

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19461

研究課題名(和文)尿毒症物質による認知機能障害の病態解明に関する研究

研究課題名(英文)Chronic kidney disease (CKD) and Cognitive impairment: Possible mechanisms of Cerebro-renal interaction

研究代表者

渡邊 公雄 (Watanabe, Kimio)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：20595607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(Chronic kidney disease, CKD)における認知機能障害の機序を解明するために、腎毒性物質のアデニンを用いたCKDモデルラットを用いた検討を行った。CKDラットの半数で海馬の組織障害を認め、さらに詳細な解析により、この機序として酸化ストレス亢進、抗酸化系の障害、レニン-アンギオテンシン-アルドステロンシステム(RAS)活性化、神経伝達物質の変化が関与しているものと推測された。

研究成果の概要(英文)：Recent study demonstrated that one third of CKD patients developed cognitive impairment, which is also revealed as an independent risk factor for survival. However, concise mechanism of cerebro-renal interaction has not been clarified. We aimed to examine the pathophysiology of cognitive dysfunction accompanied by CKD. The groups did not differ in cognitive functioning during the course of study. Histologically, increased numbers of pyknotic neuronal cells were observed in the hippocampus in a half of CKD rats, but this change was not observed in the control. CKD rats accompanied with hippocampus damage demonstrated the tendency of poor learning process, higher activity, oxidative stress makers, systolic blood pressure, pulse pressure, urinary angiotensinogen and lower antioxidant markers. Multiple factors are speculated as the pathophysiology of cognitive impairment accompanied by CKD.

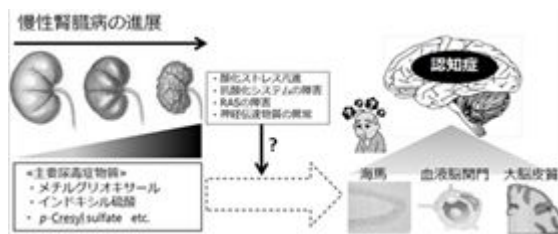
研究分野：腎臓内科学

キーワード：脳腎関連障害 認知機能障害 慢性腎臓病

### 1. 研究開始当初の背景

保存期 CKD および透析患者の高齢化が進む本邦において、臓器(脳-腎)連関障害における尿毒症物質の病因的意義を明らかにし、CKD 患者に合併する認知症の治療戦略の契機を見出すことは重要な課題と考えられるが、この分野の研究は十分に進んでいるとは言えず、特に尿毒症物質による認知機能障害に関しては、そのメカニズム、病態、対策方法を含め、基礎的な検討がほとんどなされていない。

近年の大規模臨床研究において慢性腎臓病(chronic kidney disease, CKD)患者の16~38%で記憶保持や実行機能の障害を中心とした中等度から重度の認知機能障害が合併することが報告されている。本邦では高齢者の約3割に種々の程度のCKD合併がみられ、また、過去20年で透析患者の平均年齢は10歳以上高齢化している(2015年末で67.5歳)。この高齢化の傾向は今後も続くと考えられ、ますます腎不全患者の認知症が解決すべき重要な課題となっていくと思われる。保存期CKDおよび透析患者の認知症は内服治療や食事療法に対するアドヒアランス低下、医療スタッフの時間的拘束(具体的には血液透析治療中の不穏や自己抜針、透析間体重増加など)、入院リスクの上昇、医療費の増大ばかりでなく、患者生命予後も大きな影響を及ぼすことが示されている本研究は認知症の病態を腎不全の観点から捉え、遠隔臓器による臓器連関障害について検証するという新たな試みであり、これによりもたらされる成果は脳腎連関障害の病態解明にとどまらず、病態制御を目的とした新規薬剤や血液透析膜、腹膜透析液の開発へとつながっていくことが期待される。そして、最終的には認知症合併CKD患者の生活の質向上、周囲環境への影響改善、生命予後の改善、さらに医療費の削減効果ももたらされることが期待される。以上より本研究は社会貢献の一面も有する重要な研究課題であると考えられる。



