

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2005～2008

課題番号：17590830

研究課題名（和文）

酸化ストレス産生に伴う腎障害に関与する白血球NAD（P）Hオキシダーゼの役割

研究課題名（英文）

The role of oxidative stress induced by NAD(P)H oxidase of leukocyte on cardiovascular damages in chronic kidney disease.

研究代表者

清元 秀泰（KIYOMOTO HIDEYASU）

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00304585

研究成果の概要：

慢性腎臓病患者より血液を採取し酸化ストレスの定量と白血球NAD(P)Hオキシダーゼの遺伝子発現を検討した。血液中の酸化ストレスは腎障害の進行に従い増加し、特に末期腎不全である血液透析群で有意な上昇を認めた。白血球からmRNAを抽出し、NAD(P)Hオキシダーゼのp22phox遺伝子発現を調査すると、同様に血液透析腎不全群で酸化ストレスは有意に上昇し、この上昇は透析膜の性能や透析期間とは関連がなかったが、心筋自己抗体の陽性者頻度が上昇した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,500,000	0	1,500,000
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：腎臓内科学・腎不全治療学・人工透析・酸化ストレスと臓器障害

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：NAD(P)Hオキシダーゼ、慢性腎不全、酸化ストレス、白血球、遺伝子発現、透析

1. 研究開始当初の背景

本邦では慢性維持透析によって生命を維持されている患者が年々増加の一途をたどり、特に近年、糖尿病性腎症が血液透析に導入される第一位疾患になり、第三位の高血圧性腎硬化症を加えると50%以上が生活習慣病に起因する腎不全からの透析導入となっている。加えて、慢性維持透析患者は狭心症、心筋梗塞、それによる致死性不整脈等、心血管系合併症等の発症率が健常者に比べて非常に高く、社会復帰の妨げになっている。

このような心血管系合併症等の成因には動脈硬化が深く関わっており、その原因や進展には糖尿病や高血圧、高脂血症などの生活

習慣病の関与や二次性副甲状腺機能亢進症による異所性石灰化の合併、腎不全に伴う尿毒素の蓄積、透析療法そのものの影響などが複雑に関連しながら影響を及ぼしていると推測されている。

最近、動脈硬化の進展因子としてAGEs（advanced glycation end products）や酸化LDL(oxidative low-density lipoprotein)などの代謝異常や活性酸素に基づく酸化ストレスの関与が指摘されている。我々も腎疾患で通院中の症例や透析療法を受けている症例における酸化LDLを測定し、腎不全そのものが酸化ストレスを上昇させていることを見出した。また、透析療法そのものが酸化ス

トレスを発生させる可能性のあることも報告している。

しかしながら、直接組織障害を引き起こす酸化ストレスの根本となるスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)とその主発生源であるNADPH Oxidaseの遺伝子発現に関する臨床研究は未だ行われてはいない。そこで今回、正常健康ボランティア、生活習慣病を有する腎障害前期、保存期腎不全患者、透析患者(血液透析、腹膜透析)など様々な病態における酸化ストレスを、活性酸素の産生源であるNADPH Oxidase ComponentのmRNA発現から評価することで、動脈硬化進展機序の更なる解明を検討することを研究主眼とした。そして更に、動脈硬化の軽減から、心血管系合併症の軽減をめざし、最終的には腎疾患の進展予防や慢性腎不全における最良の透析方法を検討する。

2. 研究の目的

慢性腎臓病の患者さんを腎機能に従い分類し、腎機能正常者、生活習慣病を有する腎障害前期、腎炎・腎症治療中、保存期腎不全患者、透析患者(血液透析、腹膜透析)の各病態における酸化ストレスを、活性酸素の産生源である NADPH Oxidase Component の p22phox の遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価することで、動脈硬化進展機序の解明を検討する。

