

—Reviews—

腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に関する研究

山下 潤二^a, 松村 靖夫^b

Studies on the development and progression of ischemia/reperfusion-induced renal injury

Junji YAMASHITA^a, Yasuo MATSUMURA^b^a*Tokyo Research Laboratory, Research Division, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., 3-1, Shin-izumi, Narita-City, Chiba 286-0825, Japan*^b*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received October 22, 2007; Accepted November 19, 2007)

Ischemic cell injury to the kidneys occurs during cardiovascular surgery, shock, and transplantation, which may lead to acute renal failure. Here we summarize the effects of Na⁺/H⁺ exchange (NHE) inhibitors, a Na⁺/Ca²⁺ exchange (NCX) inhibitor, and ischemic preconditioning (IP) on ischemic acute renal failure (ARF). In addition, we report that NHE, NCX and IP can suppress ARF-induced enhancement of endothelin-1 (ET-1) production, which is closely related to the pathogenesis of renal ischemia/reperfusion (I/R) injury.

We firstly evaluated the effects of 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) and N-(aminoiminomethyl)-1-methyl-1H-indole-2-carboxamide methanesulfonate (SM-20220), NHE inhibitors, on I/R-induced ARF. Pre-ischemic treatment with EIPA, but not with SM-20220, attenuated the I/R-induced renal dysfunction and histologically evident damage. In addition, I/R-induced increase in renal ET-1 content was suppressed by pre-ischemic treatment with EIPA, reflecting the difference in immunohistochemical ET-1 localization in necrotic tubular epithelium. Secondly, we investigated whether I/R-induced renal dysfunction and tissue injury would be more successfully overcome by treatment with KB-R7943, the NCX inhibitor, in comparison with verapamil, a Ca²⁺ channel antagonist. Pre-ischemic treatment with KB-R7943 or verapamil attenuated the ARF-induced renal dysfunction. I/R-induced renal dysfunction was overcome by post-ischemic treatment with KB-R7943 but not with verapamil. Histologically evident damage and Ca²⁺ deposition in necrotic tubular epithelium were improved by pre-ischemic treatment with KB-R7943. In addition, pre-ischemic treatment with KB-R7943 significantly suppressed the increment of ET-1 content in the post-ischemic kidney. Finally, we examined the effects of IP on I/R-induced ARF. IP significantly improved renal dysfunction and histologically evident damage. NO metabolites production in the kidney was markedly increased in animals exposed to I/R with IP, compared to animals not subjected to IP, and these increases correlated with changes in endothelial NO synthase (NOS) protein expression in renal tissues. The IP-induced improvement of renal dysfunction was abolished by pretreatment with N^G-nitro-L-arginine, a nonselective NOS inhibitor, but not with aminoguanidine, an inducible NOS inhibitor. Furthermore, the increment of ET-1 content in the kidney after reperfusion was markedly suppressed by IP treatment.

From these findings, we propose that NHE and NCX inhibitors, and IP treatment may be considered as a therapeutic approach to protect post-ischemic ARF in humans.

Key words—ischemia/reperfusion; Na⁺/H⁺ exchanger; Na⁺/Ca²⁺ exchanger; Ischemic preconditioning.

*, ^a 日本製薬株式会社 研究本部 東京研究所, 〒 286-0825 成田市新泉3番地1, e-mail: j.yamashita@nihon-pharm.co.jp

^b 大阪薬科大学 病態分子薬理学研究室

本論考は、山下潤二の博士論文をもとに再構成したものである。

腎虚血・再灌流障害は、出血、体液の喪失、循環不全、心血管の外科的手術、ショック並びに移植手術等で認められ、糸球体濾過機序の急激な変化により生じた腎臓の排泄障害と定義される。本病態の原因は様々であるが、腎虚血・再灌流によって、腎血流量および限外濾過率の低下が引き起こされる。その結果、障害を受けた尿細管は脱落、さらには閉塞し、尿細管腔静水圧の上昇および尿細管腔外への逆流による糸球体濾過量の減少が本病態の発症および進展機構に関わっていると考えられている¹⁾。従来から、このような病態の発症メカニズムについては様々な検討がなされており、血管収縮物質、活性酸素および細胞内 Ca^{2+} 濃度を始めとした多くの因子が関与することが報告されている。

