

学位論文（博士）

Receptor activator of the NF κ B ligand system
protects renal function during experimental
renal ischemia-reperfusion in mice

（マウス腎虚血再灌流モデルにおけるReceptor
activator of the NF κ B ligand systemの腎保護作
用）

氏名 中山 祐起

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 泌尿器科学講座

令和2年10月

目次

1. 要旨
2. 研究の背景
3. 目的
4. 方法
5. 結果
6. 考察
7. 結語
8. 参考文献

1. 要旨

腎虚血再灌流障害は腎虚血とその後の再灌流によって生じる障害で、特に腎移植においては急性拒絶や腎機能発現遅延、晩期の移植腎機能不全と関連するとされる。虚血による低酸素に起因する障害とその後の再灌流時の免疫細胞の遊走による障害がその主な病態であり、免疫系の制御がその病態制御に重要である。Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) はTNF superfamilyであり、骨代謝において重要で広く臨床応用されているが、免疫系においてもその作用が注目されている。腎虚血再灌流障害においてRANKLの作用に関する報告は未だないのが現状であり、今回我々はマウス腎虚血再灌流障害モデルにおいてRANKLの作用について検討した。結果としてRANKLの阻害は腎虚血再灌流障害を増悪させ、逆にRANKLを投与するとその障害の程度が軽減されることが確認された。RANKLを投与することにより腎内のIL-6、TNF α の発現抑制が確認され、過剰な免疫応答が抑制されたことが障害軽減に繋がったと考えられた。その機序として、RANKが再灌流後に遊走してきたマクロファージ上に発現していることから、再灌流後に腎へ遊走してきたマクロファージにおけるRANKL-RANKシグナリングがマクロファージの細胞障害性マクロファージへの分極化を阻害し、過度な炎症を抑制するものと考えられた。

2. 研究の背景

腎虚血再灌流障害は腎虚血とその後の再灌流によって生じる障害の総称で、実臨床においては急性腎不全の原因となるが、特に腎移植において急性拒絶や腎機能発現遅延、晩期の移植腎機能不全と関連があるとされている [1, 2]。虚血による低酸素に起因する障害とその後の再灌流に伴う免疫細胞の還流による障害がその主な病態とされる。そのため、免疫系の制御がその病態制御に重要である。以前にわれわれはTNF α 阻害薬であるinfliximabがマクロファージの浸潤を減少させ、炎症性サイトカイン産生を抑制することで腎機能障害を改善することを示してきた [3~5]。Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) はTNF superfamilyであるが骨芽細胞より産生される骨代謝において重要である [6~9] ことは広く認知されたところで広く臨床応用されているが、免疫系においても樹状細胞の生存、機能に影響を与えることや、RANKLが欠損したマウスにおいてT、Bリンパ球の初期分化とリンパ節器官形成に不全を示したほか [10~12]、マウス敗血症モデルにおいてRANKLの投与が抗炎症効果を示すなどの報告があり [13] その作用が注目されている。しかし、腎虚血再灌流障害においてRANKLの作用はいまだ報告がないのが現状である。

3. 目的

マウス腎虚血再灌流障害モデルにおいてRANKLの作用について検討する。

4. 方法

腎虚血再灌流障害モデルは、実験動物取り扱いの基準に従い厳密に行った。体重28~35 gの10週齢のオスのマウス（SLC Inc., 日本）を、温度と光の制御された環境で個々のケージに入れ、食料と水は自由に摂取させた。マウスをペントバルビタール（50 mg / kg）の腹腔内注射で麻酔し、剃毛後10%ポビドンヨードで滅菌した後、腹部正中切開でアプローチ、腎虚血再灌流障害は、左腎莖を血管クリップで60分間クランプし、再灌流と同時に右腎摘を行うことで作成した。抗RANKL抗体投与群には、虚血の24時間前に抗マウスRANKL抗体（OYC1 : Oriental Yeast, Japan）の原液5 μ g / mgを腹腔内投与した。recombinant RANKL（rRANKL）投与群はrRANKL（GST-RANKL : Oriental Yeast, Japan）を虚血の24時間前に10 μ gのrRANKLをPBSに混注し腹腔内投与した。対象のsham群として、術24時間前にマウスに温生理食塩水1 mlを腹腔内投与した、左腎莖を阻血されなかったことを除いて、上記手術を偽手術（sham）されたものとした。動物を6つの群に割り当てた。sham群、右腎摘出術と左莖60分間のクランプ群（I/R群）、I/R+抗RANKL抗体群、I/R+rRANKL群、sham+抗RANKL抗体群およびsham+rRANKL群の6群にそれぞれ5匹のマウスを割り振り検討した。血液サンプルは、再灌流後3, 6, 9, 12, 24, 48時間に心臓採血、左腎を摘出した。血液は遠心分離（2500 xg for 10min）して血清と血漿の上清を分離し、測定まで-80 $^{\circ}$ Cで保存。血清クレアチニン（Cr）およびカルシウム（Ca）を酵素免疫測定法（EIAs）で測定した。ウエスタンブロッティングを行うため左腎は、1.0% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 μ g/ml ロイペプチン, 1 μ g/ml ペプスタチンA, および1 mMを含む溶解バッファーでhomogenizeした。電気泳動により分離し、次にニトロセルロースメンブレンに転写、メンブレンは、0.1% Tween-20を含むトリス緩衝生理食塩水中の5%スキムミルクで4 $^{\circ}$ C一晩ブロッキングした。抗体には、RANKL（sc-37,709 : Santa Cruz, CA）, RANK（ab13918 : Abcam, UK）, 誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）（ab178945 : Abcam, UK）, TNF- α （sc-52,746 : Santa Cruz, CA）, IL-6（ab208113 : Abcam, UK）, Toll-like receptor 4（TLR4）（bs-1021R : Bioss, MA）, およびMyD88（ab2064 : Abcam, UK）を用い、Tris Buffered Saline-Tween20（TBST）で5分間3回洗浄した後、二次抗体と室温で45分インキュベートしたのちECLシステム（GE Healthcare, IL）を使用して信号を検出した。すべてのウエスタンブロッティングデータは、 β -アクトリンとの比で均一化した。また組織学的検討として左腎臓

