

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19470

研究課題名(和文)腎虚血再灌流、低酸素負荷マウスにおける脳腎関連の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of kidney-brain interaction in mouse models of renal ischemia/reperfusion injury and hypoxia

研究代表者

平野 麻子(権藤麻子)(HIRANO-GONDO, ASAKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：70385079

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文):脳腎関連を研究する動物モデルとして急性腎虚血再灌流モデルを樹立した。次に、再灌流処置後24時間で摘出したマウスの大脳を用い、腎虚血再灌流の影響について評価した。大脳皮質および海馬にミクログリアの浸潤を観察したが、個体によって差を認めた。神経細胞死においても解析したが、先行研究で免疫組織学的に示されている同モデルマウスにおける中枢神経系への炎症性変化や神経細胞死に一定の傾向は認められず、臓器連関は明らかではなかった。アクアポリン4、GFAP、ジストログリカン、Claudin5、HIF-1 発現について解析を行ったが、同モデルマウスにおいて腎臓と大脳とのネットワーク分子は明らかではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、慢性腎臓病患者では脳卒中が増えることや、腎機能低下とともに無症候性脳梗塞が高頻度に認められることが報告され、脳腎連関の存在がクローズアップされている。しかし、虚血時に遠隔臓器である腎臓と脳の血管障害が互いにどのような影響を及ぼしているのか、分子細胞レベルでは解明されていない。本研究の遂行により、多臓器間のネットワーク分子メカニズム解明から、血管障害性腎疾患に伴う中枢神経障害に対する新たな治療開発や高齢化社会で問題となる認知症の治療開発へ繋がることを期待されると考えられたが、本研究において腎臓と大脳とのネットワーク分子は明らかではなかった。

研究成果の概要(英文):We confirmed the model of the acute renal ischemia-reperfusion injury as an animal model to study kidney-brain interaction. Next, using the brain harvested at 24 h after surgery and processed for histologic examination, we evaluated the effect of renal ischemia reperfusion injury to the brain. We observed microglial cells in the cerebral cortex and hippocampus, but differences were noted among individuals. Although we also analyzed pyknotic neuronal cells, there was no definite tendency to the inflammatory change of kidney to the central nervous system in this model mouse which was shown in previous research. Aquaporin4, GFAP, -dystroglycan, Claudin5 and HIF-1 expressions were examined in this model mouse, the molecular mechanism of kidney-brain interaction was unclear.

研究分野：腎臓内科

キーワード：脳腎連関

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病 (CKD) と心血管疾患の関連を示すエビデンスが構築され、心腎連関の重要性が明らかになった。さらには、近年提唱されている Multi-organ interaction の 1 つとして、腎臓と遠隔臓器とのシグナルネットワークが関与すると考えられている。中枢神経と腎臓との連関、すなわち脳腎連関ネットワークについては今まで詳細な検討はなされていなかったが、脳梗塞患者の予後と腎機能との関連や、認知機能と腎機能が関連するとの報告が複数なされ、さらに腎虚血再灌流モデルにおいて腎臓の組織障害に付随して中枢神経系においても炎症性サイトカインの上昇や血管内皮細胞への影響も報告された。しかし、腎臓の虚血による血管臓器障害が遠隔臓器である脳神経において神経細胞死や炎症を誘導するメカニズムについては未知のままであった。こうした現状を踏まえ、腎虚血モデル動物および低酸素モデル動物を用いて、脳腎連関における血管障害分子メカニズムを解明することを目指す。

2. 研究の目的

近年、慢性腎臓病 (CKD) 患者では脳卒中が増えることや、腎機能の低下とともに無症候性脳梗塞が高頻度に認められることが報告され、脳腎連関の存在がクローズアップされている (Weiner, D. E. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2007)。無症候性の脳障害であっても腎機能や生命予後に影響を与えることが明らかになり (Kobayashi, M. et al., Am. J. Kidney. 2010) また、アルブミン尿は脳の白質病変やラクナ梗塞、脳卒中とも関連すると報告されたことから (Daniel, E. W. et al., Am. J. Kidney Dis. 2009) 極早期の腎障害ですら脳の微小血管障害を反映し、ひとつの臓器が障害を受けたときに、もうひとつの臓器も障害を受けるといった強い関連性が示され、その一因として血管の特異性が示唆されている。

生体は低酸素下で生存するための応答システムを兼ね備えているが、持続する低酸素状態はさまざまな疾患を引き起こす。Safran により、低酸素を感知できるモデルマウスを 8% の低酸素環境下におくと他の臓器よりも脳と腎では低酸素状態が保たれることが見出されている (Safran, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006)。これらの実験結果は、腎と脳は酸素を多く使う臓器であり、酸素の供給バランスが破綻した際に障害を受けやすいことを示している。しかし、虚血時に遠隔臓器である腎臓と脳の血管障害が互いにどのような影響を及ぼしているのか、分子細胞レベルでは解明されていない。