虚血状況下にある心筋細胞では、酸素欠乏による嫌氣的解糖およびアシドーシスによって引き起こされる細胞内 pH の減少に伴う Na^+/H^+ 交換体 (NHE) の活性化²⁾や、ATP レベルの減少による Na^+/K^+ -ATPase 活性の低下による細胞内 Na^+ 濃度の上昇が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) の逆モードを賦活化し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる⁴⁾。心臓において、この NHE および NCX の活性化によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が、不整脈、心筋壊死および心筋細胞障害等の様々な虚血・再灌流障害の発症に関与することが報告されている⁴⁾。しかしながら、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に対する NHE および NCX の病態生理学的役割については明らかでない。

虚血性プレコンディショニング (IP) は、Murryらによって提唱されたものであり⁵⁾、心筋を短時間の虚血に単回あるいは反復して暴露することにより、心筋細胞の虚血耐性が増強し、その後の虚血・再灌流による心筋障害が顕著に改善される現象であるが、腎虚血・再灌流障害に対する IP の効果およびそのメカニズムについては不明な点が多い。

エンドセリン -1 (ET-1) は血管内皮由来の強力

かつ持続的な血管平滑筋収縮活性を有する血管収縮ペプチドとして同定された⁶⁾。腎虚血・再灌流時において、腎 ET-1 含量および腎 ET-1 mRNA 発現が増加することや、ETA 受容体拮抗薬が腎機能障害を改善することから、腎虚血・再灌流障害に腎 ET-1 産生亢進が密接に関与していると考えられている⁷⁾。しかしながら、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に対する腎 ET-1 産生亢進と NHE, NCX および IP との関係については明らかでない。

本研究は、腎虚血・再灌流障害の発症および進展機構における NHE, NCX および IP の影響、さらには本病態に密接に関与している腎 ET-1 産生と NHE, NCX および IP との関係を明らかにする目的で実施したものである。

1. 腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構における Na^+/H^+ 交換体 (NHE) およびエンドセリン -1 (ET-1) の役割

脳、心臓および肝臓の虚血・再灌流障害において、NHE が本病態の発症および進展機構に密接に関与しており、NHE 阻害薬が、これら臓器に対して保護効果を示すことが報告されている。しかしながら、腎虚血・再灌流時における NHE の役割については不明な点が多い。そこで本編では、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に対する NHE の役割を明らかにする目的で、NHE 阻害薬である 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) および N-(aminoiminomethyl)-1-methyl-1H-indole-2-carboxamide methanesulfonate (SM-20220) を用いて検討を行った。

腎虚血・再灌流処置により、対照群 (I/R 群) で認められた腎機能低下および腎組織障害は、EIPA を虚血前投与した場合、用量依存的な効果を示し、高用量投与群 (1.0 mg/kg) では sham 群とほぼ同程度まで改善された。一方、SM-20220 投与群で

は EIPA 投与群とは異なり、腎機能低下に対する改善効果は認められず、I/R 群と同レベルであった (Figure 1).

次に、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展過程における腎 ET-1 産生亢進と NHE との関係について明確にするため、上記と同様の薬物を用いて検討した。薬物を虚血前投与した場合、EIPA 投与群では低用量 (0.2 mg/kg) および高用量 (1.0 mg/kg) 投与群共に、腎 ET-1 含量およびその発現の増加は、ほぼ完全に抑制された。一方、SM-20220 投与群では腎 ET-1 産生亢進に対する効果は認められなかった (Figure 2).

腎臓では NHE のサブタイプとして NHE isoform 3 (NHE3) が広範囲に発現しており、NHE3 を選択的に阻害する S3226 が、腎虚血・再灌流障害を改善する報告がなされている。⁸⁾ 最近の研究において EIPA は、近位尿細管での蛋白の再吸収および Na⁺ に依存した H⁺ 分泌を抑制することが明らかとなり、その抑制効果は S3226 とほぼ同程度であることが報告されている。⁹⁾ 一方、SM-20220 は NHE isoform 1 (NHE1) を選択的に阻害することが知られており、NHE1 を阻害することによって虚血性脳疾患に対して保護効果を示すことが報告されているが、¹⁰⁾ SM-20220 の NHE3 に対する選択性