を10%ホルマリン固定およびパラフィン包埋し、3 μ mに薄切、HE染色後、光学顕微鏡で検討した。さらに切片は、RANKL, RANK, およびCD68に対するマウスモノクローナルIgG抗体でも染色した (bs-0649R : Bioss, MA) 。特に再灌流12時間後の連続切片においてRANK発現細胞の局在, およびRANK発現細胞がCD68で共染色されるか否かを検討した。また各群で、Image J (National Institutes of Health) を使用して、切片あたりランダムに3視野でのCD68陽性細胞の数を100倍率でカウントした。尿細管損傷の程度は、細胞壊死、刷子縁の喪失、ギブス形成、および尿細管拡張を認める尿細管の割合によって次の様にスコア化 (0点 : なし, 1点 : $\leq 10\%$, 2点 : 11~25%, 3点 : 26~45%, 4点 : 46~75%, 5点 : $> 76\%$) した [14] 。統計学的検討はStatMateVを使用し、Studentのt検定においてp値 < 0.05 を統計学的な有意差ありと定義した。すべての値は中央値および標準偏差として示した。

5. 結果

5. 1) 虚血再灌流障害はRANKLとRANKの発現を亢進。

I/R群において血清Cr値は継時的に上昇し、3時間時点をもってsham群より有意差をもって上昇 (0.19 ± 0.04 mg / dl vs. 0.43 ± 0.02 mg / dl, $p < 0.01$) したが48時間時点では減少に転じた (図1) 。再灌流後の3, 6, 12, および24時間後、RANKLとRANKの発現レベルをウエスタンブロットにて検討したところ、RANKLは再灌流後24時間まで上昇、RANKは再灌流後12時間までは上昇したが24時間には減少に転じた (図2) 。