本研究において、腎虚血再灌流および低酸素モデルマウスを用い、脳腎連関における Multi-Organ interaction、特に急性腎障害によって誘導される脳血管障害分子メカニズムおよび神経細胞死を誘導する分子メカニズムを解明することを目的とする。

急性腎虚血に対する大脳皮質アストロサイトと脳血管ペリサイトを中心とした神経血管ユニットの応答を、Western blot 法、免疫組織化学法にて解析した後に、それらの知見を応用し、全身の低酸素状態が、腎傍尿細管毛細血管 (PTC) - ペリサイトおよび脳神経血管ユニット両者に及ぼす影響とその関連性を Western blot 法、免疫組織化学法、定量 PCR 法にて解析し、分子レベルでの脳腎連関を解明する。

本研究の遂行により、腎臓が障害された際遠隔臓器へ影響を与えるシグナル伝達機構、すなわち多臓器間シグナルネットワークの更なる理解に役立つとともに、血管障害性腎疾患に伴う中枢神経障害に対する新たな治療法開発へ繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) マウスの急性腎虚血再灌流モデルの樹立および同モデルにおける中枢神経系異常の評価
両側腎動脈クリッピングを用いた急性腎虚血再灌流モデルマウスを作製し、虚血再灌流処置後に大脳を摘出し、蛋白を抽出する。過去の報告では腎虚血再灌流により中枢神経系および末梢血中での炎症系サイトカインの上昇や炎症性細胞であるミクログリアの浸潤が示されている (Liu, M. et al. J. Am. Soc. Nephrol. 2008, Chou, AH. et al. Brain. Res. 2014)。そこで神経血管ユニットを成すアストロサイトおよび脳血管ペリサイトと、その周辺血管の炎症に関与する分子、および血管内皮機能に関与する分子の発現の変化を Western blot 法を用いた生化学的手法・免疫組織的手法により解析する。さらに、ここから明らかとなる分子応答の知見に基づき、定量 PCR 法を用い遺伝子レベルでの変化を解析する。

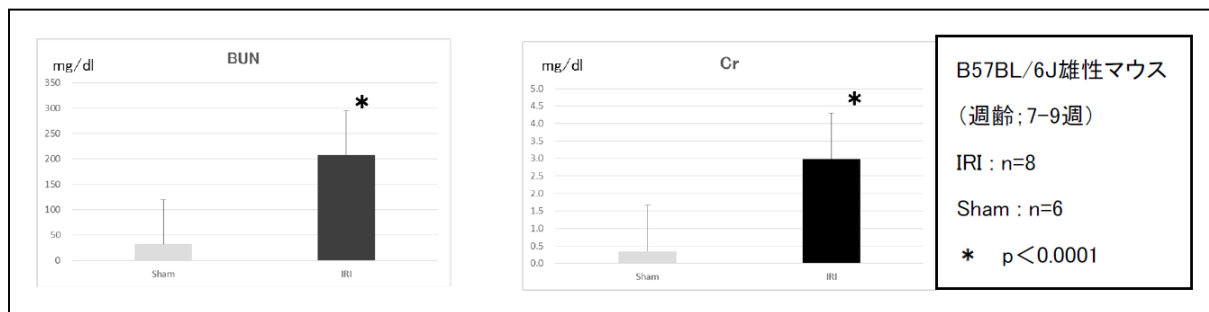
(2) 低酸素負荷マウスにおける脳腎連関の評価
次に、(1) により得られた分子応答の知見を応用し、低酸素負荷マウスを用いて、全身の低酸素状態に対し、腎傍尿細管毛細血管 (PTC) - ペリサイトおよび脳神経血管ユニットの両者に同時に生じる病態変化やその関連性を、Western blot 法を用いた生化学的・免疫組織的手法にて解析する。さらには定量 PCR 法を用い、遺伝子レベルでの変化を解析することで、分子レベルでの脳腎連関を解明していく。

4. 研究成果

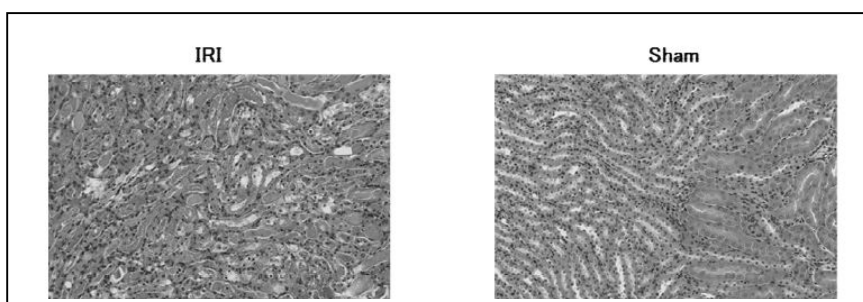
脳腎連関シグナルを研究する動物モデルとして急性腎虚血再灌流モデルを樹立した。本モデルは B57BL/6J 雄性マウス (週齢 ; 7-9 週) の両側腎動脈を 60 分クリッピングにより虚血した後に血流を再開し、再灌流することによりヒト脳梗塞モデルを模倣する疾患モデルである (図 1)。再灌流処置後 24 時間目に心臓採血を行ったところ、図 1 に示すように、本モデルでは血中尿素