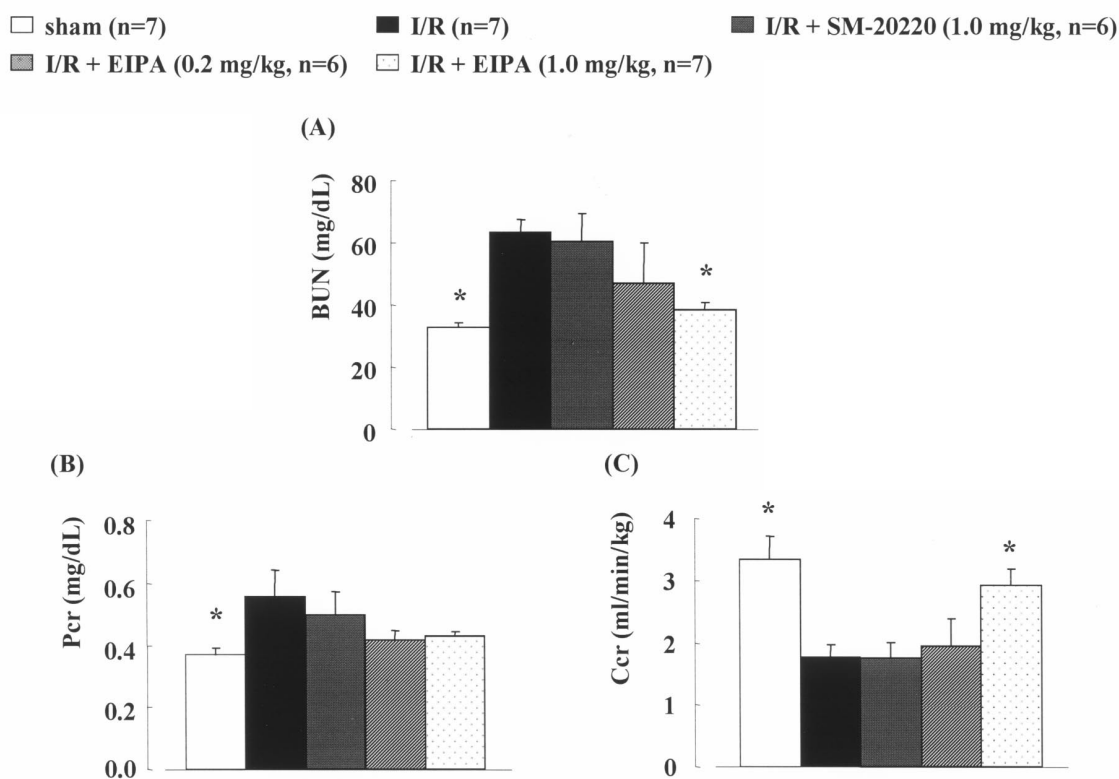


Figure 1. Effects of EIPA or SM-20220 administered before I/R on blood urea nitrogen (BUN, A), plasma creatinine (Pcr, B), and creatinine clearance (Ccr, C) at 24-48 h after I/R. At 24 h after reperfusion 24-h urine was collected. Each value represents the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, compared with vehicle-treated ARF mice. I/R, ischemia/reperfusion. ARF, acute renal failure.