3. 研究の方法

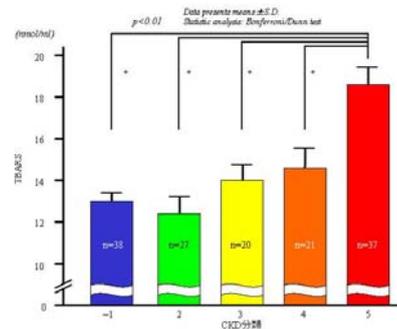
臨床研究の対象者は、香川医科大学医学部附属病院人工透析室、もしくは関連病院透析施設にて維持透析(血液透析、腹膜透析)を受けている患者(血液透析被検者、腹膜透析被検者)、生活習慣病(高血圧、糖尿病、高脂血症、高尿酸血症など)を有しているが腎機能が正常な腎障害前期の患者(生活習慣病通院被検者)、軽度～中等度の腎障害はあるものの腎代替療法を行っていない患者(保存期腎不全被検者)、及び健診等で異常を指摘されていない正常健康ボランティアを対象とする。腎機能ごとに層別化を行い、主任及び分担研究者が本研究について別紙の説明書に基づく十分な説明をした上で、承諾が得られたものを研究対象とする。そして同意書に署名をした上で研究に参加して頂き以下の検査を行う。

測定項目は以下の通りである。

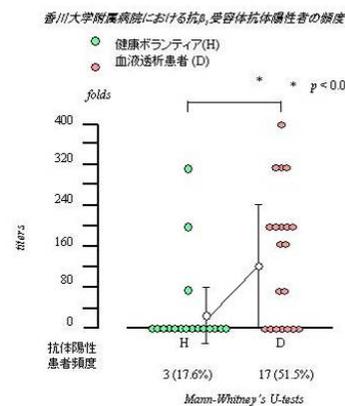
- ・ Na, K, Cl, Ca, IP, BUN, Cr, UA, GOT, GPT, LDH, ALP, CRP, TP, Alb, CBC (RBC, Hb, Plt, WBC 分画, WBC), intact-PTH, BNP, HbA1c, T-Chol, TG, HDL-C, Ox-LDL, および検尿
- ・ 白血球内の NADPH Oxidase Component p22phox の mRNA 発現量。
- ・ 心筋自己抗体

4. 研究成果

本研究における酸化ストレス量を慢性腎不全分類 (CKD) に基づいて比較してみた。



上図に示すようにCKDが進行すると体内酸化ストレス量は上昇し、末期腎不全であるCKD5期においては、どの病期に対しても有意な酸化ストレス量の亢進を認めた。更に、心血管系のダメージを示す心筋抗体(抗 β_1 アドレナリン受容体抗体)は末期腎不全患者で有意に上昇していた。



しかし、NADPH Oxidase Component の p22phox の遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価したが、急性腎不全導入期では酸化ストレスの誘導に大きく寄与しているが、慢性維持腎不全患者での上昇傾向はあるものの、原疾患ごとのバリエーションが強く、明らかな治療ターゲットとして用いることは現時点では困難であることがわかった。ただ、LDL コレステロール吸着療法などの抗酸化療法は血管病変を改善させる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Kaifu K, Kiyomoto H, Hitomi H, Matsubara K, Hara T, Moriwaki K, Ihara G, Fujita Y, Sugasawa S, Nagata D, Nishiyama A, Kohno M. Insulin attenuates apoptosis induced by high glucose via the PI₃-kinase/Akt pathway

