

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590970

研究課題名 (和文) カルボニルストレスによる腎循環調節と高血圧発症メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Role of carbonyl stress on renal circulation and development of hypertension

研究代表者

森 建文 (MORI TAKEFUMI)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：40375001

研究成果の概要 (和文)：

糖の代謝産物であるカルボニル物質の代表であるメチルグリオキサールの経口投与はラットにおいて食塩感受性高血圧、インスリン抵抗性および腎障害を呈し、慢性腎臓病の病態に関与することが示された。これらのメカニズムには酸化/カルボニルストレスが関与し、腎臓においては腎髄質血流を減らし、腎虚血を呈する可能性が示唆された。腎酸化ストレス活性化機序にはNAD(P)H oxidaseの活性化の他、腎髄質尿細管の酸素代謝とミトコンドリアの電子伝達系を介したミトコンドリア酸化ストレスが関与すると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Carbonyl compound methylglyoxal induced salt sensitive hypertension, insulin resistance and renal injury which involves in the pathogenesis of chronic kidney disease. These mechanisms are associated with enhanced renal NAD(P)H oxidase, tubular oxygen metabolism and mitochondrial electron chain transport which could result in enhanced medullary carbonyl/oxidative stress and ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,800,000	4,680,000

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：酸化ストレス、糖終末代謝産物、慢性腎臓病、高血圧

1. 研究開始当初の背景

近年、臨床症状の伴わない軽度の慢性腎臓病でも心血管疾患発病の強い危険因子になることが大規模臨床試験で明らかになった。慢性腎臓病患者ではジカルボニル物質の血中濃度が健常人の10倍にも達する。ジカルボニル物質の中でもメチルグリオキサール(MGO)は解糖系から産生される強力な反応性物質で酸化ストレスと共同し内因性血管作動物質として血管障害や腎障害に関与する

ことが報告されている。また Advanced Glycation Endproducts (AGEs) の前駆体でもある。In vivo の実験系においてはメチルグリオキサールと過酸化水素で強いラジカルを産生することが示されている。しかしながら心腎循環や心腎障害に対するメカニズムは依然不明である。本研究ではMGOが慢性腎臓病における内因性血管作動物質として高血圧や心腎連関による障害の進展因子になるという仮説を検証することを目的とし、

これらメカニズムを解明することにより新規治療法の開発をめざす。

2. 研究の目的

本研究では MGO が過酸化水素などと協調し、酸化ストレスを亢進しインスリン抵抗性、高血圧および腎障害といった慢性腎臓病の病態に関与していると仮説を立てた。本研究はこの仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1 慢性腎臓病に対する MGO の役割

慢性腎臓病モデルである 9 週齢の Dahl 食塩感受性高血圧 (DahlS) ラットを、1) コントロール群、2) 1% MGO を経口飲水投与群、3) 1% MGO 投与群にアンジオテンシン受容体拮抗薬のカンデサルタンを投与した群 4) 間でサルタン単独群の 4 群に分け、4 もしくは 12 週間観察した。週一回代謝ケージで尿を回収し、血圧をテールカフ法で測定した。一部のラットではテレメトリー装置を挿入し、血圧を無麻酔無拘束下で 24 時間連続して血圧をモニターした。回収した尿から尿中アルブミン排泄量を測定した。実験終了後、腎臓を摘出し、瞬時に冷凍保存した右腎組織から腎 NAD(P)H oxidase 活性を測定し、左腎をパラフィン包埋し切片を作成した。腎組織切片をエラスティカマッソン染色し、オステオポンチン (尿細管障害のマーカー)、ED-1 (炎症マーカー)、カルボキシエチルリジン (カルボニルストレスのマーカー)、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (酸化ストレスのマーカー) をそれぞれ特異的抗体で免疫染色した。

実験 2 食塩感受性高血圧およびインスリン抵抗性に対する MGO の役割

Sprague Dawley ラットを 1) コントロール群、2) 1% MGO 投与群、3) 8% 高食塩食群、4) 1% MGO 投与に 8% 高食塩食を与えた群、5) 4) に抗酸化剤の N アセチルシステインを投与した群、6) 4) にカルボニルストレス阻害剤の TM2002 の 6 群に分け、4 週間観察後、グルコースクランプ法でインスリン抵抗性について検討した。さらに実験終了時に腎臓を摘出し、パラフィン切片を作成後、カルボキシエチルリジンと N-ニトロタイロシン (酸化ストレスのマーカー) の免疫染色を行った。

実験 3 圧による過酸化水素産生機序

Sprague Dawley ラットをケタミンとイナクテンで麻酔し左腎動脈分岐部上下の大動脈および上腸間膜動脈にクランプをし、腎動脈の灌流圧を調節した。尿管にカテーテルを挿入し尿を経時的に回収、血圧を左大腿動脈に挿入したカテーテルより連続測定した。左腎髄質にマイクロダイアライシスプローブの挿入により腎髄質間質液を回収し、その過酸化

