

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591196

研究課題名(和文)慢性腎臓病の認知能低下におけるカルボニルストレスの病態と治療に関する研究

研究課題名(英文)Pathological involvement of carbonyl stress for development of cognitive impairment in CKD

研究代表者

中山 昌明(Nakayama, Masaaki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60217940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病で増加するメチルグリオキサール(MGO)が認知機能低下例でも増加している事実が指摘されている。本研究では、MGOが直接的に認知機能に影響を与えるかを動物モデルで検討した。ラットを2群に分けて12ヶ月間にわたりMGOを経口投与、コントロール群と認知行動を検討した。MGO群では血中濃度は人の慢性腎臓病を模倣していた。経過中、認知行動能に両者に違いはなく、脳海馬組織に障害は無かった。以上より、腎機能正常例ではMGOの影響は認められない。しかしMGO投与群で抗酸化系が亢進していたことから、慢性腎臓病のような抗酸化系障害例ではMGOの障害が出やすい可能性がある。今後の検討課題と考える。

研究成果の概要(英文)：Recent clinical studies have demonstrated the close associations of cognitive impairment (CI) with plasma methylglyoxal (MG) levels and presence of kidney dysfunction. The present study aims to examine whether MG is a direct causative substance for CI development. Experimental rats were divided into two groups: control and MG group (0.5% MG in drinking water), and fed a normal diet for 12 months. Cognitive function was evaluated by two behavioral tests. Serum MG was significantly elevated in the MG group at the end of study. The groups did not differ in cognitive function during the course of study. No time-course differences were found in oxidative stress markers between the two groups, while, antioxidants were significantly increased in the MG group. Long-term MG administration to rats with normal kidney did not cause CI, possibly due to a counter-balanced activation of the anti-oxidant system. Pathogenetic significance of MG for CI requires further investigation.

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 認知機能 尿毒素 メチルグリオキサール

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者では比較的早期の段階から認知機能低下が存在することが疫学研究で明らかにされた。しかしながら、この原因に関しては全く不明であった。一方、慢性腎臓病では血中メチルグリオキサール(MGO)が腎機能低下にしたがい増加している。いくつかの非慢性腎不全例での報告で、認知機能低下例と MGO 濃度との関連性が指摘されている。MGO は代表的な酸化障害を惹起する尿毒素である。基礎実験で、MGO が脳 astrocyte 細胞にアポトーシスを誘導する事が報告されている。

以上の背景から、我々は、慢性腎臓病患者においては、増加した MGO が脳海馬細胞の障害を惹起し、これが慢性腎臓病患者に多く認められる認知機能低下に関与している可能性を想定した。

2. 研究の目的

本研究では、MGO が直接的に認知機能に影響を与えるか、さらに、MGO 負荷による腎臓への影響を動物モデルで検討した。

3. 研究の方法

8週齢SDラットを2群に分け(コントロール群、MGO群)、コントロール群は通常水で、MGO群には0.5% MGO 飲水でMGOを付加し、12ヶ月間にわたり飼育した。飼育期間中、認知機能検査(オープンフィールド物体探索試験、8方向性放射状:空間参照記憶、空間作業記憶、空間参照作業記憶、誤反応)をPhase I(初期16~23週齢)とPhase II(晩期31~44週齢)の2期にかけて実施、さらに、全身の酸化ストレス障害度を検討する目的で、試験終了後にラットをsacrify、脳と腎臓組織を採取、病理組織免疫組織染色: Masson 染色, 8-epi prostane、Advanced glycation endproduct: Carboxylethyllysine)ならびに生化学的検討(尿中蛋白、尿中8-OHdG、尿中MDA、腎グルタチオンペルオキシダーゼ:GPx、superoxide dismutase:SOD)を行った。

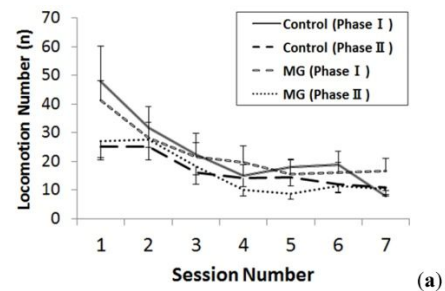
4. 研究成果

全経過を通して、両群ラットの体重、血圧、食事摂取量、飲水量に違いは無かった。腎機能は両群間で違いは無かった(Phase II)が、血中MGO濃度はMGO群においてコントロール群より有意に高値であった(495.8 ± 38.1 vs. 244.8 ± 28.2 nM; p<0.001, Phase II at scarify)。尿中蛋白および酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdG、MDAは、Phase I, II