- in rat peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 24(3):809-815, 2009 査読あり
- ② Kiyomoto H, Nishiyama A: Do vasculature reactive oxygen species play a role in the mobilization of bone marrow endothelial progenitor cells? *J Hypertens* 26:188-190, 2008. 査読あり
- ③ 松原啓介、清元秀泰: CKDマネイジメント 造影剤による腎障害. *Modern Physician* 28: 1229-1233, 2008 査読なし
- ④ 西山 成、清元秀泰: ARBとCCBによる尿細管間質障害治療. *医学のあゆみ* 225(4): 321-325, 2008 査読なし
- ⑤ 泌尿器/腎 慢性腎臓病. 清元秀泰, 森脇久美子: 治療 90: 94-95, 2008 査読なし
- ⑥ 腎障害を有する高血圧の治療. 清元秀泰: *日本内科学会雑誌* 96(1): 65-72, 2007 査読なし
- ⑦ Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A: Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol.* 22(4):311-315, 2007. 査読あり
- ⑧ 河野雅和、秋山賢次、伊原玄英、鬼無 信、清元秀泰、小路哲生、高橋則尋、濱本龍七郎、藤岡宏、村尾孝児: 慢性腎臓病(CKD)の治療および予防における戦略. *Progress in Medicine* 27(6): 1355-1364, 2007 査読なし
- ⑨ Kiyomoto H, Hitomi H: The earlier, the better. *Hypertens Res* 30: 1-2, 2007 査読あり
- ⑩ Moriwaki K, Kiyomoto H, Hitomi H, Ihara G, Kaifu K, Matsubara K, Hara T, Kondo N, Ohmori K, Nishiyama A, Fukui T, Kohno M: Interferon- γ enhances superoxide production in human mesangial cells via the JAK-STAT pathway. *Kidney Int.* 70(4):788-93, 2006. 査読あり
- ⑪ Hitomi H, Fukui T, Moriwaki K, Matsubara K, Sun GP, Rahman M, Nishiyama A, Kiyomoto H, Kimura S, Ohmori K, Abe Y, Kohno M: Synergistic effect of mechanical stretch and angiotensin II on superoxide production via NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 24:1089-95, 2006. 査読あり
- ⑫ 海部久美子、清元秀泰: 腎不全の診断と治療～急性腎不全の鑑別と治療方針～. *医薬ジャーナル* 41(2): 773-778, 2006 査読なし
- ⑬ 人見浩史、清元秀泰、河野雅和、西山 成: アルドステロン依存性腎障害における酸化ストレス、MAPキナーゼ、Rhoキナーゼの役割. *内分泌・糖尿病科* 23(6):575-580, 2006 査読なし
- ⑭ 腎不全の診断と治療(2)～慢性腎不全の治療～. 原大雅、清元秀泰: *医薬ジャーナル* 41(3): 1056-1061, 2006 査読なし
- ⑮ 腎不全合併難治性腹水患者に対する腹水濾過還元血液透析療法(AFRHD)の有用性. 清元秀泰、東山智香子: *日本アフェレンス学会雑誌* 25(2): 125-131, 2006 査読あり
- ⑯ 西山 成、今西政仁、清元秀泰、河野雅和、安部陽一: 腎障害進展におけるアルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体と酸化ストレスの役割. *臨床薬理の進歩* 27: 139-144, 2006 査読なし
- ⑰ Hara T, Kiyomoto T, Moriwaki K, Higashiyama, Matsubara K, Hitomi H, Kondo N, Kaifu K, Ihara K, Ohmori K, Kohno M. Effective LDL apheresis in a case of peripheral circulatory insufficiency in the forearm from repeated internal arteriovenous fistula surgeries. *日本アフェレンス学会雑誌* 25(1): 52-56, 2005 査読あり
- ⑱ Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang GX, Sun GP, Kimura S, Yukimura T, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Nishiyama A: Aldosterone Stimulates Reactive Oxygen Species Production through Activation of NADPH Oxidase in Rat Mesangial Cells. *J Am Soc Nephrol* 16(10): 2906-2912, 2005. 査読あり
- ⑲ Hara T, Takahashi N, Kiyomoto H, Moriwaki K, Fujioka H, Matsubara K, Kondo N, Shokoji T, Kiyomoto K, Hirohata M, Ishizu T, Akiyama K, Nishiyama A, Ohmori K, Kohno M: Reduction of oxidized low-density lipoprotein by the long-term use of vitamin E-coated dialyzers in hemodialysis patients. *Dialysis & Transplantation* 33(4); p197-202, 2005 査読あり
- ⑳ 東山智香子、清元秀泰、西山 成、今西政仁、河野雅和: 腎不全および維持血液透析における酸化ストレスの評価とその対策に関する研究. *腎臓* 27(2), 105-109, 2005 査読なし

[学会発表] (計 13 件)

- ① 馬場彰泰、池田亜希子、清元秀泰、緒方浩顕: 人工透析患者における抗 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体IgGサブクラス. 第29回日本アフェレンス学会学術大会. 2008年10月16日、広島

