

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659164

研究課題名（和文）アミン - カルボニル反応性の新たな腎臓病のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Role of amine-carbonyl reaction as a novel mechanism for renal disease

研究代表者

伊藤 貞嘉 (ITO SADAYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40271613

研究成果の概要（和文）：

本研究では、アミン（メラミン、尿酸）とカルボニル物質の反応による新たな腎障害メカニズムの可能性について検討した。ラットにメチルグリオキサール（MGO）とメラミンもしくはオキソニン酸を投与し体内にアミンを増やすと腎障害を呈し、カルボニル抑制剤のピリドキサミンの投与により改善した。以上の結果からアミンとカルボニルの化学反応は腎臓病の病態に関与している可能性が示唆され、新たな治療メカニズムになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The study was designed to evaluate whether reaction between amine and carbonyl compound is a novel mechanism for renal injury. Renal injury was observed by co-administration of MGO and melamine or oxonic acid. This reaction was also inhibited by pyridoxamine treatment. These results indicate that amine-carbonyl reaction could be a novel therapeutic mechanism which could be targeted for renal injuries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：腎臓内科学

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：アミン、カルボニル、慢性腎臓病、急性腎障害

## 1. 研究開始当初の背景

メチルグリオキサール (MGO) を代表とするカルボニル物質は糖尿病性腎症を含む糖尿病合併症の一因になっていることが示されている。しかしながら我々は糖尿病の有無に関わらず慢性腎臓病のステージの上昇とともに血漿 MGO 濃度が上昇することを報告した (Am J Nephrol 28:871, 2008)。またこの MGO はラットに経口投与すると慢性腎臓病の病態にしばしばみられる食塩感受性高血圧とインスリン抵抗性を呈することが明らかになった (J Hyper 27:1664, 2009)。さらに慢性腎臓病のモデルである Dahl 食塩感受性高血圧ラットに MGO を経口投与すると心腎障害が進行することが明らかになり (Hypertension 投稿中)、非糖尿病モデルである Thy-1 腎炎でもカルボニル物質は増え、カルボニル物質の消去薬ピリドキサミンが腎障害を抑制することが観察された。このようにカルボニル物質は糖尿病だけでなく慢性腎臓病の心腎障害に関与することが示された。

一級アミンであるメラミンが食品やペットフードに混入し、これらを食べたヒトや動物に腎不全を呈する事件がしばしば発生した。この腎不全の原因に結石の可能性があると考えられているが、詳細は不明である。動物実験においてはメラミンを単独で投与しても腎不全は起きず、メラミンをカルボニル化合物であるシアヌル酸とともにラットに投与すると結石ができることが報告されている (Toxicol Sci 106:251, 2008)。

## 2. 研究の目的

メラミンのような一級アミンはカルボニル物質と反応を起こすことが知られており、それを利用したのがメラミン樹脂である。したがって我々は腎不全の原因としてこのようなアミン-カルボニル反応に着目し、腎不全などの病態で増加する「カルボニル物質が尿酸などの生体内にあるアミンなどと反応し、慢性腎臓病や急性腎障害に関与する」という仮説を立てた。

この仮説を検証するために本研究では具体的に以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) メラミンやシアヌル酸などの外因性のもの以外に生体内で産生されるアミンやカルボニル物質によって腎障害を呈するか。既知の腎障害にどのように関与しているか。とくに腎不全の病態で増加するアミン (尿酸) とカルボニル物質 (MGO) に着目する。

(2) アミン-カルボニル反応はどのようなメカニズムで腎障害を呈するか。

(3) アミン-カルボニル反応性腎障害をどのように防ぐことができるか。その治療法の

開発。

本研究は今まで我々が行ってきた、カルボニル物質研究の延長であるが、アミン-カルボニル反応という世界に類をみないまったく新しい腎障害メカニズムを解明することを目標とした。この本研究の遂行によりアミン-カルボニル反応性腎障害メカニズムが明らかになると、多くの慢性腎臓病や急性腎障害に新たな治療戦略を立てられ、多くの末期腎不全を減らし国民の健康と医療経済を救える可能性があると考えられた。