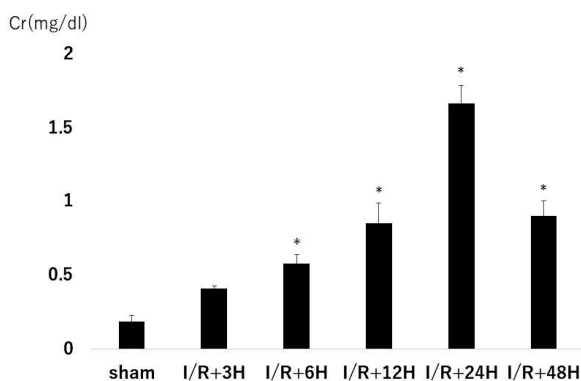


図1

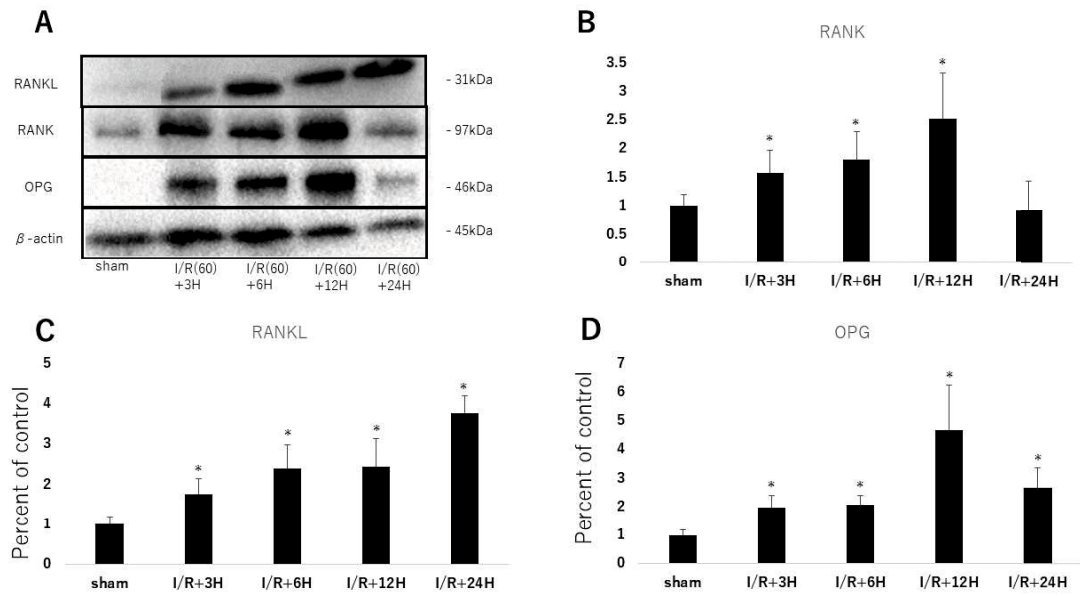
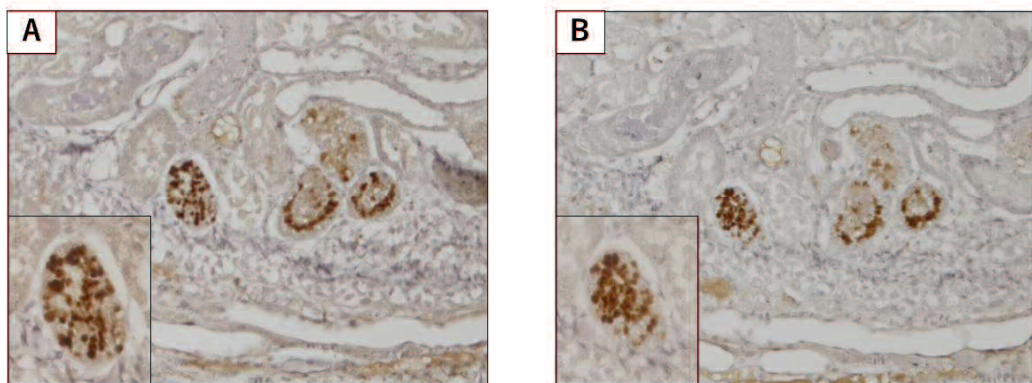


図2

5. 2) RANKはCD68陽性の浸潤細胞で発現.

RANK発現の局在を検討するため再灌流12時間時点での組織における連続切片でRANKの免疫染色を行ったところ間質へ浸潤した細胞で染色を示した. 連続切片でマクロファージ特異的膜抗原であるCD68で染色したところ同一細胞で染色性を示した. (RANK (図3A) とCD68 (図3B)) 一方で, RANKLは近位尿細管細胞で発現が認められた. (図3C) .



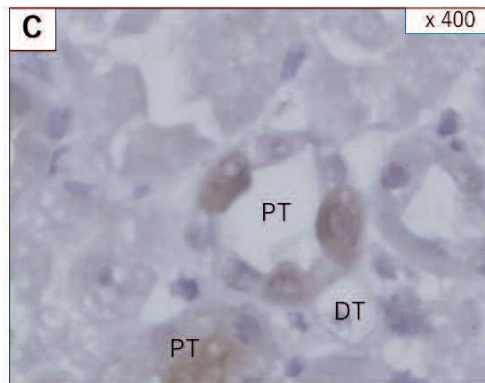


図3

5. 3) RANKL-RANKシグナルは、虚血再灌流障害後の腎機能を改善.

抗RANKL抗体投与群 (I/R + anti RANKL) で再灌流後24時間および48時間でI/R群と比較し有意に血清Cr値が上昇した (1.58 ± 0.16 mg / dl vs. 1.88 ± 0.05 mg / dl, $p < .05$, 1.01 ± 0.12 mg / dl vs. 2.17 ± 0.11 mg / dl, $p < .05$). 一方でrRANKL投与群 (I/R + rRANKL) では再灌流後24および48時間でI/R群と比較し有意に血清Cr値が低下した. (1.58 ± 0.16 mg / dl vs. 1.33 ± 0.19 mg / dl, $p < .05$, 1.01 ± 0.12 mg / dl vs. 0.79 ± 0.13 mg / dl, $p < .05$) (図4).