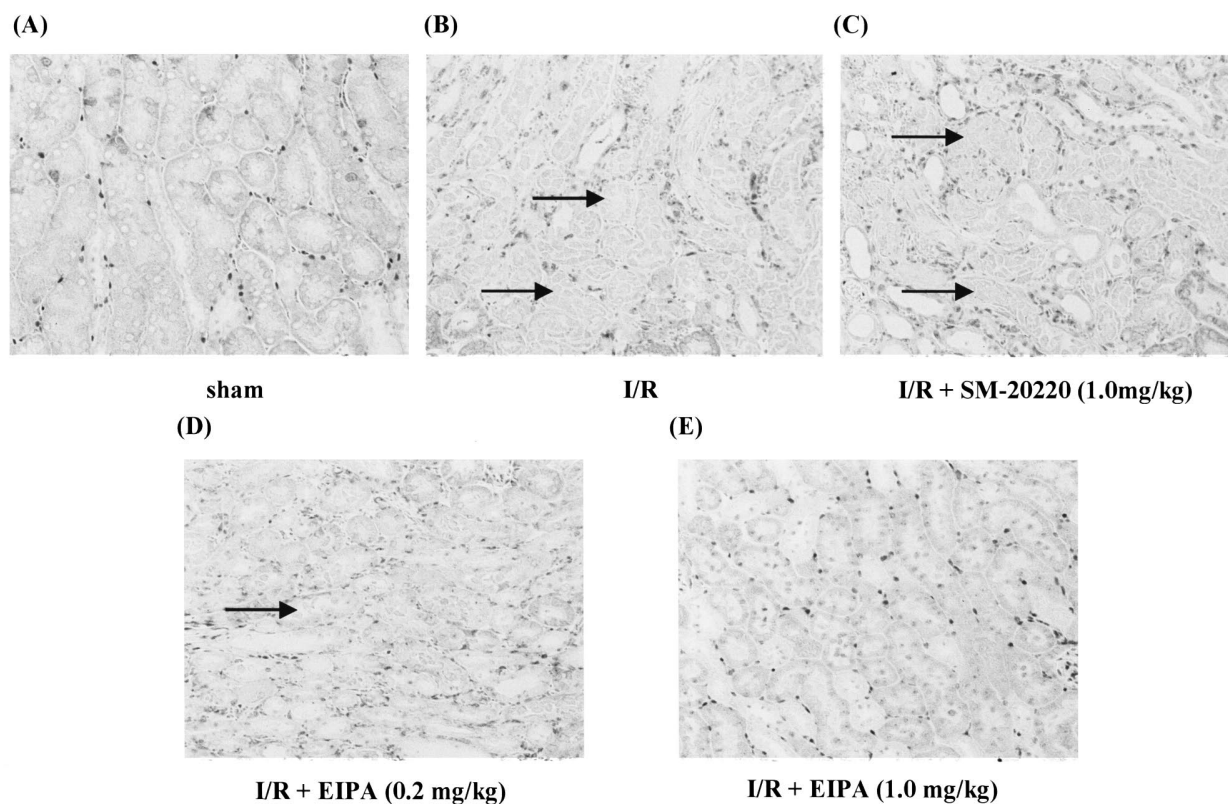


Figure 2. Immunohistochemistry for endothelin-1 of outer zone outer stripe of the medulla of the kidney of ARF mice treated with vehicle (B, untreated), SM-20220 (C, 1.0 mg/kg), EIPA (D, 0.2 mg/kg; E, 1.0 mg/kg) at 48 h after I/R, and sham mice (A). Drugs were given intravenously before I/R. Arrows indicate endothelin-1 peptide expression in lumens of necrotic tubular cells. The peptide expression was more intense in vehicle treated ARF (B, untreated) than EIPA (E, 1.0 mg/kg). I/R, ischemia/reperfusion. ARF, acute renal failure.

の有無については明らかでない。

以上より、腎虚血・再灌流における、腎機能低下および腎組織障害に NHE3 が密接に関与する可能性が示唆された。また、NHE3 の活性化と共に ET-1 の過剰産生が誘導され、このことが本病態の発症と進展過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) および ET-1 の役割

心筋虚血・再灌流障害において、NCX を介した Ca^{2+} 流入すなわち Ca^{2+} オーバーロードが重要な働きをしていると考えられている⁴⁾。しかしながら、腎虚血・再灌流時における NCX の役割については明らかではない。そこで本編では、腎虚血・再

灌流障害の病態発症および進展機構に対する NCX の役割を明らかにする目的で、NCX 阻害薬である KB-R7943 を用いて検討を行い、 Ca^{2+} 拮抗薬であるベラパミルの作用と比較した。

I/R 群で認められた腎機能低下および腎組織障害は、薬物を虚血前投与した場合、KB-R7943 の低用量投与 (2 mg/kg) あるいはベラパミル投与 (1 mg/kg) の両群で同程度に改善された。KB-R7943 の高用量投与群 (10 mg/kg) では腎機能改善効果はより顕著に認められ、各パラメーターは sham 群と同レベルであった。さらに、両

薬物の虚血後投与に対する影響について検討した結果、KB-R7943 投与群では用量依存的に改善されたが、ベラパミルの虚血後投与では虚血前投与の場合とは異なり、腎機能低下に対する改善効果は認められなかった。

次に、腎病理組織学的検査を実施したところ、腎虚血・再灌流処置で認められた顕著な腎組織障害および Ca^{2+} 沈着は、KB-R7943 の高用量 (10 mg/kg) を虚血前投与することにより明らかに軽減された (Figure 3)。