## 3. 研究の方法

### 実験 1: 外因性アミン (メラミン) と MGO 化学反応による腎障害

7 週齢 Sprague-Dawley (SD) ラットをコントロール (Con) 群、1% MGO 経口飲水投与 (MGO) 群、メラミン (400mg/kg/day) 投与 (Me1) 群、MGO+Me1 併用投与群、MGO+Me1+ピリドキサミン (B6, 600mg/kg/day) 投与の 5 群に分け、それぞれ 5 日間観察した。全ての実験期間中にラットを代謝ケージで飼育し、24 時間毎の尿量及び尿中アルブミン排泄量を測定した。実験終了後にペントバルビタールの腹腔内投与麻酔下で腎臓を灌流し摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後パラフィン包埋した。次いで 2µm 厚の切片を作製し、periodic acid-Schiff (PAS) 染色と間質平滑筋型 α-アクチン (α-SMA) の免疫染色を行った。PAS 染色により糸球体硬化指数 (index of glomerular sclerosis: IGS) を評価した。

### 実験 2: 内因性アミン (尿酸) と MGO 化学反応による腎障害

7 週齢 SD ラットをコントロール (Con) 群、1% MGO 経口飲水投与 (MGO) 群、尿酸酸化酵素阻害薬であるオキシニン酸 (OA, 750mg/kg/day) 投与 (OA) 群、MGO+OA 併用投与群、MGO+OA+B6 (600mg/kg/day) 投与の 5 群に分け、6 週間観察した。実験期間中 2 週間毎に 1 回ラットを代謝ケージで飼育し、24 時間毎の尿量及び尿中アルブミン排泄量を測定した。

### 実験 3: 内因性 MGO 増加物質 (フルクトース) による腎障害とインスリン抵抗性

6 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットをコントロール飼料投与群 (C) (12 匹) と 60% 高フルクトース投与群 (40 匹) に分け、4 週間後に高フルクトース投与群をさらに高フルクトース投与群 (F)、hydrochlorothiazide (HCTZ, 80mg/kg/day) 投与群 (H)、losartan 投与群 (L)、HCTZ と losartan 併用群 (HL) の 4 群 (各 10 匹) に分け、4 週間薬物投与した。摂取量の影響を避けるため、全ての実験期間中に各群間の飼料摂取量を一致させた。6 週齢から 14 週齢間の収縮期血圧 (SBP) 測定と代謝ケ

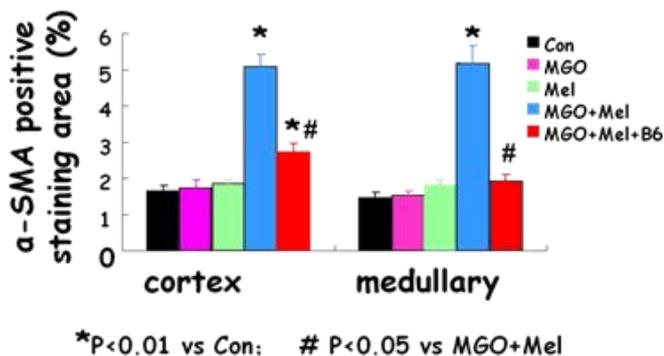
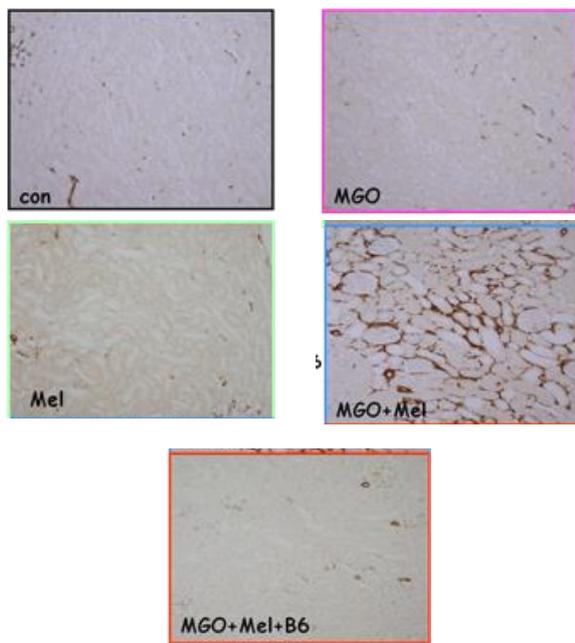
ージによる尿採取を週一回行った。実験終了時にインスリン感受性をグルコースクランプ法のM値により算出した。免疫染色により長趾伸筋の血管密度を検証した。

