

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790608

研究課題名（和文） 心腎・脳腎連関を考慮した慢性腎臓病治療におけるエリスロポイエチンの有用性の検討

研究課題名（英文） Investigation into the tissue-protective effects of erythropoietin against cardio-renal syndrome

研究代表者

鳥羽 裕恵 (TOBA HIROE)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90351270

研究成果の概要（和文）：部分腎摘術により作成した CKD モデルラットの大動脈組織では、腎機能の低下に相関して、血中 ADMA 濃度と大動脈組織における ACE 活性が上昇し、内皮機能低下と炎症反応の亢進が認められた。培養血管内皮細胞に ADMA を負荷すると superoxide 産生が増加するが、ACE 阻害薬併用により抑制され、心腎連関の機序の一つに、ADMA 上昇による renin-angiotensin 系を介した superoxide 産生が寄与していることが示された。また、造血を起さない低用量の erythropoietin を糖尿病ラットや CKD モデルラットに慢性投与すると大動脈障害が抑制され、その機序には Akt 経路を介した NO 産生が重要な役割を担っていることが示唆された。さらに NO 合成酵素阻害剤を負荷したラットにおいても erythropoietin は血管保護効果を発揮し、その機序には Cu/Zn-SOD や heme oxygenase-1 などの抗酸化酵素の発現増大が関与していた。さらにもう一つの機序として、JAK2/STAT5 経路活性化により産生された抑制性タンパク質 SOCS-1 が NADPH oxidase 活性を介した superoxide 産生を抑制していることが示唆された。本研究は CKD の病態時における心腎連関の機序の一部を解明し、さらに心腎連関の抑制を考慮した CKD 治療薬としての erythropoietin の有用性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：CKD was induced by five-sixths or seventeen-eighteenths nephrectomy. Proteinuria and CCr were aggravated and plasma ADMA level was increased in accordance with the degree of nephrectomy. Endothelial-dependent vasodilation was blunted and macrophage infiltration, osteopontin expression, NADPH oxidase-derived superoxide production and ACE activity were increased in nephrectomized rat aortas. These changes are correlated with the degree of renal dysfunction. ADMA enhanced the NADPH oxidase activity in endothelial cells, which was inhibited by cotreatment with ACE inhibitor, captopril. ADMA induced vascular injury not only by inhibiting NOS but also by inducing oxidative stress via ACE activation in CKD. On the other hand, low dose of erythropoietin inhibits endothelial dysfunction and inflammation in CKD and diabetic rat aorta beyond hematopoiesis. Erythropoietin reversed the levels of phospho-Akt and eNOS protein and plasma NOx, which were reduced in 5/6Nx. Furthermore, erythropoietin was administered to NO synthase inhibitor (L-NAME, 0.7 mg/ml)-treated rats. Erythropoietin improved endothelium-dependent vasodilatation. Macrophage infiltration in L-NAME-treated rats was reduced by erythropoietin. Erythropoietin enhanced the levels of phospho-Akt, HO-1 and Cu/Zn-SOD protein. The increased NADPH oxidase-derived superoxide production in L-NAME-treated rat was suppressed by erythropoietin. Erythropoietin also induced SOCS1 overexpression. Cotreatment with STAT5 inhibitor cancelled erythropoietin-induced suppression in NADPH oxidase-derived superoxide production in angiotensinII-treated endothelial cells. In conclusion, erythropoietin exhibited vasoprotective effects via NO production through Akt pathway. In addition, erythropoietin improved vascular injury in L-NAME-treated rats by antioxidative

properties. SOCS-1 overexpression would play an important role in suppressing NADPH oxidase activation as its mechanisms. In conclusion, erythropoietin exerts vasoprotective effects in CKD rats beyond hematopoiesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：臨床薬理学・心腎連関

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) 患者の死因の約半数が心血管疾患 (cardiovascular disease: CVD) であること、また微量アルブミン尿の時点から CVD 発症リスクが増加することが報告され、CKD が CVD の独立した危険因子であることが多くの疫学研究で明らかにされている (Go AS et al. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1296)。この「心腎連関」に加え、尿蛋白や腎機能悪化と、脳卒中の発症リスクにも相関があることが近年報告され (Klausen KP et al. *J Intern Med.* 2006; 260: 231)、「脳腎連関」の概念も注目を集めている。