また、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進

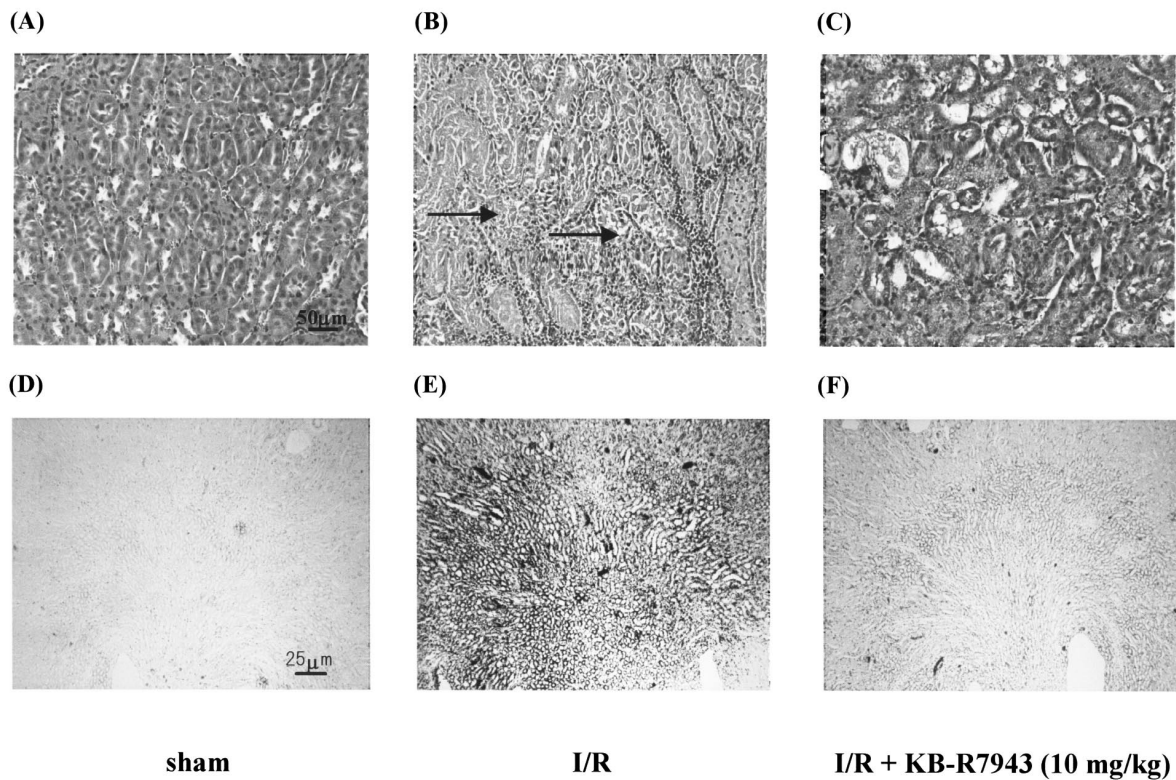


Figure 3. Light microscopy of outer zone outer stripe of the medulla of the kidney of ARF mice treated with vehicle (B, untreated) and KB-R7943 (C, 10 mg/kg) at 48 h after I/R, and sham mice (A). Arrows indicate tubular necrosis (hematoxylin-eosin staining). Effect of KB-R7943 administered before I/R on Ca^{2+} deposition in necrotic tubular epithelium in the kidney of ARF mice treated with vehicle (E, untreated) and KB-R7943 (F, 10 mg/kg) at 48 h after I/R, and sham mice (D). I/R, ischemia/reperfusion. ARF, acute renal failure.

展過程における腎 ET-1 産生亢進と NCX との関係について明確にするため、NCX 阻害薬である KB-R7943 を用いて検討した結果、I/R 群で認められた腎 ET-1 含量の増加は、KB-R7943 の高用量 (10 mg/kg) を虚血前投与することによりほぼ完全に抑制された (Figure 4).

以上より、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に、NCX が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、腎虚血・再灌流時においては、NCX の逆モードを介した Ca^{2+} オーバーロードに引き続いて ET-1 の過剰産生が誘導

され、このことが本病態の発症と進展過程に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

3. 腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構における虚血性プレコンディショニング (IP) および ET-1 の役割

IP は、様々な臓器に対して、短時間の虚血に単回あるいは反復して暴露することにより虚血耐性が増強し、その後の虚血・再灌流による障害が顕著に改善される現象である。⁵⁾ 腎臓においても IP

