



# D-Ribose Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury by Reducing Neutrophil Activation in Rats

佐藤, 仁昭

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-02-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3140

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003140>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	佐藤 仁昭
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3140 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 2 月 8 日

【 学位論文題目 】

D-Ribose Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury by Reducing Neutrophil Activation in Rats(D-リボースは好中球の活性化を抑制してラット腎の虚血再灌流による腎傷害を軽減する)

審 査 委 員

主 査	教 授	大北 裕
	教 授	具 英成
	教 授	平井 みどり

(論文博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### D-Ribose Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury by Reducing Neutrophil Activation in Rats

D-リボースは好中球の活性化を抑制してラット腎の虚血再灌流による腎傷害を軽減する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 外科系講座 麻酔学分野  
指導教員 : 前川信博 教授

佐藤 仁昭

虚血再灌流は腎傷害をきたす原因の一つである。虚血再灌流損傷を引き起こすメカニズムは多因性であり、低酸素や血管内皮傷害、炎症反応、そして活性酸素による損傷などがからんでいる。最近の研究は、虚血再灌流に対する炎症の役割に注目しているものが多くみられる。そしてサイトカインやケモカインが腎虚血再灌流傷害を調節していることが多くの研究で示されている。また活性化白血球が、虚血再灌流による急性腎傷害の病態生理に関わり合いがあるとされている。実際、好中球の活性化や接着を抑制する薬剤は、虚血再灌流により惹起される腎傷害を軽減することがラットを用いた実験で報告されている。

最近いくつかのグループが、医学における単糖類の生物学的機能に注目している。単糖類であるD-アロースは好中球の活性化を抑制し、虚血再灌流による臓器傷害を改善することが示されている。我々は同じく単糖類であるD-リボースについて、虚血再灌流により惹起される腎傷害における役割について調査した。

#### (方法)

96匹の雄性Wistarラット、体重220～270gを使用し、sham、コントロール、D-リボース群の3つに無作為に分けた。コントロールおよびD-リボース群はラットの腎臓を45分間虚血にし、再灌流後24時間観察した。一方sham群は同様の外科処置を行ったが虚血再灌流を行わなかった。麻酔はペントバルビタールの腹腔内注射でおこない、背側切開経路で右腎摘出術を行った後、さらに左腎臓及び腎血管を露出した。コントロールおよびD-リボース群は血管クリップを用いて左腎動脈及び静脈を遮断し、45分後に解除した。虚血30分前にD-リボース(sham及びD-リボース群、400mg/kg)もしくは生理食塩水(コントロール群)を経静脈的に投与した。

#### (測定)

手術後数時間の間隔において腎臓を摘出し、ホモジナイズした後上澄液のCINC-1とMPO濃度を、それぞれ好中球の活性化と浸潤を評価するために測定した。また再灌流の24時間後、血液及び尿サンプルを各々大腿動脈及び膀胱から採取し、血清尿素窒素と血清クレアチニン及びNアセチルβDグルコサミニダーゼ(NAG)を糸球体機能及び近位尿細管機能の指標として測定した。また再灌流24時間後に病理組織学的評価のために腎臓を摘出し、無作為に選んだ皮髄境界領域の組織切片を観察、尿細管像より重症度をスコア化し、また好中球の集積を定量化するため浸潤好中球数をカウントした。

#### (統計分析)

統計分析は反復分散分析法及びダンのポスト検定、クルスカール-ウォリステストを使い、P値は0.05未満を統計学的に有意とした。

(結果)

再灌流2時間後のD-リボース群におけるCINC-1濃度は、コントロール群に比べて著明に低くなっていた(P=0.0008)。さらにD-リボース群の再灌流6時間後のMPO濃度は、コントロール群に比べ著明に減少していた(P=0.0008)。

虚血再灌流24時間後の血清尿素窒素及び血清クレアチニンは、虚血再灌流を受けたラットではsham手術を受けたラットに比べ著明に上昇しており、著明な糸球体機能不全の程度を示していた。D-リボース(400mg/kg)の経静脈的投与はコントロール群と比較して、血清尿素窒素及びクレアチニン濃度の増加を抑えていた。また尿中NAG濃度も虚血再灌流を受けたラットで著明に高くなっていた(P=0.0008)が、D-リボースの400mg/kg投与はコントロール群と比較してNAG濃度の著明な減少をもたらし、尿細管傷害を少なくしていることを示唆した(P=0.0008)。