- ② 西山 成、清元秀泰、小堀浩幸、河野雅和：酸化ストレスの評価方法と腎障害への応用 酸化ストレスと腎障害. 第50回日本腎臓学会学術総会、2007年6月8日、浜松
- ③ 森脇久美子、清元秀泰、藤田昌子、伊原玄英、海部久美子、原 大雅、人見浩史、祖父江理、鶴川豊世武、河野雅和：高糖濃度が腹膜中皮細胞のNADPH oxidaseに及ぼす影響. 第52回日本透析医学会学術集会・総会、2007年6月21日、大阪
- ④ 原 大雅、清元秀泰、森脇久美子、西山成、近藤直樹、鶴川豊世武、人見浩史、松原啓介、伊原玄英、海部久美子、森 諭史、東山智香子、岩崎憲泰、海部泰夫、岡本雅也、河野雅和：腎不全合併末梢循環不全におけるLDLアフェレシス療法の有効性と白血球NADPH oxidaseの関与. 第27回日本アフェレシス学会学術大会. 2007年3月15日、横浜
- ⑤ Kiyomoto H: Immunoabsorption as a new treatment against autoimmune heart failure Double filtration plasmapheresis (DFPP) in cardiac dysfunction patients with advanced chronic renal disease (CKD). 6th World Congress of the International Society for Apheresis, World Apheresis Association 11th Congress, 2007 Mar 14, Yokohama, Japan
- ⑥ 森脇久美子、清元秀泰、藤田昌子、伊原玄英、海部久美子、近藤直樹、原 大雅、人見浩史、鶴川豊世武、河野雅和：腹膜中皮細胞における糖負荷による酸化ストレスとNADPH oxidaseの検討. 第51回日本透析医学会学術集会. 2006年6月7日、横浜
- ⑦ 森脇久美子、清元秀泰、人見浩史、西山成、河野雅和：IFN- γ によるヒトメサンギウム細胞のスーパーオキシド産生系の検討. 第6回日本NO学会学術集会. 2006年9月16日、東京
- ⑧ 原 大雅、清元秀泰、森脇久美子、西山成、近藤直樹、鶴川豊世武、人見浩史、松原啓介、伊原玄英、海部久美子、森 諭史、東山智香子、岩崎憲泰、海部泰夫、岡本雅也、河野雅和：末梢循環不全合併透析患者に対するLDLアフェレシス療法の有用性—LDLアフェレシス療法による酸化ストレス軽減について—. 第26回日本アフェレシス学会学術大会. 2006年9月26日、大津
- ⑨ 原 大雅、清元秀泰、森脇久美子、東山智香子、松本恵子、横山るみ子、佐藤弘子、岩崎泰憲、海部泰夫、宮野恭匡、近藤直樹、鶴川豊世武、松向寺孝臣、人見

浩史、西山 成、河野雅和：末梢循環不全合併透析患者に対するLDLアフェレシス療法の有用性. 第50回日本透析医学会学術集会. 2005年6月7日、神奈川

- ⑩ 原 大雅、清元秀泰、森脇久美子、近藤直樹、鶴川豊世武、人見浩史、松原啓介、伊原玄英、海部久美子、藤田昌子、西山成、森 諭史、濱本有祐、佐野法久、東山智香子、松本恵子、森田順子、佐藤弘子、岩崎憲泰、小野茂男、海部泰夫、松本正義、嘉村智美、宮野恭匡：末梢循環不全合併透析患者に対するLDLアフェレシス療法の有用性—LDLアフェレシス療法による酸化ストレス軽減について—. 第25回日本アフェレシス学会学術大会. 2005年10月20日、奈良
- ⑪ 清元秀泰、森脇久美子、原大雅、伊原玄英、近藤直樹、松向寺孝臣、鶴川豊世武、松原啓介、人見浩史、西山 成、河野雅和：血液透析療法における酸化ストレスと白血球NAD(P)H oxidase p22phox遺伝子発現に関する検討. 第48回日本腎臓学会総会、2005年6月4日、神奈川
- ⑫ 清元秀泰、森脇久美子、藤田昌子、マツトブルーブル・ラフマン、原 大雅、近藤直樹、松向寺孝臣、鶴川豊世武、松原啓介、西山 成、河野雅和：血液透析療法における酸化ストレスの産生と白血球NAD(P)H oxidaseコンポーネントp22phox遺伝子発現に関する検討. 第5回腎不全病態治療研究会. 2005年3月26日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清元 秀泰 (KIYOMOTO HIDEYASU)
香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00304585

(2) 研究分担者

西山 成 (NISHIYAMA AKIRA)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10325334

[2005～2007年度]

原 大雅 (HARA TAIGA)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：50398038