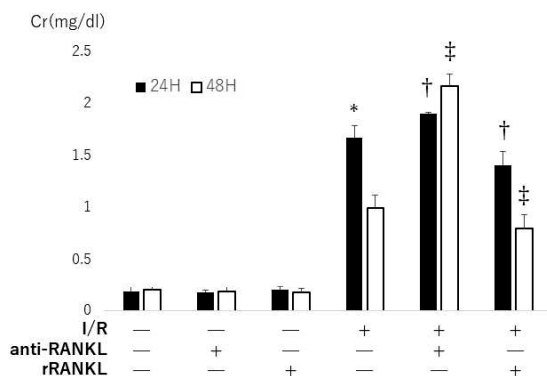


図4

抗RANKL抗体およびrRANKLのsham群への投与は血清Crレベルに影響を与えなかった. 抗RANKL抗体, rRANKLの投与量と投与方法は過去の報告に基づいて行った [11, 15, 16].

障害の程度を組織学的に評価するためsham, I/R, I/R + 抗RANKL抗体, およびI/R + rRANKLそれぞれ群のHE染色を行った結果を図5に示す. shamと比

較したI/R群は細胞壊死，刷子縁の喪失，ギブス形成，および尿細管拡張を認めた（図5A, B）．I/R + 抗RANKL抗体ではさらに組織障害の面積は増大した（図5C）．一方で，I/R + rRANKLでは，I/R群に比べて損傷領域を有意に減少させた（図5D）．前述のスコアリングによる評価を図5Eに示す．

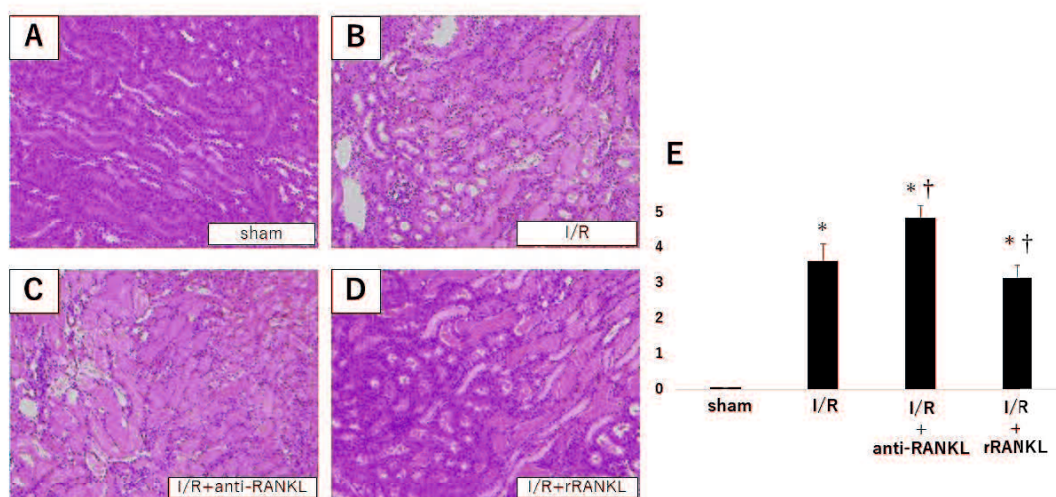
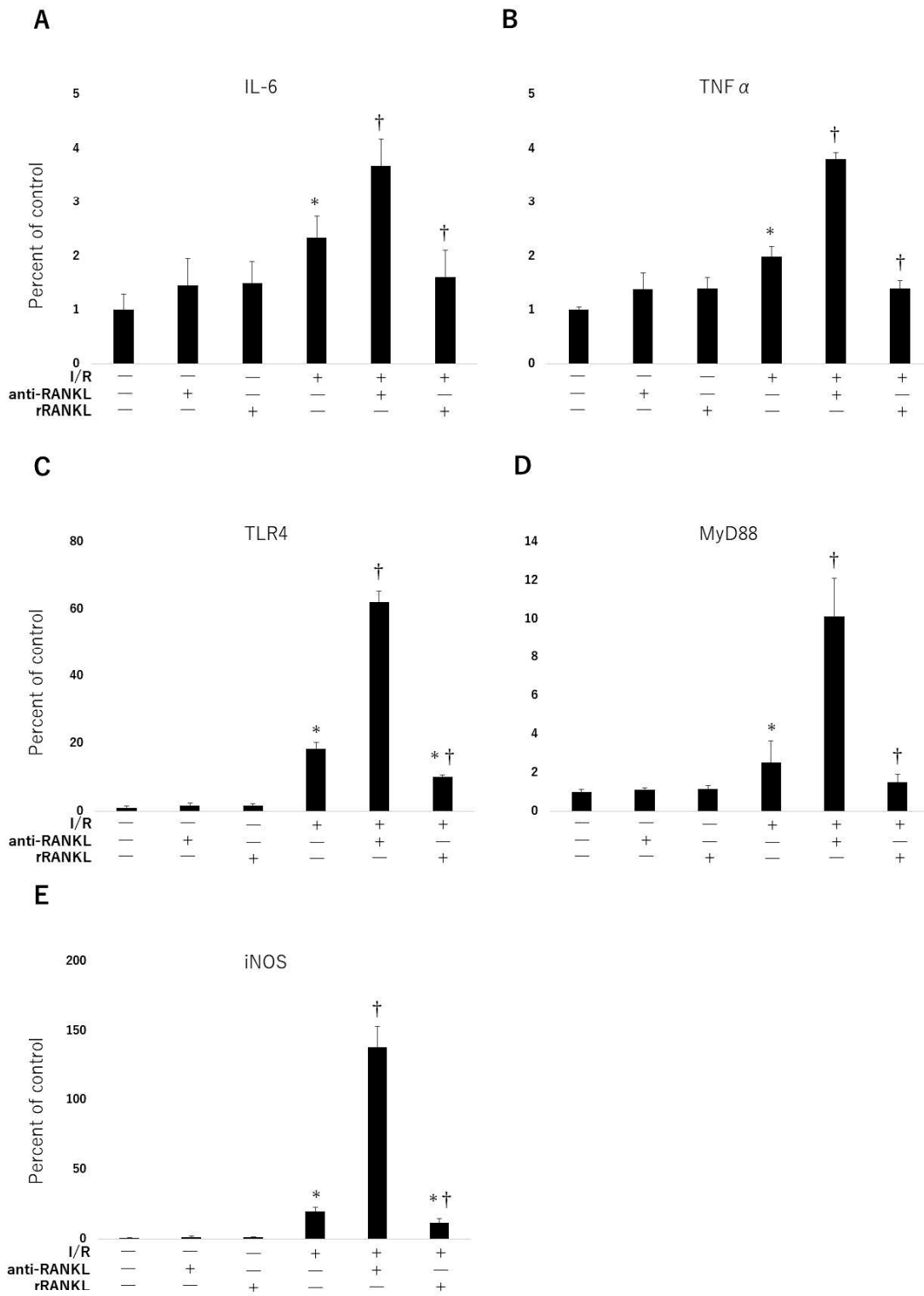