病理組織学的には、Sham群より得られた腎臓における重症度スコアと比較した時、コントロール群では重症度スコアが著明に増大していた(P=0.02)。そして虚血再灌流の前にD-リボースを投与することにより、重症度スコアは著明に抑えられていた(P=0.02)。浸潤した好中球の数は、sham群と比較してコントロール群では再灌流24時間後にきわだって増加していた(P=0.02)。またD-リボースを事前に投与しておくことはコントロール群と比較して著明に好中球の浸潤を抑えていた(P=0.02)。

以上より、コントロール群はsham群に比べ、虚血再灌流後に血清尿素窒素、血清クレアチニン、NAG、CINC-1、MPO、組織学的重症度スコア、そして浸潤好中球数が増加していたが、これらの変化がD-リボース群では著明に抑えられるという結果が得られた。

(考察)

この研究は、D-リボースが虚血再灌流を受けたラット腎においてCINC-1及びMPO濃度を減少させ、腎機能不全及び病理組織学的変化の両方を改善することを示した。今回の研究では、腎移植や腎動脈上で大動脈を遮断する大動脈瘤手術のような状態を仮定して、D-リボースを虚血再灌流の30分前に投与した。しかし、D-リボースが再灌流の後に投与される場合の効果については不明である。D-リボースの投与量や投与するタイミングを変化させた場合の効果について評価をするために、更なる研究が必要である。

内皮細胞と好中球の相互作用により修飾される炎症反応は、虚血再灌流傷害の病因において重要である。虚血再灌流の一連の炎症過程を調節する治療的アプローチは、白血球減少療法、抗サイトカインもしくは抗ケモカイン療法、抗接着分子抗体療法など様々なものがある。ケモカインでは、CINC-1やIL-8が好中球の活性化に関わる。本研究で我々は、D-リボースが再灌流後の腎のCINC-1濃度を減少させることを示した。D-リボースが虚血再灌流によるCINC-1の産生を抑える明確な機序については、現在のところわかっていない。再灌流後は、単球やマクロファージのような単核の食食細胞が、IL-8のようなケモカインを生成する。サイトカインやケモカインの産生は転写、転写後、翻訳、翻訳後の段階

で調節されており、IL-8はNF- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B)やAP-1(activated protein 1)により転写段階で調節されている。虚血再灌流により惹起される、NF- $\kappa$ BやAP-1におけるD-リボースの影響については我々の研究では調べられていないため、ケモカインを誘導するための細胞内シグナルカスケードにおけるD-リボースの効果については不明である。虚血再灌流により惹起されるCINC-1の産生を、D-リボースが抑制するメカニズムを明らかにするために更なる研究が求められる。

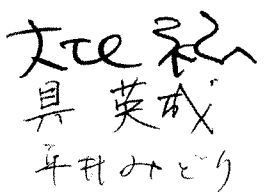
白血球は走化と接着の後、組織の損傷をもたらす活性酸素、プロテアーゼ、エラスターゼ、MPOやその他の酵素を放出する。MPO濃度の分析は組織における好中球数を定量するのに広く用いられているため、好中球の腎への集積の指標としてMPO濃度を用いた。本研究では、再灌流の後3時間以内に虚血再灌流がMPO濃度の上昇をもたらしており、このことは炎症組織における好中球の浸潤の促進を示す。腎臓への好中球浸潤を減少させることは、好中球より放出される蛋白分解酵素(プロテアーゼ、エラスターゼ、MPO)や活性酸素を原因とする細胞損傷を減少させ、腎障害を軽減することに貢献していた可能性がある。

急性腎不全における糸球体や尿細管機能不全の多くは虚血再灌流が原因であり、酸素欠乏にひき続く再灌流の時期に発生することが考えられている。血清尿素窒素や血清クレアチニン値の上昇は、腎機能悪化の兆しである。近位尿細管細胞は最も虚血性傷害を受けやすく、虚血後の急性腎不全において主な標的となっているのはこれらの細胞である。本研究で我々は、コントロール群において尿細管機能の特異的指標である尿中NAG濃度の上昇を観察した。一方D-リボースを用いた治療は尿中NAG濃度の上昇を著明に抑えていた。また病理組織学的にもD-リボース群で傷害は軽減されていた。

