

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590969  
 研究課題名（和文） 心血管病危険因子としての慢性腎臓病の基盤病態の統合的理解と治療法開発  
 研究課題名（英文） Chronic kidney disease (CKD) as a risk factor for cardiovascular diseases: investigation on pathogenesis and development of therapeutic strategy  
 研究代表者 柏原 直樹  
 川崎医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：10233701

## 研究成果の概要：

本邦で慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease:CKD）が増加している。その主因は糖尿病、肥満、メタボリックシンドローム等の生活習慣病の増加と高齢化である。CKD は腎不全をもたらすだけでなく、心血管病（CVD）の強い危険因子でもある。本研究では、まず CKD の発症・進展機構の詳細を解明した。特になぜアルブミン尿が出現し CVD を合併するのか、その機構を明らかにした。本研究で得られた CKD の基盤病態の理解は、本症の予防と治療法立案に貢献するものである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

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：慢性腎臓病（CKD）、生活習慣病、心血管病、メタボリックシンドローム、肥満、レニン・アンジオテンシン系、高血圧、血管内皮障害

## 1. 研究開始当初の背景

先進諸国において慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease:CKD）が増加しつつある。CKD 発生の危険因子は糖尿病や高血圧のみならず、肥満やメタボリックシンドローム (MetS)、加齢であることが示されている。生活習慣変化と高齢化が CKD 増加の主因と考えられる。CKD 増加により血液透析を要する末期腎不全患者数が増加の一途を辿っており、国民健康上の大きな脅威となっている。さらに CKD は末期腎不全の前病態だけでなく、心血管疾患

(Cardiovascular Disease: CVD) の強い危険因子でもある。中でも微量アルブミン尿が CVD 発症の独立危険因子として認識されている。微量アルブミン尿は、一般住民でも CVD、心血管死、全死亡と関連している。微量アルブミン尿は全身の血管内皮機能異常の一環としての糸球体内皮細胞障害に起因し、故に CVD 発症に関連すると想定されているが直接的証明はない。生活習慣変化に起因する腎障害の共通基本病態を解明し、同時に CVD 発症機構を明らかにすることが急務であった。

## 2. 研究の目的

生活習慣変化と加齢に起因する多彩な要因が、なぜ腎障害を惹起し、心血管病の危険因子となりうるのか、その共通基盤病態を解明することにある。以下の課題に取り組んだ。

(1) 腎内微小血流動態と微量アルブミン尿出現機構を解析するための基盤技術の確立。生体腎において糸球体・間質血流、糸球体濾過、血管透過性変化をリアルタイムで動的に解析する技術を開発する。

(2) 微量アルブミン尿出現のメカニズムの解明：糸球体内皮障害との関連を解明する。

(3) 疾患腎における腎肥大、糸球体肥大と腎内微小循環動態との均衡変化の解析

(4) 障害腎における老化形質出現の解析。細胞老化の成因とされるミトコンドリア機能異常、ミトコンドリア酸化ストレスとの関与を明らかにする。

(5) 腎・糸球体肥大／血流不均衡の改善による新規腎疾患治療法の開発

(6) 尿毒素 (uremic toxin) が血管内皮機能に与える影響の解析および toxin 吸着療法の内皮機能改善作用の検証

## 3. 研究の方法

(1) 2光子励起方式レーザー走査型顕微鏡 (two-photon laser scanning fluorescence microscope) を用いて生体腎における微小血管構築変化、血流、濾過を可視化技術の確立を試みた。2光子レーザー顕微鏡は励起波長が短く光毒性が低いため、生体臓器の深部まで低侵襲性に長時間観察可能である。時間・空間分解能が高く、蛍光標識した小分子の生体内挙動が3次元的に動画で記録可能である。小動物生体腎で糸球体・間質血流及び、糸球体での濾過状態を可視化検出する技術の確立を目指した。