窒素の有意な上昇および腎機能悪化を示すクレアチニンの上昇を認めた。図 1' は再灌流処置後 24 時間目の腎組織の光学顕微鏡像である。本病態モデルでは主に腎髄質において広範囲に組織病変が観察され、尿細管壊死、鬱血性出血など急性腎障害で認められる病理所見が得られた。これらの結果より、本モデルで急性腎障害を呈することを確認した。

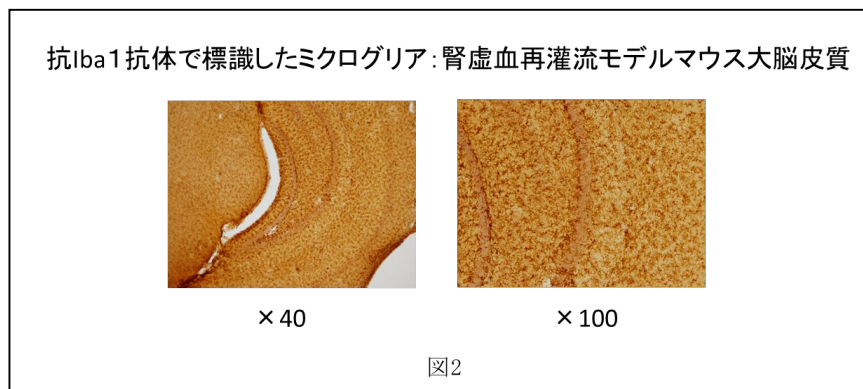
腎虚血再灌流モデルマウス (IRI) と Sham の血清 BUN および Cr 濃度 : 図 1



腎虚血再灌流モデルマウス (IRI) と Sham の腎組織像 (HE 染色): 図 1'



次に遠隔臓器である脳における腎虚血再灌流の影響について検討を行った。再灌流処置後 24 時間で摘出固定した同モデルマウスの脳を用いた免疫組織学的検討により、大脳皮質および海馬 CA1 領域および CA3 領域まで広範囲に、抗 Iba1 抗体陽性のミクログリアの浸潤を観察した(図 2)。すなわち、急性腎障害が中枢神経系において強い炎症反応を来すことを確認した。



しかし、こうした炎症性的変化であるミクログリアの浸潤は、個体によって大きな差を認めた。神経細胞死においても検討したが、同様に大きな個体差を認めたため、抜脳前の心臓採血の影響などを鑑み、実験条件を変更の上、生化学的解析および免疫組織学的解析を繰り返し行ったが、急性腎障害を認めるものの先行研究で免疫組織学的に示されている腎虚血再灌流モデルマウスにおける中枢神経系への炎症性変化や神経細胞死(Liu. M. et al. J Am Soc Nephrol. 2008, Chou. AH. et al.: Brain Res. 2014, Doi et al., Kidney Int. 2016)に一定の傾向は認められず、臓器連関は明らかではなかった。Evans blue injection による血液脳関門の機能評価も試みたが、個体差を認める結果であった。

研究代表者は、腎臓内科医として臨床業務に従事しながら、脳腎連関シグナルを解明するための基礎研究の一環として、マウスの脳スライスを用いた癲癇モデル下で、持続的異常神経興奮によりアストロサイトに発現するジストログリカンが減少することを生化学的手法にて明らかにし、Journal of Biological Chemistry 誌に報告した(Gondo A et al., J. Biol. Chem. 2014)。ジストログリカンは、特にアストロサイトと血管との接着形成、維持に関与すると推定されており、神経過剰興奮によるジストログリカンの発現低下により脳浮腫および血管障害が生じると推測され、中枢神経系におけるアストロサイトを介した神経細胞と血管内皮細胞との相互作用機構を明らかにした。こうした知見に基づき、アクアポリン 4, GFAP, ジストログリカンについて生化学的解析を行ったが、腎虚血再灌流モデルマウスにおいて Sham との差は明らかではなかった。Claudin5 や HIF-1 発現についても生化学的解析を行い検討したが、

同様に個体差を認め、腎臓と遠隔臓器である大脳とのネットワーク分子は明らかではなかった。

5．主な発表論文等

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。