Rare sugars(希少糖)はInternational Society of Rare Sugars(ISRS)により、自然界に微量にしか存在しない単糖類として定義されている。近年、D-アロースといった希少糖の生物学的効果が詳細に研究されている。単糖類が好中球の活性化を抑制するといったこれらの結果から、我々はいくつかの単糖類を選別した。D-リボースは全ての生細胞にみられ、自然界に存在する5単糖である。D-リボースはATPを構成する糖(構成成分)であるため、心臓に対するサプリメント(追加補給する栄養成分)として研究されてきた。虚血再灌流腎におけるD-リボースの白血球活性化の抑制効果は、D-アロースの効能とほぼ同じである。しかしD-リボースはD-アロースに比べて安価で、またD-リボースは人体に存在する物質なので製剤として適用できる可能性は高い。製剤として応用できる可能性を同定するために、様々な臓器におけるD-リボースの効果について更なる研究が必要である。

最後に、D-リボースは好中球の活性化を抑制することで虚血再灌流により惹起される腎傷害を軽減し、心血管手術や腎移植、あるいはショックに陥った患者の緊急手術などにおける虚血再灌流による腎傷害を軽減するのに役立つ可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第 2095 号	氏 名	佐藤 仁昭
論文題目	D-リボースは好中球の活性化を抑制し、ラット腎の虚血再灌流による腎障害を軽減する D-Ribose Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury by Reducing neutrophil Activation in Rats		
審査委員	主 査 大北 裕 副 査 具 英成 副 査 平井 みどり 		
審査修了日	平成 23 年 1 月 20 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

虚血再灌流は腎傷害をきたす原因の一つである。虚血再灌流損傷を引き起こすメカニズムは多因性であり、低酸素や血管内皮傷害、炎症反応、活性酸素による損傷などがからんでいる。最近の研究の多くは、炎症の役割を重視し、虚血再灌流による腎傷害には活性化白血球を介するサイトカインやケモカインの関与とそれらによる修飾・調節を明らかにしている。単糖類である D-アロースは好中球の活性化を抑制し、虚血再灌流による臓器傷害を改善することが示されている。本研究の目的は、腎虚血再灌流傷害に対し、単糖類である D-リボースの効果およびメカニズムを解明することである。

## 方法

96匹の雄性Wistarラットを無作為に、sham、コントロール、D-リボースの3群に分けた。コントロール群および D-リボース群はラットの腎臓を45分間虚血にし、再灌流後24時間観察した。

一方 sham 群は同様の外科処置を行ったが虚血再灌流を行わなかった。虚血30分前に D-リボース 400mg/kg (sham 群及び D-リボース群、)もしくは生理食塩水(コントロール群)を経静脈的に投与した。

## 測定

手術後経時的に腎臓を摘出しホモジナイズした後、上澄液の CINC-1 と MPO 濃度をそれぞれ好中球の活性化と浸潤を評価するために測定した。CINC-1 濃度は再灌流2時間後に、MPO 濃度は再灌流6時間後にそれぞれピークがくることが得られたため、それぞれピーク値をとる2時間後と6時間後に3群間で比較した。また糸球体機能および近位尿細管機能を評価するため、再灌流の24時間後に大腿動脈および膀胱からそれぞれ血液および尿を採取し、血清尿素窒素と血清クレアチニン及び N アセチル βD グルコサミニダーゼ (NAG) を測定した。また再灌流24時間後に病理組織学的評価のために腎臓を摘出し、無作為に選んだ皮髄境界領域の組織切片を観察、尿細管像より重症度をスコア化し、また好中球の集積を定量化するため浸潤好中球数をカウントした。

## 結果

コントロール群は sham 群に比べ、虚血再灌流後に血清尿素窒素、血清クレアチニン、NAG、CINC-1、MPO、組織学的重症度スコア、そして浸潤好中球数が増加(増悪)していたが、これらの変化が D-リボース群では著明に抑制(改善)されていた。

## 結論

本研究は、D-リボースが虚血再灌流を受けたラット腎において CINC-1 及び MPO 濃度を減少させ、腎機能不全および病理組織学的変化の両方を改善することを示したものであるが、従来ほとんど行われなかった D-リボース の抗虚血再灌流障害効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって本研究は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。