(2) 疾患モデルにおける単一ネフロンレベルの透過性変化、アルブミン尿出現機構を解析した。上記で確立した方法を用いて *in vivo* での解析を行った。

(3) 心血管病の基盤となる全身の内皮機能異常と糸球体透過性変化との関連を解析した。また共焦点レーザー顕微鏡と蛍光指示薬を用いて血管における酸化ストレスと一酸化窒素 (NO) を同時に検出する技術を開発し、これを用いて、同一組織で両者を同時に検出し解析した。

(4) 内皮機能異常のメカニズム特に NOS 機能異常 (uncoupling) の分子機構を解析した。

(5) 疾患腎における微小血流変化と組織虚血の出現を解析した。各種腎障害モデルでの糸球体・間質血流動態を2光子レーザー顕微鏡を用いて解析し、共通する血行動態変化を見いだす。

(6) 疾患腎における老化形質 premature

senescence 出現を解析した。

(7) 各種薬剤、食事介入 (蛋白制限) による血管内皮機能改善作用、アルブミン尿減少作用の作用機序を解析した。レニン・アンジオテニン系阻害薬、PPAR- $\gamma$  アゴニスト、スタチンを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 2光子レーザー顕微鏡を用いて生体腎における微小血流、濾過状態をリアルタイムで動画として可視化し解析する技術を、我国で初めて確立することに成功した。アルブミン尿を生体動物で直接可視化検出した。これにより従来の方法論では解析不可能であった *in vivo* での腎内微小血行動態、血管透過性変化の解析が初めて可能となった。

(2) 血管組織において活性酸素種 (ROS) と一酸化窒素 (NO) 分子を同時に可視化検出する技術を開発した。酸化ストレスと内皮機能・機能変化を同一組織において同時に解析することが可能となった。

(3) 高血圧・糖尿病・メタボリックシンドロームモデル動物で、腎血管系・糸球体に酸化ストレス亢進と内皮機能障害 (ROS/NO 不均衡) が生じていることを見いだした。酸化ストレスの亢進には組織 NADPH oxidase 活性化が関与していることを明らかにした。さらにその上流で組織レニン-アンジオテニン系の活性化が重要な役割を果たしていることも解明した。

(4) 疾患動物において、糸球体の内皮機能障害・内皮細胞障害 (Glycocalyx 減少) と糸球体高血圧 (過剰濾過) が共存することでアルブミン尿が出現することを明らかにした。またアルブミン尿出現時点において大動脈レベルの内皮依存性血管拡張反応が障害されていることを見いだした。アルブミン尿と心血管イベントの共通関連機序を解明することができた。

(5) 疾患糸球体では補酵素 BH4 減少 (酸化ストレスにより酸化され減少する) により NOS 機能異常 (uncoupling) が生じていることを見いだした。Uncoupled NOS から NO ではなく ROS がより多く産生され、ROS/NO 不均衡の原因であることを解明した。BH4 補給により eNOS uncoupling が改善することも示し得た。

(6) 疾患腎の尿細管上皮細胞において老化形質 premature Senescence が出現しており、酸化ストレスが関与していることを見いだした。また細胞老化と関係の深いミトコンドリアの形態変化、ミトコンドリア DNA の酸化的障害の蓄積、呼吸鎖機能異常が生じていることを見いだした。