図5

5. 4) RANKL-RANKシグナルは，マクロファージ機能に影響を与え炎症性サイトカインを阻害．

再灌流24時間後，左腎におけるIL6とTNF α の発現レベルを，sham, I/R, I/R + 抗RANKL抗体，およびI/R + rRANKLそれぞれ群のウエスタンブロットにより検討した．Shamにおいてはほぼ発現は認められなかったが，I/R群では有意に発現誘導された．I/R + 抗RANKL抗体群では，発現レベルはI/R群のそれよりも著しく亢進，一方でI/R + rRANKL群では，I/R群よりも有意に発現が抑制された（図. 6A, B）．TLR4とMyD88の発現レベルは，前術の炎症性サイトカインの発現レベルと同様の動向を示した．（図6C, D）．iNOSの発現レベルも前術の炎症性サイトカインの発現レベルと同様の動向を示した（図6E）．



6

RANKL-RANKシグナルがマクロファージにどのように影響し炎症性サイトカインを抑制するかを検討するため、腎実質に遊走するCD68陽性細胞のカウントを行った。Shamと比較しI/R群で有意にCD68陽性細胞の浸潤が増加した。しかし、抗RANKL抗体、rRANKLの投与はその細胞数に影響を与えなかった（図7A～E）。

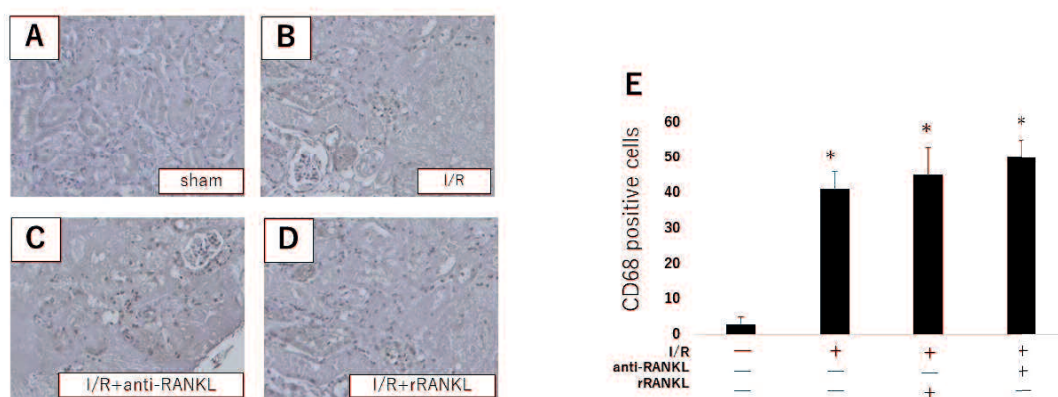


図7

6. 考察

本研究はマウス腎虚血再灌流障害モデルにおけるRANKL-RANK系の作用について初めて明らかにした研究である。最も注目すべき結果はRANKLの阻害は腎虚血再灌流障害を増悪させ、逆にRANKLを投与するとその障害の程度が軽減されることである。同様の結果は、肝臓、中枢神経系における虚血再灌流障害において報告が見られる。[16, 17] その機序として、RANKが再灌流後に遊走してきたマクロファージ上に発現し、マクロファージ上でのRANKL-RANKの刺激がその保護作用として重要であることを突き止めた。今回、用いたマウス腎虚血再灌流モデルは先の研究で用いたものであり[3]、阻血時間に関しては、様々検討したが60分が障害の程度が血清Crで観察可能で、尚且つ可逆性変化である点で最も妥当であると判断した。

RANKとRANKLの発現レベルは再灌流後12時間でピークに達し、24時間で減少に転じた（図2）。組織学的な検討でRANKは遊走細胞で陽性であり、その細胞はマクロファージのマーカーであるCD68に共染色を示すことが明らかとなった（図3A, B）。一方で、RANKLは皮髄境界域の近位尿細管細胞に発現した（図3C）。RANKは骨代謝においてCD68陽性の単球、マクロファージに発現

し、RANKLが結合することで破骨細胞に分化することが知られており [4, 5] , 本研究でもCD68の検討を行うに至った. RANKはshamですでに発現が確認されるものの, RANKLは確認できない (図2A) がこれは腎循環血液中に存在するマクロファージ上のRANKを見ている可能性が示唆される. RANKと腎に関するほかの研究では, マウス糸球体障害モデルがあり, RANKが糸球体ポドサイトで発現することを報告している [18] . 一般的に, 糸球体ポドサイトは虚血に強いとされ, 今回の虚血再灌流障害モデルでは糸球体での発現は見られなかったものと推察される. RANKLは皮髄境界域の近位尿細管細胞に発現した (図3C) . これは以前より近位尿細管細胞は障害や虚血により様々なケモカインやサイトカイン, 補体を放出することが知られており [19, 20] , その現象の一つとして説明できるかもしれない.

虚血再灌流障害におけるRANK, RANKLの作用を検討するために, 虚血24時間前に抗RANKL抗体, RANKLを投与したモデルを作成したが, 投与方法と投与量は先の研究を参考にした [11, 15, 16] . RANKLの阻害は腎虚血再灌流障害を機能的にも組織学的にも増悪させることが判明した (図4, 5) . さらに, RANKL阻害によりIL-6, TNF α の発現が亢進することがわかった. IL-6, TNF α はNF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, p38-mitogen-activated protein kinaseなどを介し細胞死に導く [21] . 我々は以前にTNF α のモノクローナル抗体であるInfliximab (IFX) でTNF α を阻害すると腎虚血再灌流障害が改善することを示した [3] . 今回の研究で, RANKLを投与した場合には腎虚血再灌流障害を機能的にも組織学的にも改善させることが判明した (図4, 5) . さらに lipopolysaccharides (LPS)や, flagellin, 虚血による細胞障害で生じるdamage-associated molecular patterns (DAMPs)を認識するTLR4とそのアダプター因子であるMyD88は炎症性サイトカインと同様の動向を示すことが分かった.

虚血再灌流障害において, マクロファージ上のTLR4が虚血により生じたDAMPsを認識すると細胞障害性マクロファージ (M1マクロファージ) に分極化する. M1マクロファージは炎症性サイトカインを放出するほか, TLR4の発現も亢進し, さらなる炎症を誘導し, 組織障害を増悪させる. 我々はRANKL-RANKのシグナリングは遊走マクロファージ上で起こるが, これを阻害するとTLR4の発現亢進と炎症性サイトカイン産生亢進が起こることを突き止めた. これはRANKLの阻害はマクロファージのM1マクロファージへの分極を亢進することを示唆する. この考えを支持する所見としてRANKLの阻害の有無で遊走マクロファージの細胞数に変化がないことがあげられる (図7) . これはTLR4や炎症性サイトカインの変化は単純にマクロファージの細胞数によるものではなく, 各々にマクロファージ上での変化であることを示している. 要約するとRANKL-RANKシグナリングはマクロファージが細胞障害性マクロファージに