#### 4. 研究成果

##### 実験1:外因性アミン(メラミン)とMGO化学反応による腎障害

血圧及びIGSはいずれの群でも有意な差はみられなかった。MGOおよびMEL群は、Con群に比べ有意な尿中アルブミン排泄増加はみられなかったが、MGO+Mel群で増加した。一方、腎皮質及び髄質の腎臓間質線維化指標である $\alpha$ -SMA発現面積は、Con、MGOとMel3群の間で有意差は見られなかったが、この3群に比べMGO+MEL群では有意に増大した。MGO+MEL群に比較して、B6群の腎皮質及び髄質の $\alpha$ -SMA発現面積はともに有意に減少した(図1)。

図1:MGOとメラミン投与による腎線維化( $\alpha$ -SMAによる検討)



##### 実験2:内因性アミン(尿酸)とMGO化学反応による腎障害

オキシニン酸の投与により血漿尿酸値はOA、OA+MGO、OA+MGO+B6群で有意に増加した(図2)。オキシニン酸及びMGO単独投与群の24時間尿中アルブミン排泄量は、それぞれ有意な上昇が見られなかったが、併用する場合は単独投与に比べて有意に上昇した。この24時間尿中アルブミン排泄量の上昇はB6により抑制された(図3)。酸化ストレスのマーカーである24時間尿中過酸化水素排泄量( $H_2O_2$ )はCon群に比べMG群およびOA群では有意な変化が認められなかったが、MG+OA群では有意な増加が認められた(図4)。一方、B6群では $H_2O_2$ に有意な減少が認められた。

図2:オキシニン酸投与による血漿尿酸値の上昇。

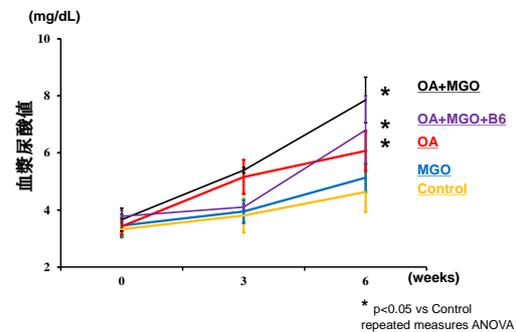


図3:オキシニン酸とMGO投与による尿中アルブミン排泄の増加

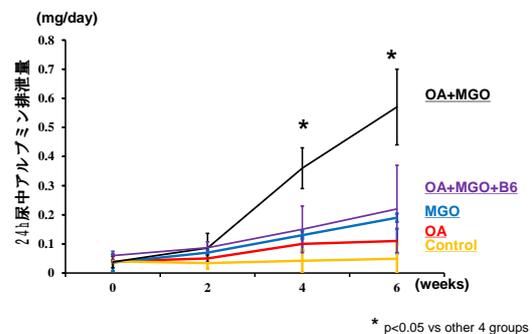
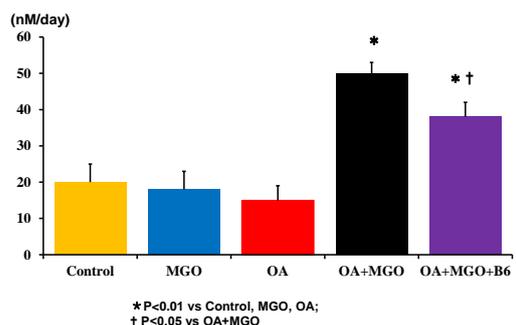


図4:オキシニン酸とMGO投与による酸化ストレスの増加



### 実験3：内因性MGO増加物質（フルクトース）による腎障害とインスリン抵抗性

14週齢時に、体重は5群で有意差がなかった。C群に比べF群で有意に昇圧したがH、L、HL群では有意な降圧がみられた（図5）。腎機能の指標である尿中微量アルブミン/クレアチニン比（Ualb/Cre）はC群に比べF群では有意に多く、F群に比べH群ではさらに増加していた。L群とHL群のUalb/CreはF群のそれに比べC群に匹敵するほどに減少した（図6）。M値はC群に比べF群で有意に低く、インスリン感受性の増加が示唆されたが、H群のM値はF群のそれに比べさらに低値であった。L群とHL群のM値は有意な改善が認められ、C群のそれに匹敵した（図7）。その結果、長趾伸筋の血管密度とインスリン抵抗性に有意な相関がみられ、フルクトースによるインスリン抵抗性の一機序になると考えられた。