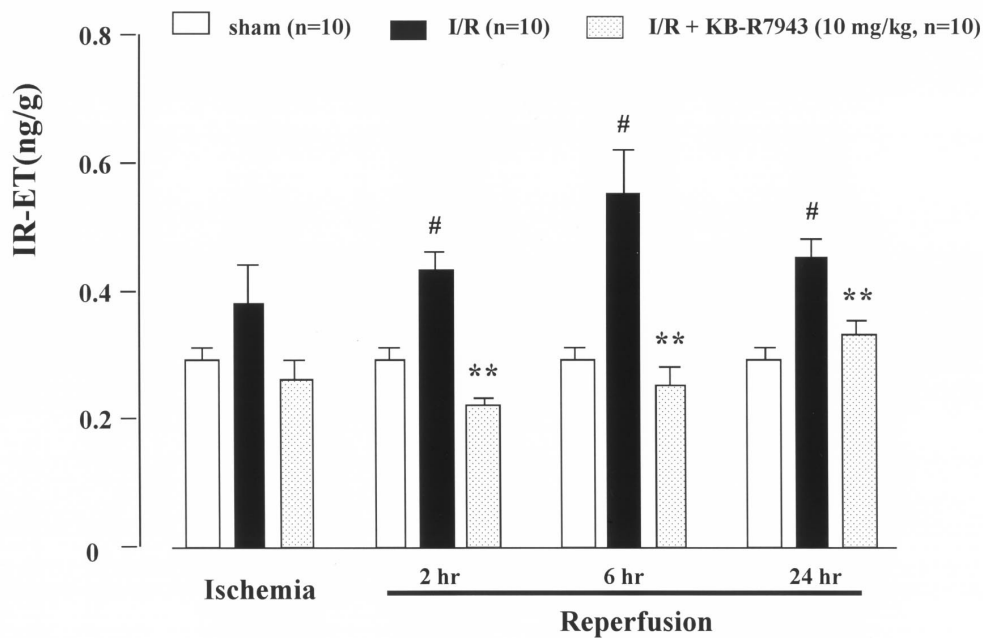


Figure 4. Effects of KB-R7943 administered before I/R on immunoreactive endothelin-1 content in the kidney of ARF rats at the end of 45-min ischemia and at 2, 6, and 24 h after reperfusion. Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. [#] $p < 0.01$, compared with sham rats; ^{**} $p < 0.01$, compared with vehicle-treated ARF rats. I/R, ischemia/reperfusion. ARF, acute renal failure.

が、虚血・再灌流による腎機能障害を改善する報告がなされているが、IP を介した腎保護効果のメカニズムについては明らかでない。そこで本編では、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に対する IP の影響およびそのメカニズムについて検討を行った。

I/R 群で認められた腎機能の低下は、IP 処置を施すことにより明らかに改善された。そこで、IP 処置を施した群の腎保護効果に対するメカニズムを明らかにするため、非選択的一酸化窒素合成酵

素 (NOS) 阻害薬である ニトロアルギニン (NOARG; 10 mg/kg) あるいは誘導型 NOS (iNOS) 阻害薬である アミノグアニジン (10 mg/kg) を用いて検討した。その結果、NOARG を IP 処置前に投与した群では、IP 処置により認められた腎保護効果は完全に消失した。一方、アミノグアニジンを IP 処置前に投与した群では、NOARG 投与群とは異なり IP 処置に対して影響を示さなかった (Figure 5)。