(2) 腎臓は、造血ホルモンであるエリスロポイエチン (erythropoietin: EPO) を産生しているため、CKD ステージ 3 以上になると、EPO 産生低下による腎性貧血を発症する。EPO は赤血球前駆細胞上の EPO 受容体に結合し、赤血球数の増加・維持に作用するが、近年、脳、心臓、腎臓、血管などの非造血組織における EPO 受容体の発現が確認されるとともに (Khoshdel et al. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 10(1): 1)、これらの臓器において、EPO が虚血/再灌流障害を軽減することが報告され (Chatterjee PK et al. *Lancet* 2005; 365(9474): 1890)、EPO による多面的な臓器保護効果が報告されるようになった。これまでの EPO の多面的な臓器保護効果については、急性効果を検討したものが多かったが、研究代表者は、造血を起さない低用量の EPO を慢性投与すると、糖尿病性腎症が軽減されることを報告している (Toba H et al. *Eur J Pharmacol.* 2009; 612 (1-3): 106-14)。

2. 研究の目的

(1) 部分腎摘により CKD 動物を作成し、腎障害に起因した血管組織における内皮機能低下や炎症反応を検討し、腎機能低下時の血管障害を引き起こす原因物質を特定し、その機序について *in vitro* で解明する。

(2) CKD 動物に造血を起さない低用量の EPO もしくは造血させない EPO アナログを投与し、EPO が CKD の病態時において、臓器保護効果を発揮するか否かについて検討する。

3. 研究の方法

(1) ラットに 1/2、3/4、5/6、17/18 腎摘術を施し CKD モデルを作成する。腎摘の程度と腎機能 (尿蛋白、GFR、CCr) の関係性を評価した上で、腎障害と血管障害の相関関係について検討した。大動脈組織を用い、弛緩反応から内皮機能を評価するとともに、脳血管においても検討する。相関が確認できたら、原因候補物質 (もしくは原因となる病態) についての検討を、血中に増加する ADMA など、これまで臨床的検討で示唆されているものを中心に ELISA 等で測定後、相関のあった物質を培養血管内皮細胞に負荷し、機序を含め検討した。

(2) 造血を起さない低用量の EPO もしくは EPO アナログを CKD ラットに慢性投与し、CKD ラットにおける臓器保護効果について検討した。腎摘完了時から EPO を週 3 回、皮下投与した。投与量は、研究代表者が糖尿病モデルラットで造血を起さず尿蛋白を抑制することを証明した投与量 (150 U/kg ; Toba H et al. *Eur J Pharmacol.* 2009; 612(1-3): 106-14) から開始した。摘出脳・血管組織の薄切切片・ホモジネート中のリン酸化型 Akt、eNOS の発現を Western blotting 法で検討し、EPO 投与群で PI3K/Akt/eNOS 経路が活性化していることを確認した。NO 合成酵素阻害薬 (L-NAME) を併用時に EPO の臓器保護効果が消失するか検討した。

4. 研究成果

(1) 部分腎摘術により 1/2 腎摘、3/4 腎摘、5/6 腎摘、17/18 腎摘術を行った。1/2 腎摘、3/4 腎摘ラットではノーマルラットと尿たんぱく、クレアチニンクリアランスに有意差はなかったが、5/6 腎摘、17/18 腎摘ラットで

は腎摘の程度に相関して尿たんぱく、クレアチニンクリアランスの悪化とヘマトクリット値の低下が認められた。一方、血圧は全群間に有意差は認められなかった。また、5/6腎摘、17/18腎摘ラットでは大動脈における内皮機能の低下とスーパーオキシド産生の増加、VCAM-1やオステオポンチン、マクロファージの浸潤などの炎症反応の亢進が認められたが (Toba H et al., *Eur J Pharmacol.* 2012; in press)、これらは 5/6腎摘群より 17/18腎摘群でより強く認められた。また、腎機能の悪化に相関して、内因性 NO 合成酵素阻害物質である ADMA の血中濃度が上昇していた。さらに、ADMA による血管障害発症メカニズムについて検討した。CKD モデルラットでは腎機能低下と血中 ADMA 濃度の上昇に伴い、大動脈における ACE 活性と superoxide 産生が増大していた。さらに、ADMA を培養血管内皮細胞に ADMA を負荷すると superoxide 産生が増加し、これは ACE 阻害薬 captopril を併用することで抑制された。