分極化することを阻害し、過度な炎症を抑制していると考えられる（図8）。

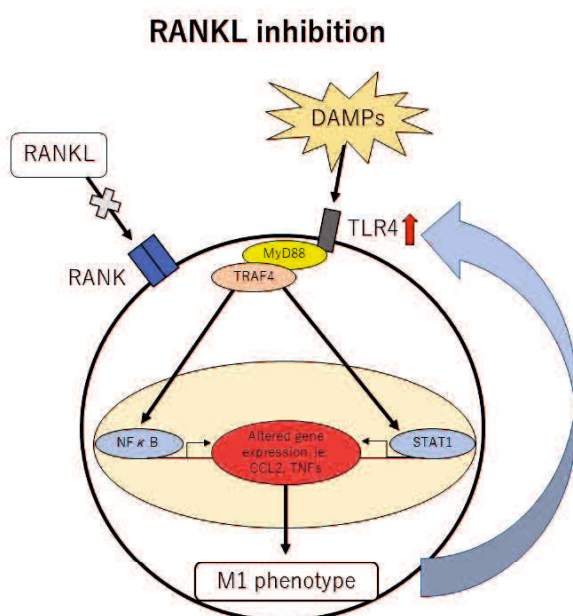


図8

同様の所見として、脱落膜における異常な低RANKL環境は胎児のM1マクロファージへの異常分極を引き起こすことが報告されている [23]。この報告ではRANKL-RANKはマクロファージをAkt/STAT6-Jmjd3/IR4シグナリングを介してM2マクロファージへ分極化すると説明されている。

加えてiNOSはマクロファージの炎症応答において重要な酵素であり、炎症環境におけるiNOSの制御は自然免疫系の制御に重要であるとされるが [24]、これもRANKLの阻害により発現亢進した（図6E）。我々は以前に精巣の虚血再灌流障害モデルにおいてiNOSが再灌流後に精巣内に発現亢進することを報告したが、その局在は精巣の構成細胞ではなく遊走細胞であることを報告した

[25]。これは虚血再灌流障害の病態理解においては遊走細胞の影響が非常に重要であることを示す例であるといえる。

腎移植においてもマクロファージの分極化抑制が術後腎機能障害を改善することが報告されてきた [26]。さらに移植片におけるマクロファージの活性化は急性抗体関連拒絶、急性細胞性拒絶との関連も報告されている [27]。そのためマクロファージの極性の制御は腎移植において非常に重要であるといえる。

RANKLは肝臓、中枢神経系の虚血再灌流障害モデルにおいて組織保護作用を示したと述べたが、その作用機序は臓器毎で異なる報告がなされている。まず肝臓においてはNFκBがbcl-2を介してアポトーシスを抑制するという背景が

あり、そのためRANKLによりNF κ Bが活性化されると臓器保護を示すという機序が示されている [16, 17]。これは腎臓と背景が異なり、腎臓においてNF κ Bは、逆にアポトーシスを誘導し臓器障害を引き起こすため [28]、臓器保護の機序は肝と腎では異なると言える。一方で、中枢神経系においてはRANKLにより虚血再灌流後の梗塞領域や浮腫が軽減されることが分かっているが [29]、これはRANKLがミクログリアにおけるTLRシグナリングを抑制し抗炎症作用により臓器保護を示すとの説明がされている。この機序は今回我々が腎臓において示した機序と近いものと言える。

本研究ではいくつかのlimitationが挙げられる。まず、in vivoによる検討であり、どのようにRANKLがTLR4の発現を介して炎症性サイトカインの産生を制御するかが不明確である点である。これには単離したCD68細胞においてin vitroレベルでの検討が必要であろう。次にRANKLの他臓器への影響が不明である点が挙げられる。腎移植において腎保護目的にRANKL製剤を検討するには骨代謝をはじめとする様々な要因を検討すべきであろう。

7. 結語

腎虚血再灌流障害は腎移植において必ず付きまとう問題である。この障害の程度により腎機能発現の遅延や拒絶リスク、ひいては長期のgraft survivalにも影響する。本研究はRANKLの腎虚血再灌流障害における腎保護作用を示した。これは今後の腎移植医療において虚血再灌流障害の新たな治療戦略の一部になり得ると考えられるが、今後より一層の検討が必要である。

8. 参考文献

- [1] J.V. Bonventre, J.M. Weinberg, Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003) 2199–2210, <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000079785.13922.f6>.
- [2] L.R. Requião-Moura, S. Durão Mde, E.J. Tonato, et al., Effects of ischemia and reperfusion injury on long-term graft function, *TPS.* 43 (2011) 70–73, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.12.012>.
- [3] Y. Nagata, M. Fujimoto, K. Nakamura, et al., Anti-TNF- α agent infliximab and splenectomy are protective against renal ischemia-reperfusion injury, *Transplantation* 100 (2016) 1675–1682, <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001222>.
- [4] P. Devarajan, Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury, *J. Am.*