次に、腎虚血・再灌流 2, 6 および 24 時間後の腎組織中における内皮型 NOS (eNOS) 蛋白発現

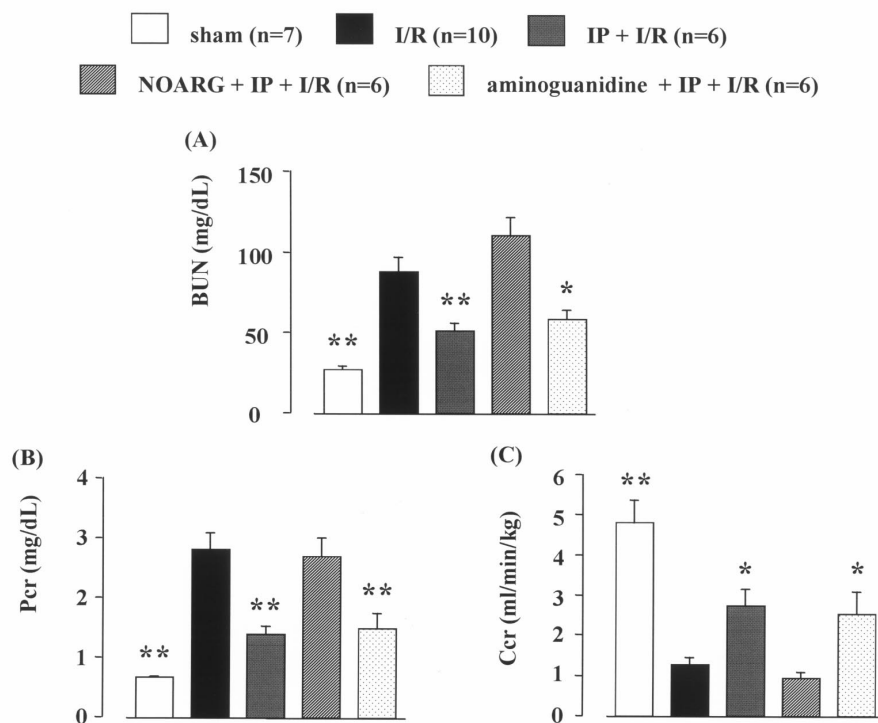


Figure 5. Effects of I/R with or without IP treatment on blood urea nitrogen (BUN, A), plasma creatinine (Pcr, B) and creatinine clearance (Ccr, C) after reperfusion. At 24 hr after reperfusion, 5-hr urine was collected. Each value represents the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with I/R rats without IP treatment. I/R, ischemia/reperfusion. IP, ischemic preconditioning.

に対する影響について検討したところ、IP 処置を施した群では再灌流 2 時間後より eNOS 蛋白発現が上昇傾向を示し、再灌流 6 時間後では I/R 群と比較して顕著な増加が確認された。さらに、腎虚血・再灌流後の腎透析液中 NO 代謝物 (NO_x) 濃度について検討したところ、IP を処置した群では再灌流 2 時間後より NO_x 濃度が上昇傾向を示し、再灌流 6 時間後では顕著な増加が確認された (Figure 6)。

また、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展過程における腎 ET-1 産生亢進と IP との関係について検討を行った。I/R 群で再灌流 6 時間後に認められた腎 ET-1 含量の増加は、IP 処置を施すことにより顕著に抑制された。

以上より、IP 処置を施すことによって、eNOS 蛋白発現を介して NO が産生され、腎機能低下お

よび腎組織障害に対して保護効果を示すことが明らかとなった。また、IP 処置を施すことによって、腎虚血・再灌流後での腎 ET-1 の過剰産生が抑制され、このことが本病態の発症と進展抑制に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

結語

腎虚血・再灌流時に、NHE3 が重要な役割を果たしていること、また NHE 阻害薬は、腎虚血・再灌流後の腎組織中 ET-1 産生亢進を抑制することから、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に、NHE3 の活性化、その後に引き起こされる腎 ET-1 産生の亢進が密接に関与していることが明らかとなった。