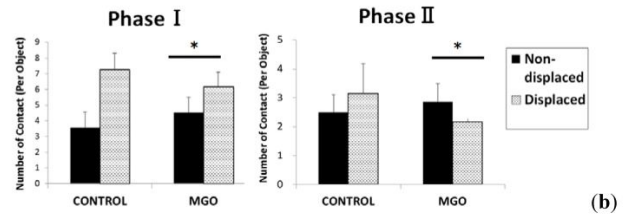
ともに違いは無かった。一方、興味深いことに、腎組織のGPx、SODは、それぞれMGO群で高値であり(GPx: 5.1 ± 0.4 vs. 3.6 ± 0.4 mU/mg; p=0.036, SOD: 6.3 ± 0.9 vs. 3.7 ± 0.9 U/mL/mg; p=0.069) また、血漿および尿中のangiotensinogenはMGO群で有意に低値であった(血漿: 2.1 ± 0.1 vs. 3.2 ± 0.3 ng/mL; p=0.014, 尿: 16.3 ± 6.3 vs. 29.3 ± 6.5 ng/day; p=0.034)。

認知機能の結果:

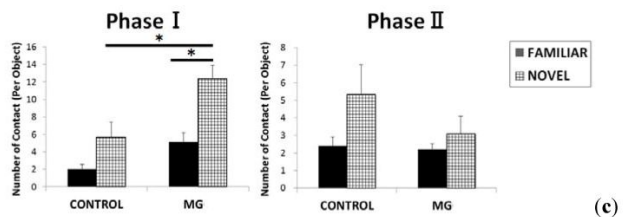
オープンフィールド物体探索試験



Spatial recognition test



Object recognition test



Phase I, II でそれぞれ認知機能試験を7回施行した。

(a) 移動回数

コントロール、MGO 投与群の間で移動回数(活動度)に違いは無かった。

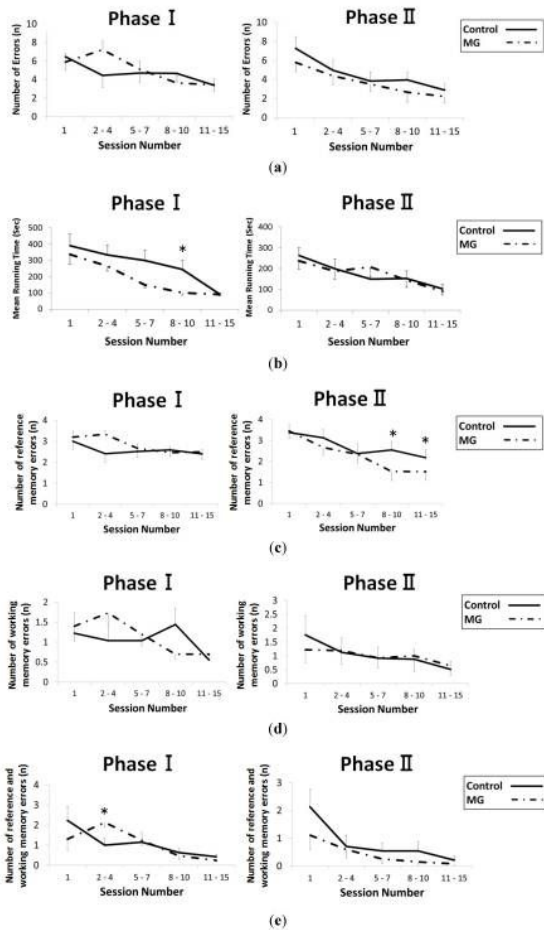
(b) 空間認知機能

Phase I と II でコントロール、MGO 投与群の間に違いは認められなかった。群内においては、MGO 群で Phase I で機能は増強、一方 Phase II では低下していた。コントロール群では有意な変化は無かった。