- Soc. Nephrol. 17 (2006) 1503–1520, <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010017>.
- [5] H. Jang, H. Rabb, The innate immune response in ischemic acute kidney injury, *Nephrology* 130 (2010) 41–50, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.016>.
- [6] R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell*. 104 (2001) 487–501.
- [7] L.J. Robinson, C.W. Borysenko, H.C. Blair, Tumor necrosis factor family receptors regulating bone turnover new observations in osteoblastic and osteoclastic cell lines, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 443 (2007) 432–443, <https://doi.org/10.1196/annals.1402.025>.
- [8] M.C. Walsh, Y. Choi, Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone and beyond, *Front. Immunol.* 5(2014)1–11, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00511>.
- [9] N. Takahashi, Bacterial components and bone resorption, *Int. Congr. Ser.* 1284 (2005) 123–130.
- [10] D.M. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, et al., A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature*. 390 (1997) 175–179, <https://doi.org/10.1038/36593>.
- [11] B.R. Wong, R. Josien, S.Y. Lee, et al., TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor, *J. Biol. Chem.* 186 (1997) 2075–2080, <https://doi.org/10.1084/jem.186.12.2075>.
- [12] Y.Y. Kong, H. Yoshida, I. Sarosi, et al., OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis, *Nature*. 397 (6717) (1999) 315–323, <https://doi.org/10.1038/16852>.
- [13] K. Maruyama, Y. Takada, N. Ray, et al., Receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice, *J. Immunol.* 177 (2006) 3799–3805, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3799>.
- [14] K. Yamada, T. Miwa, J. Liu, et al., Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59, *J. Immunol.* 172 (2004) 3869–3875, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3869>.
- [15] E. Fábrega, A. Orive, M. García-Unzueta, et al., Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand system in the early post-operative period of liver transplantation, *Clin. Transpl.* 20 (2006) 383–388, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2006.00497.x>.
- [16] Y. Furuya, K. Mori, T. Ninomiya, et al., Increased bone mass in mice after single injection of anti-receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-neutralizing

- antibody: evidence for bone anabolic effect of parathyroid hormone in mice with few osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 37023–37031, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.246280>.
- [17] T. Shin, S. Kuboki, A.B. Lentsch, Roles of nuclear factor- κ B in postischemic liver, *Hepatol. Res.* 38 (2008) 429–440, <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00303.x>.
- [18] S. Liu, W. Shi, H. Xiao, et al., Receptor activator of NF-kappaB and podocytes: towards a function of a novel receptor-ligand pair in the survival response of podocyte injury, *PLoS One* 7 (7) (2012) e41331, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041331>.
- [19] M.R. Daha, C. Van Kooten, Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol. Dial. Transpl.* 15 (2000), https://doi.org/10.1093/ndt/15.suppl_6.41.
- [20] B.A. Yard, M.R. Daha, M. Kooymans-Couthino, et al., IL-1 alpha stimulated TNF alpha production by cultured human proximal tubular epithelial cells, *Kidney Int.* 42 (1992) 383–389.
- [21] H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 45–65, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>.
- [22] J. Pajarinen, E. Jansen, Y.T. Kontinen, et al., Innate immune reactions in septic and aseptic osteolysis around hip implants, *J. Long-Term Eff. Med. Implants* 24 (4) (2014) 283–296.
- [23] Y. Meng, W. Zhou, L. Jin, et al., RANKL-mediated harmonious dialogue between fetus and mother guarantees smooth gestation by inducing decidual M2 macrophage polarization, *Cell Death Dis.* 8 (10) (2017) e3105, <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.505>.
- [24] N. Takeda, E.L. O’Dea, A. Doedens, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis, *Genes Dev.* 24 (5) (2010) 491–501, <https://doi.org/10.1101/gad.1881410>.
- [25] K. Shiraishi, K. Naito, K. Yoshida, Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat, *Biol. Reprod.* 65 (2001) 514–521, <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.2.514>.
- [26] V. Masola, G. Zaza, G. Bellin, et al., Heparanase regulates the M1 polarization of renal macrophages and their crosstalk with renal epithelial tubular cells after ischemia/reperfusion injury, *FASEB J.* 32 (2) (2018) 742–756, <https://doi.org/10.1096/fj.201700597R>.
- [27] K.J. Tinckam, O. Djurdjev, A.B. Magil, Glomerular monocytes predict worse

outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status, *Kidney Int.* 68 (4) (2005) 1866–1874, <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00606.x>.

- [28] A. Kezić, N. Stajic, F. Thaiss, Innate immune response in kidney ischemia/reperfusion injury: potential target for therapy, *J Immunol Res* 2017 (2017) 6305439, <https://doi.org/10.1155/2017/6305439>.
- [29] M. Shimamura, H. Nakagami, M.K. Osako, et al., OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 8191–8196, <https://doi.org/10.1073/pnas.1400544111>.