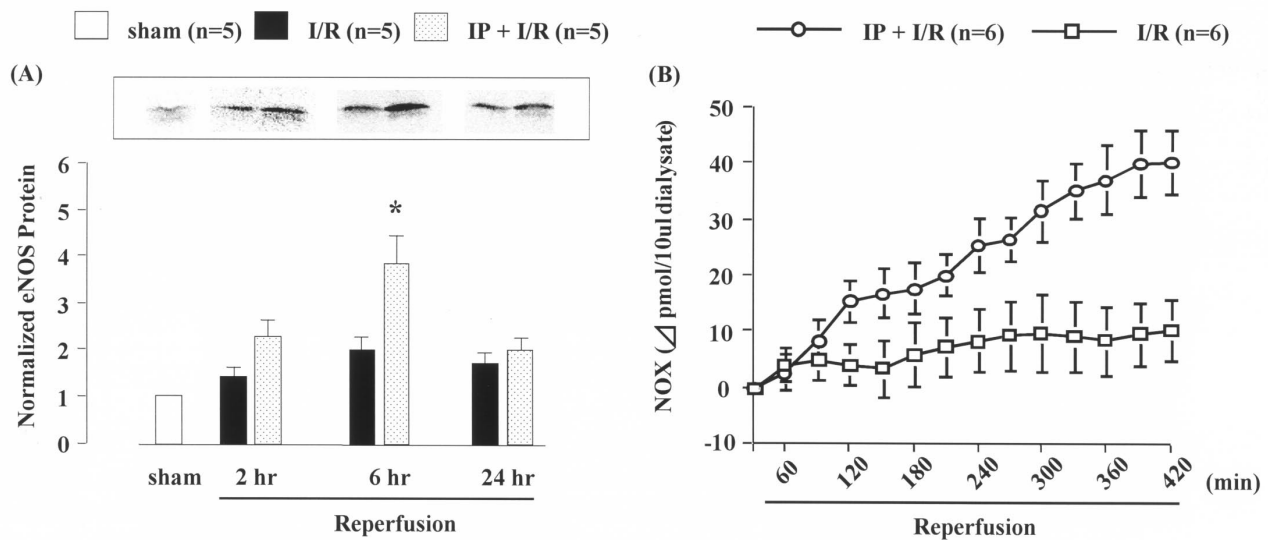


Figure 6. (A) Renal eNOS protein expression in sham rats and in I/R rats at 2, 6 and 24 hr after reperfusion, with or without IP treatment. The upper panel represents a typical data. (B) NO₂⁻ and NO₃⁻ (NO_x) concentration in dialysate of kidneys after reperfusion, with or without IP treatment. Each column and bar represents the mean ± S.E.M. *p < 0.05, compared with I/R rats without IP treatment. I/R, ischemia/reperfusion. IP, ischemic preconditioning.

また、腎虚血・再灌流時に、NCX が重要な役割を果たしていること、さらに NCX 阻害薬は、腎虚血・再灌流後の腎組織中 ET-1 産生亢進を抑制することから、腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展機構に、NCX の逆モードを介する細胞内 Ca^{2+} オーバーロード、その後引き起こされる腎 ET-1 産生の亢進が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

また、腎虚血・再灌流前に IP 処置を施すことにより、その後引き起こされる虚血・再灌流障害は改善されること、非選択的 NOS 阻害薬を IP 処置を施す前に投与することにより、その改善効果は消失するのに対し、iNOS 阻害薬の投与では影響を示さないこと、IP 処置により、虚血・再灌流後の eNOS 蛋白発現を介して NO 産生が亢進すること、さらに IP 処置が虚血・再灌流後の腎組織中 ET-1 産生亢進を抑制し、その抑制は NO 産生亢進の時点と一致していたことから、IP 処置による腎虚血・再灌流障害の病態発症および進展抑制効果に、eNOS 蛋白発現に伴う NO 産生亢進、その後引き起こされる腎 ET-1 産生の亢進抑制が密接に関連していることが明らかとなった。

以上、本研究結果から、腎虚血・再灌流障害に対して、NHE, NCX および IP をターゲットとした新たな治療法が有効である可能性が示唆された。今後、これら治療法が臨床応用に発展することが期待される。

REFERENCES

- 1) Alcazar JM and Rodicio JL. Ischemic nephropathy: clinical characteristics and treatment. *Am J Kidney Dis* 2000, **36**, 883-893.
- 2) Lazdunski M, Frelin C and Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells; its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985, **17**, 1029-1042.
- 3) Cross HR, Radda GK and Clarke K. The role of Na^+/K^+ myocardial injury; a ^{31}P , ^{23}Na and ^{87}Rb NMR spectroscopic study. *Magn Reson Med* 1995, **34**, 673-685.
- 4) Tani M and Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts: possible involvement of H^+-Na^+ and $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Circ Res* 1989, **65**, 1045-1056.
- 5) Murry CE, Jennings RB and Reimer KA. Preconditioning with ischemia; a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986, **74**, 1124-1136.
- 6) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, **332**, 411-415.
- 7) Kuro T, Kohnou K, Kobayashi Y, Takaoka M, Opgenorth TJ, Wessale JL and Matsumura Y. Selective antagonism of ETA but not ETB receptor is protective against ischemic acute renal failure in rats. *Jpn J Pharmacol* 2000, **82**, 307-316.
- 8) Hropot M, Juretschke HP, Langer KH and Schwark JR. S3226, a novel NHE3 inhibitor, attenuates ischemia-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* 2001, **60**, 2283-2289.
- 9) Gekle M, Volker K, Mildenerger S, Freudinger R, Shull GE and Wiemann M. NHE3 Na^+/H^+ exchanger supports proximal tubular protein reabsorption *in vivo*. *Am J Physiol* 2004, **287**, F469-F473.
- 10) Kuribayashi Y, Itoh N, Kitano M and Ohashi N. Cerebroprotective properties of SM-20220, a potent Na^+/H^+ exchange inhibitor, in transient cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol* 1999, **383**, 163-168.