水素濃度をモニターした。

実験 4 腎内酸化ストレス産生機序

Sprague Dawley ラットの腎髄質ヘンレのループ尿細管を単離し、カバーガラスの上に固定した。ミトコンドリア過酸化水素特異的な蛍光標識色素 MitoPY1 により染色した後、蛍光顕微鏡のステージ上で細いピペットで尿管側を微小灌流した。灌流液のブドウ糖濃度を 50mmol/L から 250mmol/L に増加した際のミトコンドリア内過酸化水素濃度をリアルタイムに観察した。

実験 5 腎血流に対する MGO の役割

Sprague Dawley ラットをケタミンとイナクテンで麻酔後、左腎臓を露出し、腎髄質間質にカテーテルを挿入し、メチルグリオキサールを注入した。また、腎髄質外層にレーザードップラー装置につながった光ファイバー挿入し、髄質血流を測定した。血圧は左大腿動脈に挿入したカテーテルにより測定した。

4. 研究成果

実験 1 慢性腎臓病に対する MGO の役割

慢性腎臓病モデルの Dahl 食塩感受性高血圧 (DahlS) ラットに MGO を 4-12 週間経口飲水投与すると血圧の上昇 (図 1 A, B) がみられ、この血圧上昇はカンデサルタンの投与により抑制された (図 1 B)。テレメトリー装置により 24 時間連続血圧測定を行うと MGO の投与により起床時 (active phase) に有意な血圧上昇がみられた (図 1 C)。これらの結果から、MGO による血圧上昇にレニン・アンジオテンシン系の関与が示唆された。

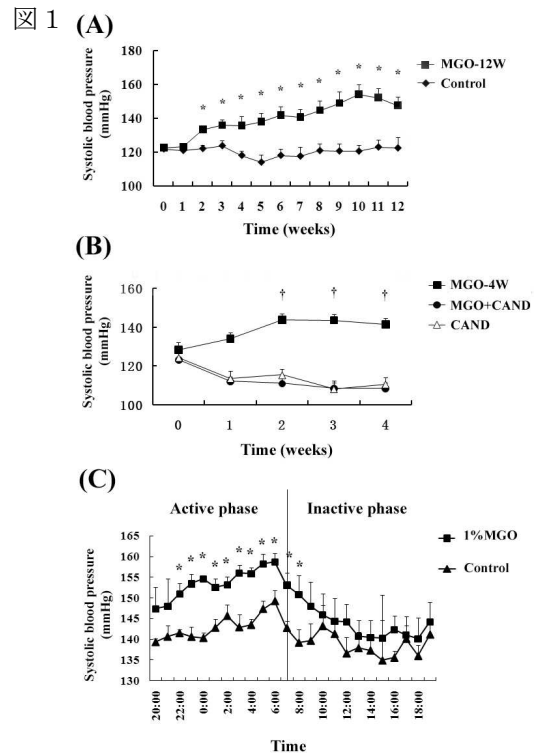
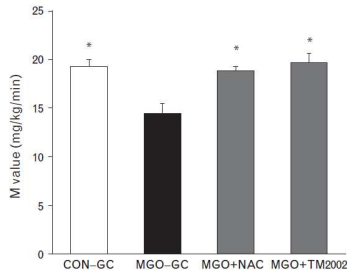


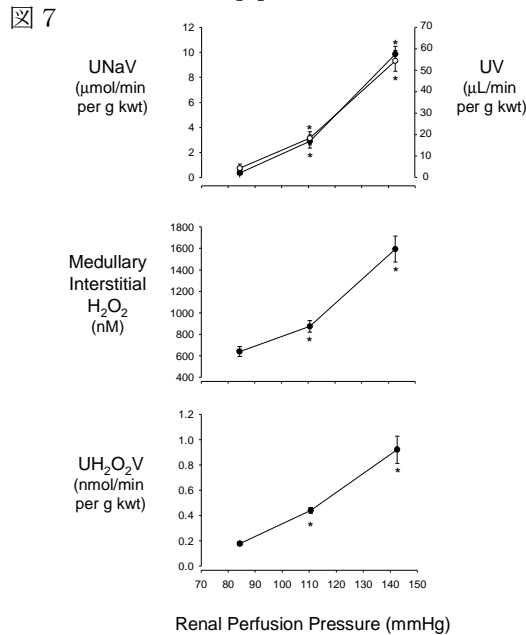
図 2 A に示すように尿中アルブミン排泄は

ースクランプ法による M 値は低下しインスリン抵抗性が高まることが示された。これはカルボニルストレスの消去剤である N アセチルシステインや TM2002 で抑制できた (図 6)。