(7) レニン・アンジオテニン系阻害薬、PPAR- $\gamma$  アゴニストは腎内血管系・糸球体における内皮機能障害・eNOS uncoupling を改

善し、同時に大動脈レベルの内皮依存性血管拡張反応を改善することを明にした。

#### 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)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Namikoshi T, Tomita N, Satoh M, Sakuta T, Kuwabara A, Kobayashi S, Higuchi Y, Nishijima F, Kashihara N: Oral adsorbent AST-120 ameliorates endothelial dysfunction independent of renal function in rats with subtotal nephrectomy. *Hypertens Res* 32:194-200, 2009, 査読有
- ② Mochizuki S, Takayama A, Sasaki T, Horike H, Kashihara N, Ogasawara Y, Kajiya F, Kitawaki T, Oka H. Direct measurement of nitric oxide concentration in CAPDdialysate. *Perit Dial Int.* 29:111-114, 2009, 査読有
- ③ Xie P, Sun L, Nayak B, Haruna Y, Liu FY, Kashihara N, Kanwar YS. C/EBP-beta modulates transcription of tubuleinterstitial nephritis antigen in obstructive uropathy. *J Am Soc Nephrol.* 20:807-819, 2009, 査読有
- ④ Satoh M, Fujimoto S, Arakawa S, Yada T, Namikoshi T, Haruna Y, Horike H, Sasaki T, Kashihara N: Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates uncoupled endothelial nitric oxide synthase in rats with experimental diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 23: 3806-13, 2008, 査読有
- ⑤ Fujimoto S, Satoh M, Horike H, Hatta H, Haruna Y, Kobayashi S, Namikoshi T, Arakawa S, Tomita N, Kashihara N: Olmesartan ameliorates progressive glomerular injury in subtotal nephrectomized rats through suppression of superoxide production. *Hypertens Res.* 31:305-313, 2008, 査読有
- ⑥ Sun L, Xie P, Wada J, Kashihara N, Liu FY, Zhao Y, Kumar D, Chugh SS, DaneshFR, Kanwar YS. Rap1b GTPase ameliorates glucose-induced mitochondrial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 19:2293-2301. 2008
- ⑦ Namikoshi T, TomitaN, Satoh

- M, Haruna Y, Kobayashi S, Komai N, Sasaki T, Kashihara N  
Pioglitazone enhances the antihypertensive and renoprotective effects of candesartan in Zucker obese rats fed a high-protein diet. *Hypertens Res.* 31:745-755, 2008, 査読有
- ⑧ kobayashi S, Satoh M, Namikoshi T, Haruna Y, Fujimoto S, Arakawa S, Komai N, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Blockade of serotonin 2A receptor improves glomerular endothelial function in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol. Clin Exp Nephrol.* 12:119-125, 2008, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Namikoshi T, Tomita N, Satoh M, Kuwabara A, Nagasu H, Yorimitsu D, Komai N, Kashihara N. Uremic Toxins and High Dietary Protein Intake Induce Endothelial Dysfunction in Rats with Chronic Kidney Disease. 第73回日本循環器学会総会・学術集会、2009年3月20日、大阪
- ② Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, Yorimitsu D, Namikoshi T, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. Azelnidipin Prevent Renal Dysfunction in Dahl Salt-Sensitive Rats by Suppression of Sympathetic Nerve system. 第73回日本循環器学会総会・学術集会、2009年3月20日、大阪
- ③ Satoh M, Kashihara N. Chronic Kidney disease as a cardiovascular risk factor-Analysis by visualization of the in vivo renal microcirculation. 第34回日本微小循環学会年次総会 2008年9月21日、東京
- ④ Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Yada T, Kuwabara A, Nagasu H, Yorimitsu D, Namikoshi T, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N: Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Ameliorates Uncoupled Endothelial Nitric Oxide Synthase in Rats with Streptozotocine Induced Diabetic Nephropathy. American Society of Nephrology 41st Annual Meeting & Scientific Exposition. November 6, 2008, Philadelphia, Pennsylvania
- ⑤ Namikoshi T, Tomita N, Satoh M, Sakuta

T, Kuwabara A, Nagasu H, Yorimitsu D, Higuchi Y, Nishijima F, Kashihara N. Oral adsorbent AST-120 ameliorates endothelial dysfunction and alleviates oxidative stress in aorta independent of renal function in subtotaly nephrectomized rats. American Society of Nephrology 41st Annual Meeting & Scientific Exposition. November 6, 2008, Philadelphia, Pennsylvania

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏原 直樹 (KASHIHARA NAOKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233701

### (2) 研究分担者

駒井 則夫 (KOMAINORIO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40368626

佐藤 稔 (SATO MINORU)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70449891