図：慢性腎臓病の進展と脳腎連関障害

### 2. 研究の目的

慢性腎臓病(CKD)患者では認知機能障害が高頻度で合併することが示されており、そのCKD特有の要因として、腎性貧血、二次性副甲状腺機能亢進症、尿毒症物質、血液透析による不均衡状態などが想定される。このうち尿毒症物質が認知機能障害の直接的原因となるかどうか、また、その機序はどのよ

うなものか現時点で明らかでない。尿毒症物質はこれまでに153種類が同定されているが、この中でもインドキシル硫酸(Indoxyl sulfate, IS)、メチルグリオキサル(methylglyoxal, MGO)、p-Cresyl sulfate(PCS)は蛋白結合率が高く、海馬や大脳皮質を中心とした脳への蓄積性が懸念され、さらに血液脳関門(blood brain barrier, BBB)に対する障害を引き起こし得るとされる。これまでの基礎的検討でラット海馬培養神経細胞に対するMGO暴露により炎症性サイトカインが発現し、神経細胞のアポトーシスを引き起こすこと、また、シスプラチン腎症モデルラットにおいてBBBトランスポーターの機能不全を介したIS、PCSの脳内への蓄積が見られることなどが確認されている。しかしながらこれら主要尿毒症物質がCKDに合併する認知機能障害という臓器(脳-腎)連関障害の病態においてどのような意義を持つのかは明らかではない。

本研究は主要尿毒症物質が脳の構造と機能にどのような変化をもたらすかを動物実験により解明することを目的とする。本研究の成果によりCKD患者に合併する認知症に対する特異的な治療法の開発ならびにQOLと生命予後改善の契機を見出すことが期待される。CKDにおける脳の機能的および構造的障害はこれら様々な因子の連関によりもたらされるものと推測される。しかしながら、この詳細な機序は現時点で明らかにされていない。そこで、今回我々は腎毒性物質であるアデニンをラットに投与した腎障害モデルラットを用いて、これを明らかにすることを目的とした研究を行った。

### 3. 研究の方法

使用動物は5週齢のオス、Sprague-Dawley(SD)ラットを用いた。本研究は福島県立医科大学実験動物施設による承認を受けた研究(承認番号:27088号)であり、すべての過程はNIH実験動物適正使用ガイドラインに則り実施した。まず29匹のSDラットをコントロール群:14匹とCKD群:15匹に振り分け、CKDラットは0.5%アデニン含有飼料を3週間(5~8週齢にかけて)投与することでCKDモデルラットとした。

12~20週齢にかけて空間記憶および学習の評価としてモーリス水迷路試験を実施した。直径150cm、深さ45cmの円形のプールに30cmまで水を張り、ラットの避難場所となるプラットホームは水面下3cmに隠れるように配置した。コンピュータ管理システム(Smart version 3.0, Panlab)を用いて、全ラットの行動パターンを記録・解析した。プレイスナビゲーションテストを4セット(Phase 1~4、各Phaseは5回のテスト結果の平均として評価)実施した後に、プローブテストを行ない、各ラットの行動パターン、所要時間、遊泳速度などを空間学習と空間記

憶の指標として評価した。プローブテストではプラットフォームを取り除いた状態でラットを遊泳させ、プラットフォーム領域での滞在時間や移動距離を空間記憶の指標として評価している。