(2) Erythropoietin の血管保護効果について検討するためによりシビアな腎障害を引き起こすために、5/6腎摘ラットに食塩を負荷し、高血圧合併 5/6腎摘ラットを作成した(高血圧 CKD ラット)。Erythropoietin は高血圧 CKD ラットの尿たんぱくとクレアチニンクリアランスの悪化を軽減した。また、erythropoietin は大動脈におけるマクロファージ浸潤と肥厚、内皮機能低下を改善した。また erythropoietin 投与群でリン酸化 Akt 発現増大が確認された (Toba H et al., *Eur J Pharmacol.* 2011; 10;656(1-3):81)。さらに、腎・血管障害の重要な危険因子である糖尿病のモデルラットにおいても同様の結果を得た (*Pharmacology*, 2013; **91**, 48-58)。NO 以外の EPO の血管保護機序について解明すべく、NO 合成酵素阻害剤負荷ラットにおける大動脈障害に対する効果と改善機序について検討した。NO 合成酵素阻害下においても EPO は大動脈の内皮機能低下や炎症を抑制し、その機序には SOD や HO-1 等の抗酸化酵素発現増大や NADPH oxidase 活性を介した superoxide 産生の抑制を介していることを明らかにした。また、EPO 投与により抑制性タンパク質である SOCS-1 発現が大動脈組織で増加していた。AngiotensinII 負荷培養血管内皮細胞に EPO を投与すると superoxide 産生が低下したが、これに STAT5 阻害剤を併用し SOCS-1 産生を抑制すると、EPO による抗酸化作用がキャンセルされた (*Eur. J. Pharmacol.*, 2012; **691(1-3)**: 190-197)。

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 4 件)

- ① Wang J, Toba H, Morita Y, Nakashima K, Noda K, Tian W, Kobara M, Nakata T: Endothelial dysfunction, macrophage infiltration and NADPH oxidase-dependent superoxide production were attenuated by erythropoietin in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. *Pharmacology*, **91**, 48-58 (2013)
査読有
DOI: 10.1159/000343963
- ② Toba H, Kojima Y, Wang J, Noda K, Wei T, Kobara M and Nakata T: Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **691(1-3)**, 190-197 (2012).
査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.018.
- ③ Toba H, Tojo C, Noda K, Kobara M and Nakata T: Telmisartan inhibits vascular dysfunction and inflammation via activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in subtotal nephrectomized rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **685(1-3)**, 91-98 (2012).
査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.01.026.
- ④ Toba H, Morishita M, Tojo C, Nakano A, Oshima Y, Kojima Y, Yoshida M, Nakashima K, Wang J, Kobara M and Nakata T: Recombinant human erythropoietin ameliorated endothelial dysfunction and macrophage infiltration by increasing nitric oxide in hypertensive 5/6 nephrectomized rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **656**, 81-87 (2011).
査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.01.043.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Hiroe Toba, Yushi Kojima, Jiahong Wang, Kazuki Noda, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata: Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited

hypertensive rat aorta. 22nd European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (London, UK), 2012. 4.29.

- ② **Hiroe Toba**, Yushi Kojima, Kazuki Ishimizu, Yuko Iwata, Yusuke Taira, Jiahong Wang, Kazuki Noda, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata: Erythropoietin treatment inhibited NADPH oxidase-derived superoxide production and endothelial dysfunction in nitric oxide synthase inhibitor-treated rat aorta. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (Sydney, Australia), 2012. 10.1.
- ③ **Hiroe Toba**, Shoko Murata, Yuko Oshima, Yushi Kojima, Kohei Nakashima, Kazuki Noda, Jiahong Wang, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata: Vascular dysfunction and remodeling occurred in accordance with renal impairment in nephrectomized rats. 21st European Meeting on Hypertension (Millan, Italy), 2011.6.19.
- ④ **Hiroe Toba**, Kohei Nakashima, Yuko Oshima, Yushi Kojima, Chisato Tojo, Jiahong Wang, Miyuki Kobara, and Tetsuo Nakata: Low dose of erythropoietin improved endothelial dysfunction and inflammation in 5/6 nephrectomized rat aorta beyond hematopoiesis. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (横浜), 2011.3.20.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥羽 裕恵 (TOBA HIROE)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：90351270

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：