(c) 物体認識機能

Phase Iにおいて、MGO 群ではコントロールに比較して有意な認識活動の増高を認めた。しかし、Phase II では違いは認められなかった。

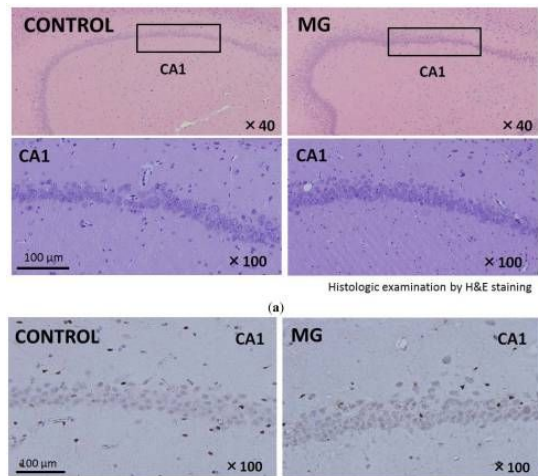
8 方向性放射状：



- (a) すべての検査における誤反応の総数
- (b) 走行時間総計
- (c) 空間参照記憶の誤反応数
- (d) 空間作業記憶の誤反応数
- (e) 空間参照 作業記憶、誤反応数

図に示すように、MGO 群、コントロール群の間で、一部の結果に有意差が認められた部分もあるが、総じて両者の間には大きな違いは認められなかった。

脳海馬組織所見 (47 週齢のラット)



- (a) Hematoxylin & Eosin 染色  
特に細胞脱落所見は認めない。
- (b) Caspase-3 染色  
有意な Caspase-3 染色性は認めない。

コントロール、MGO 群の両者間で明らかな違いは認められなかった。

研究成果の総括

本研究では、MGO が直接的に認知機能に影響を与えるかを正常腎機能の動物モデルで検討した。結果は、慢性の高 MGO 血症状態に長期にわたり晒されても、脳の海馬組織には形態的变化は認めず、また、認知行動や活動量にも影響は無かった。以上から、少なくとも、MGO 単体ではたとえそれが慢性腎臓病例と同じ高値状態にあっても、認知機能障害に結び付く可能性は否定的であった。しかしながら、MGO 負荷群では生体の抗酸化ストレス系が亢進していた事実から、MGO の生体障害に対して生体は防御反応を示し、これによって臓器障害が抑制されている可能性が示唆された。したがって、慢性腎臓病のような抗酸化系が障害されている例では、正常腎機能例に比較して MGO の障害は顕性化しやすい可能性がある。今後の検討課題と考える。

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 1 件)

Watanabe K, Okada K, Fukabori R, Hayashi Y, Asahi K, Terawaki H, Kobayashi K, Watanabe T, Nakayama M. Methylglyoxal (MG) and cerebro-renal interaction: does long-term orally administered MG cause cognitive impairment in normal Sprague-Dawley rats? *Toxins (Basel)*. 2014 Jan 7;6(1):254-69.

[学会発表](計 2 件)

第 56 回日本腎臓学会学術総会

2013/05/12

演題名：尿毒症物質メチルグリオキサールによる認知機能障害に関する研究

渡邊公雄、林義満、旭浩一、深堀良二、岡田佳奈、小林和人、中山昌明、渡辺毅  
1 福島県立医科大学腎臓・高血圧内科、2 福島県立医科大学生体情報伝達研究所・生体機能部門、3 広島大学大学院総合科学研究科行動科学講座

8th International Congress on Uremia Research and Toxicity.

2014/3/13

Title: Methylglyoxal (MG) and cerebro-renal interaction: Does long-term orally administered MG cause cognitive impairment in normal Sprague-Dawley rats? Kimio Watanabe, Kana Okada, Ryoji Fukabori, Yoshimitsu Hayashi, Koichi Asahi, Hiroyuki Terawaki, Kazuto Kobayashi, Tsuyoshi Watanabe, and Masaaki Nakayama  
1 Department of Nephrology, Hypertension, Diabetology, Endocrinology and Metabolism, School of Medicine, Fukushima Medical University

2 Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

3 Department of Molecular Genetics,

Institute of Biomedical Sciences, School of Medicine, Fukushima Medical University

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 昌明 (NAKAYAMA, Masaaki)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60217940

(2) 研究分担者

旭 浩一 (ASAHI, Koichi)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60274966

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：