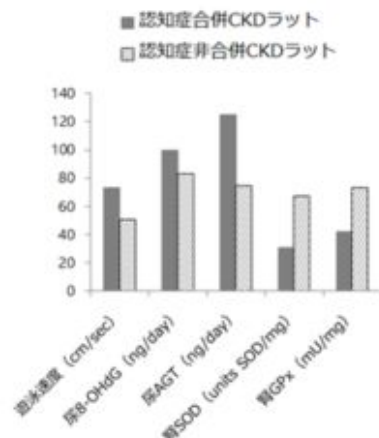
ラットを行動実験終了後の24週齢時点で、Sacrificeし、尿検体、血液、腎組織、脳組織の解析を実施した。一般的な検査に加えて、酸化ストレスマーカーとして、尿中8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)、尿中イソプラスタン(Isoprastane, IsoP)、腎および脳スーパーオキシドディスムターゼ(Superoxide dismutase, SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(Glutathione peroxidase, GPx)を、また、レニン-アンギオテンシン-アルドステロンシステム(Renin-angiotensin-aldosterone system, RAS)の活性化の指標として尿中アンギオテンシノゲン(Angiotensinogen, AGT)の解析も併せて実施した。脳組織はヘマトキシリンエオジン(HE)染色により、腎組織はPeriodic acid-Schiff(PAS)染色による評価を行った。

また、コントロール群14匹中の5匹とCKD群15匹中の6匹の脳組織の解析を行っており、CKD群6匹のうち3匹で海馬神経細胞の変性が認められた。海馬障害の有無に関する要因を解析するために、これらCKD群ラット6匹の各種マーカーおよび行動実験結果についても同様に別途解析を行った。

#### 4. 研究成果

コントロールおよびCKDの各群の背景として、尿量、尿蛋白、BUN、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、コレステロール値、体重などで有意な群間差を認めており、CKDによる変化としてこれらは矛盾のないものであった。特異的マーカーに関しては、CKD群で尿中8-OHdG、尿中isoprastane、尿中angiotensinogenが高値であり、CKDにおける酸化ストレスの増強やRAS活性化を示唆する所見であった。

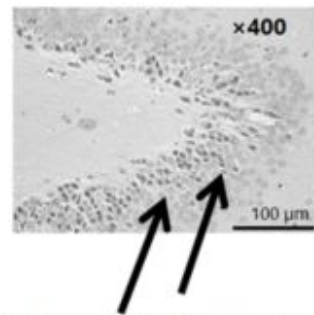
図：炎症状態(酸化ストレス)の変化



組織学的にCKDラット腎では尿細管間質領域を主体とした2次性の糸球体障害を伴う障害が認められた。行動実験では2群間で学習進度に差は見られなかったが、CKD群では遊泳速度が速い傾向であった。また、脳組織を解析したCKDラット6匹のうち3匹で海馬神経細胞の変性所見が認められた。この変化はコントロール群では見られなかった。さらに、脳組織障害を伴うCKDラットでは血圧高値、脈圧高値、尿中8-OHdGおよびangiotensinogenの高い傾向、腎SODおよびGPxの低い傾向などが認められ、さらにこれらのラットでは行動実験の成績も不良の傾向であった。

本研究では、全体として行動実験における学習進度にコントロール群とCKD群で有意な差を認めなかった。しかし、海馬神経細胞の障害がみられたCKDラットでは行動実験の成績が不良であるとともに、遊泳速度が速いこと、酸化ストレス亢進、抗酸化システムの障害、RAS活性化などの所見が得られた。

図：CKDラットにおける海馬神経細胞障害



海馬アンモン角神経細胞の変性(認知機能障害合併CKDラット)

まず、海馬障害CKDラットの活動性亢進に関しては、脳内の神経伝達物質の関与が推測された。抑制性の神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(Gamma-aminobutyric acid, GABA)やルエピネフリン、さらには学習と記憶に関連するとされるアセチルコリンは、腎不全でその脳内含有量が3割程度減少することが知られている。本研究における海馬障害CKDラットの活動性亢進はこれら神経伝達物質の関与が考慮された。また、高血圧症はCKDにおける認知症発症の古典的リスク因子のひとつであるが、本研究の海馬障害CKDラットでも血圧および脈圧の上昇とRAS活性化を示唆する尿中アンギオテンシノゲンの上昇が確認された。臨床研究と動物実験においてRAS遮断薬が脳梗塞の再発や認知症発症に対して予防的効果を認めることが報告されており6, 7、逆説的ではあるが、CKDにおけるRAS活性化が認知機能障害へ影響する機序が一部存在する可能性が本研究結果より示唆された。さらに、酸化ストレス亢進が5/6腎