図5：フルクトース投与による血圧上昇

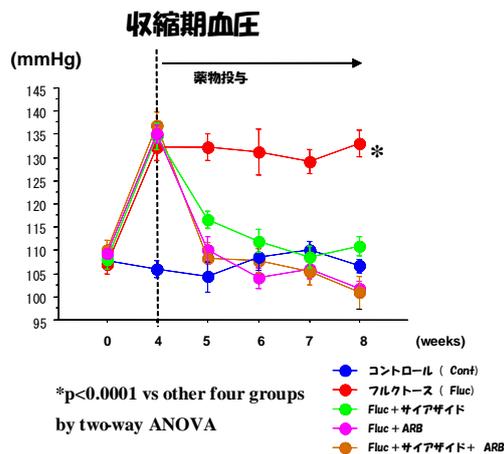


図6：フルクトース投与による尿中アルブミン排泄量の増加

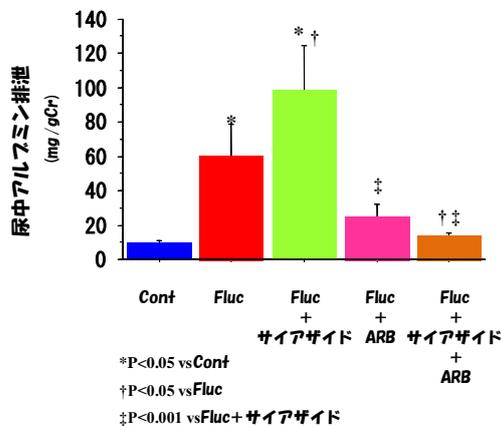
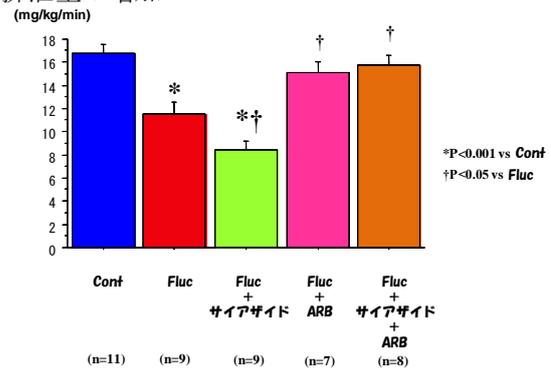


図7：フルクトース投与による尿中アルブミン排泄量の増加



### 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 15 件)

- Masaaki Nakayama, Sadayoshi Ito (11番目)、他9名  
Uric Acid and Patients Outcomes in a Cohort of Chronic Kidney Disease and Hypertension; The Gonryo Study Nephrol Dial Transplant、査読有、In Press (2012)
- Qi Guo, Takefumi Mori (2番目)、Sadayoshi Ito (10番目)、他7名  
Losartan modulates muscular capillary density and reverses thiazide diuretic-exacerbated insulin resistance in fructose-fed rats. Hypertens Res、査読有、35巻、2012、48-54
- Hiroyuki Terawaki, Sadayoshi Ito (11番目)、他10名  
Peritoneal clearance and transport of methylglyoxal. Nephrol Dial Transplant、査読有、26巻、2011、753-764
- Hermann Haller, Sadayoshi Ito (2番目)、他10名  
ROADMAP Trial Investigators: Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE、査読有、364巻、2011、907-917
- 森建文 (筆頭)、伊藤貞嘉 (4番目)、他2名  
AKI発症と酸化/カルボニルストレス Modern Physician、査読無、30(1)、2011、30-33
- 伊藤貞嘉  
腎障害と尿酸

