen consumption rate）を測定することで、Basal OCR、Maximum OCR、ATP production を測定した。

次に、HEK293 細胞に TNF- α 0.5nM、TNF- α 0.5nM + landiolol 10 μ M をそれぞれ添加し、24 時間後に、上記と同様にミトストレス試験を、また解糖ストレス試験を行った。解糖ストレス試験では、glucose、oligomycin、2-deoxyglucose を順次添加して細胞外酸性化速度（ECAR: extracellular acidification rate）を測定することで、Basal glycolysis、Glycolytic capacity を測定した。さらに、ROS 測定キットを用いて細胞内の ROS 活性を測定した。

<統計>

数値は平均±標準偏差で表示し、P 値が 0.05 未満で有意差ありとした。すべてのデータは Scheffe の多重比較検定または対応のない t 検定の後に one way repeated measures ANOVA で処理した。循環動態と血漿クレアチニン、乳酸値の相関は Pearson の相関係数を用いて調べた。

【結 果】

<In vivo 実験>

Sham 群と比較して LPS 投与群で血漿クレアチニン、乳酸値は有意に上昇し、LPS+ランジオロール投与群でその上昇は有意に抑制された。

LPS+ランジオロール投与群において、心拍数は、sham 群・LPS 投与群と比べて有意に減少した。しかし血圧は sham 群と比較して低下せず、6 時間後においては、LPS 投与群と比較してむしろ高い傾向であった。

血中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、尿中 8-OHdG は、sham 群と比較して LPS 投与群、LPS+ランジオロール投与群で有意に上昇したが、2 群間では有意差はなかった。

腎病理組織では、LPS 群で尿細管の変性や壊死像があったが、他の 2 群では見られなかった。

<In vitro 実験>

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 のうち、TNF- α を添加した HEK293 細胞でのみ Basal OCR、Maximum OCR が増加した。ATP production はどのサイトカインを添加した細胞でも変化はなかった。

TNF- α による Basal OCR、Maximum OCR の増加はランジオロールの添加で有意に抑制された。

Basal glycolysis は TNF- α の添加で有意に亢進し、それはランジオロールの添加で有意に抑制された。

細胞内の ROS レベルは、TNF- α の添加で有意に増加し、その増加はランジオロールの添加で有意に抑制された。

【結論および考察】

ランジオロールはラットにおける LPS 誘発性急性腎障害を改善し、乳酸値上昇を抑制したが、全身性の炎症反応（炎症性サイトカインの値）や酸化ストレス（尿中 8-OHdG の値）に影響しなかった。よって、ランジオロールの腎臓に対する効果は、その他のメカニズムによる、または腎組織への直接的な作用によるものではないかと考えられた。

HEK293 細胞において、TNF- α はミトコンドリアの酸素消費を増加させたが ATP 産生を増加させ

なかった。また、TNF- α はROS産生を増加させた。TNF- α は、酸素需要を増加させることで組織低酸素を引き起こし、組織・臓器障害を引き起こす可能性がある。さらに、ROSはミトコンドリアの酸素消費増加に伴い増加し、ミトコンドリア機能障害を惹起している可能性がある。ランジオロールはTNF- α による酸素消費増加とROS産生の増加を抑制した。これは腎保護効果のメカニズムのひとつであると考えられた。

ランジオロールによる細胞内作用のメカニズムについては本研究では明らかにすることができなかった。

ランジオロールは敗血症性急性腎障害に対して有効な薬剤となりうる可能性が示唆された。