摘CKDモデルマウスの検討で認知機能障害に寄与することが報告されているが<sup>8</sup>、本研究結果は酸化ストレスの亢進だけではなく、抗酸化システムの障害も同様にCKDにおける認知機能障害に寄与する可能性を示している。これらの結果に関しては各々の機序に関するさらなる詳細な検討が必要であると考えられた。

最後に本研究におけるリミテーションを示す。まず、アデニン投与CKDモデルラットは全体としてはコントロール群と認知機能テストにおける学習進度に差が見られなかった点、そして、全例で脳組織の解析が行われていない点が挙げられる。認知機能障害はCKDの約30%程度でみられ、その重症度は年齢と腎機能に依存することが知られている。我々のプレリミナリーの研究において、アデニンを5週間にわたり投与したところ、腎機能障害のレベルは本研究におけるものよりも有意に高いものであった(平均BUN 228.5 mg/dL, 平均血清クレアチニン 2.96 mg/dL)。しかし、このモデルにおいては尿毒症や高度の腎性貧血などの腎不全に関連する諸症状のために動物自体の衰弱、消耗が著しく、行動実験を完遂することが困難であった。CKDにおける認知機能障害は、神経変性型と血管障害型の組み合わせによるものと考えられ、また、糖尿病の合併や尿毒症物質は重要なリスク因子と考えられている。これらを踏まえると、本研究に用いたモデルに脳虚血再灌流処置を加えたり、糖尿病合併モデルを用いたり、尿毒症物質を追加投与することなどにより、認知機能障害を同定することができるようになるのかもしれない。

本研究にはいくつかのリミテーションがあるが、海馬組織障害を伴う認知機能障害に關与すると推測される因子として、酸化ストレス亢進、抗酸化システム障害、RAS活性化、神経伝達物質の変化など重要なファクターを示すことができた。これらの所見は今後の本分野の研究を進めるにあたっての基礎的な重要な知見となると考えられた。

#### 〔引用文献〕

1. McQuillan R, Jassal SV. : Neuropsychiatric complications of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 471-479.
2. Khatri M, Nickolas T, Moon YP, et al. : CKD associates with cognitive decline. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2427-2432.
3. Lu R, Kiernan MC, Murray A, et al. : Kidney-brain crosstalk in the acute and chronic setting. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11: 707-719.
4. Watanabe K, Watanabe T, Nakayama M. : Cerebro-renal interactions: impact of uremic toxins on cognitive function. *Neurotoxicology* 2014; 44: 184-193.

5. Sweeney VP, Perry TL, Price JD, et al. : Brain gamma-aminobutyric acid deficiency in dialysis encephalopathy. *Neurology* 1985; 35: 180-184.

6. Li JM, Mogi M, Iwanami J, et al. : Temporary pretreatment with the angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, prevents ischemic brain damage through an increase in capillary density. *Stroke* 2008; 39: 2029-2036.

7. Iwanami J, Mogi M, Li JM, et al. : Deletion of angiotensin II type 2 receptor attenuates protective effects of bone marrow stromal cell treatment on ischemia-reperfusion brain injury in mice. *Stroke* 2008; 39: 2554-2559.

8. Fujisaki K, Tsuruya K, Yamato M, et al. : Cerebral oxidative stress induces spatial working memory dysfunction in uremic mice: neuroprotective effect of tempol. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 529-538.

9. Watanabe K, Okada K, Fukabori R, Hayashi Y, Asahi K, Terawaki H, Kobayashi K, Watanabe T, Nakayama M. *Toxins (Basel)*. 2014 Jan 7;6(1):254-69.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計1件)

第59回日本腎臓学会学術総会、アデニン負荷腎障害ラットにおける脳腎連関障害に関する検討 渡邊 公雄、朱 万君、菅野 真理、木村 浩、田中 健一、林 義満、旭 浩一、寺脇 博之、中山 昌明。  
2016年6月17日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

渡邊 公雄(WATANABE, Kimio)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号: 20595607