- 血圧、査読無、18(7)、2011、622-626
7. 伊藤貞嘉  
腎血流、今月の特集・理解のためのチェックリスト  
月刊循環器Circulation、査読無、2(2)、2011、40-49
  8. Wan-Jun Zhu、Takefumi Mori (3番目)、Sadayoshi Ito (9番目)、他6名  
Intake of water with high levels of dissolved hydrogen (H<sub>2</sub>) suppresses ischemia-induced cardio-renal injury in Dahl salt-sensitive rats  
Nephrol Dial Transplant、査読有、26巻、2011、2112-2118
  9. Susumu Ogawa、Takefumi Mori (4番目)、Sadayoshi Ito (10番目)、他7名  
Methylglyoxal Is a Predictor in Type 2 Diabetic Patients of Intima-Media Thickening and Elevation of Blood Pressure.  
Hypertension、査読有、56(3)、2010、471-476
  10. Noriko Miyazawa、Sadayoshi Ito (7番目)、他5名  
Methylglyoxal augments intracellular oxidative stress in human aortic endothelial cells.  
Free Radic Res、査読有、44(1)、2010、101-107
  11. Masaaki Nakayama、Sadayoshi Ito (17番目)、他15名  
Different clinical outcomes for cardiovascular events and mortality in chronic kidney disease according to underlying renal disease: the Gonryo study.  
Clin Exp Nephrol Hypertension、査読有、14(4)、2010、333-339
  12. Michiaki Abe、Sadayoshi Ito (20番目)、他20名  
The HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin stimulates insulin secretion through organic anion transporter polypeptides.  
Drug Metab Pharmacokinet、査読有、25(3)、2010、274-282
  13. Susumu Ogawa、Takefumi Mori (6番目)、Sadayoshi Ito (7番目)、他4名  
Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases systolic blood pressure in Japanese hypertensive patients with type 2 diabetes.  
the Tohoku Journal of Experimental Medicine、査読有、223(2)、2010、133-135
  14. Susumu Ogawa、Takefumi Mori (5番目)、Sadayoshi Ito (6番目)、他3名  
Aliskiren reduces albuminuria and oxidative stress, and elevates glomerular filtration rates in Japanese patients with advanced diabetic nephropathy.  
Hypertens Res、査読有、34(3)、2010、400-401
  15. Takafumi Toyohara、Sadayoshi Ito (13番目)、他13名  
Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients.  
Hypertens Res、査読有、33(9)、2010、944-952
- [学会発表] (計14件)
1. 大場 郁子、他  
メチルグリオキサールによる腹膜線維化と機能低下に対するGLO-1の役割  
第41回日本心臓血管作動物質学会、2012年2月11日、秋田
  2. 芦 毅、他  
グルコースによる尿細管上皮細胞のミトコンドリア内酸化ストレス亢進機序  
第41回日本心臓血管作動物質学会、2012年2月10日、秋田
  3. 森 建文  
高血圧・代謝疾患領域での臨床応用  
第21回日本メイラード学会年会(招待講演)  
2011年10月28日、東京
  4. 伊藤 貞嘉  
心腎連関と尿酸  
第34回日本高血圧学会(招待講演)、2011年10月22日、宇都宮
  5. 芦 毅、他  
リアルタイムイメージングによる腎尿細管上皮細胞のブドウ糖誘導性ミトコンドリア内酸化ストレスの検討  
第34回日本高血圧学会総会、2011年10月21日、栃木
  6. 佐藤恵美子、他  
若年肥満者における尿中カルボニル物質による血圧上昇の予測  
第34回日本高血圧学会総会、2011年10月21日、栃木
  7. 伊藤 貞嘉  
糖尿病腎症におけるRAS抑制の有効性と限界  
第41回日本腎臓学会東部学術大会(招待講演)、2011年10月15日、東京
  8. 森 建文、他  
若年高血圧における尿中酸化/カルボニルストレスおよび炎症マーカーの確立  
第11回日本抗加齢医学会総会、2011年5月27日、京都
  9. 森 建文

慢性腎臓病の心腎血管障害に対するカルボニルストレスの役割  
第40回日本腎臓学会東部学術大会、2010年9月24日、栃木

10. Takefumi Mori

Drug discovery and development from the academia targeting carbonyl stress in renal disease.

International Forum on Advances in Diabetes Complications、2010年7月18日、Taipei, Taiwan

11. 郭 琪、他

高尿酸血症に伴った腎障害に対するカルボニルストレスの役割

第53回日本腎臓学会、2010年6月17日、神戸

12. 郭 琪、他

5/6 腎摘除慢性腎不全モデルラットにおける運動と olmesartan の腎保護作用に対するカルボニルストレスの役割

第53回日本腎臓学会、2010年6月17日、神戸

13. Takashi Nakamichi、他

Pyridoxamine ameliorates glomerular injury in rat experimental chronic glomerulonephritis.

The 12<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology、2010年6月7日、Seoul, Korea

14. Qi Guo、他

The protective effects of pyridoxamine on methylglyoxal- and melamine-induced renal injury.

The 12<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology、2010年6月5日、Seoul, Korea

[図書] (計1件)

1. 小川晋、他

森昌朋編集；シュプリンガー・ジャパン  
糖尿病慢性合併症（大血管症）；内分泌・糖尿病内科学

2011、213-216

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 貞嘉 (ITO SADAYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40271613

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：