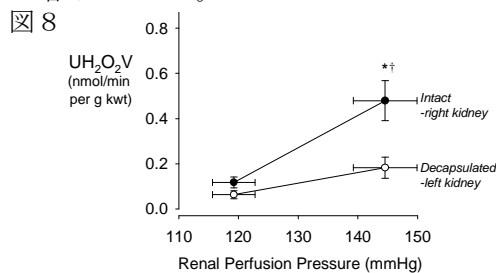


実験 3 圧による過酸化水素産生機序

慢性腎臓病ではしばしば血圧の上昇を伴うが、腎灌流圧の上昇が酸化ストレスの亢進につながるかどうかを検討した。左腎の腎灌流圧を段階的に上げると左腎から出る尿中 Na 排泄量 (UNaV) の増加とともにマイクロダイアライシス法による腎髄質間質液 (Medullary Interstitial H_2O_2) と尿中の過酸化水素排泄量 (UH_2O_2V) が上昇した (図 7)。



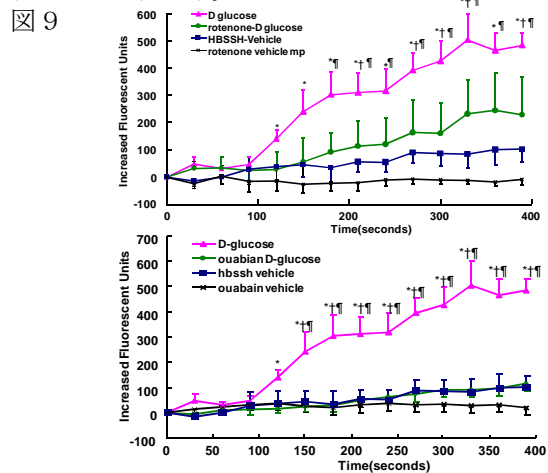
腎間質圧の関与を検討するために両腎灌流圧を上げ、片腎のみ皮膜を除去し、間質圧を減らした。その結果図 8 に示すように皮膜を除去しない (Intact-right kidney) は皮膜を除去した左腎 (Decapsulated-left kidney) に比べ有意に尿中過酸化水素排泄量 (UH_2O_2V) が増加していた。



これらの結果から血圧上昇自体が腎灌流圧とともに腎間質圧の増加し、腎内酸化ストレスの増加をもたらすことが明らかになった。

実験 4 腎内酸化ストレス産生機序

糖尿病はカルボニルストレス依存性に慢性腎臓病を呈することが知られ、尿細管管腔内のブドウ糖濃度が増加する。以前に我々は MGO の前駆体であるブドウ糖は尿細管において NADPH oxidase を介し酸化ストレスを亢進することを報告している (Mori et al. Hypertension 2004)。近年、また当教室において、MGO が血管内皮細胞においてミトコンドリア依存性に過酸化水素を産生することを報告している (Miyazawa et al. Free Radic Res. 2010)。そこで尿細管を単離し、尿細管管腔内のブドウ糖濃度を上げた際の尿細管ミトコンドリア内酸化ストレスを評価した。尿細管管腔内のブドウ糖濃度が増加すると 400 秒以内にミトコンドリア活性酸素および過酸化水素量は増加した。しかしながら、Na-K ATPase ポンプ阻害薬の ouabain で抑制が認められた。さらにミトコンドリア complex 阻害薬の rotenone によりミトコンドリア内活性酸素量の上昇は有意に抑制され、メチルグリオキサールが電子伝達系を介して活性酸素を産生していることが示唆された (図 9)。



実験 5 腎血流に対する MGO の役割

ラットに MGO を慢性静脈内投与すると血圧が上昇したが、腎髄質血流の低下は認められなかった。腎髄質血流を増やす作用のある NO の関与を検討するために NO 合成酵素阻害薬の L-NAME を前投与し、同様の実験を行ったが、有意な腎髄質血流の低下はみられなかった。腎髄質血流は血圧により大きく影響を受けるため、血圧の上昇が MGO による腎髄質血流の低下を抑制している可能性が示唆された。現在、血圧が低下しない用量で検討中である。実験 3 や実験 4 の結果と我々の過去の研究成果より MGO が腎髄質尿細管の酸化ストレスを亢進するとその周囲の直血管を収縮し血流を低下することが考えられた。

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 60 件)

1. Haruki Momma, Kaijun Niu, Yoritoshi Kobayashi, Lei Guen, Mika Sato, Hui Guo, Masahiko Chujo, Atsushi Otomo, Cui Yufei, Hiroko Tadaura, Tatsunori Saito, Takefumi Mori, Toshio Miyata, Ryoichi Nagatomi. Skin advanced glycation end product accumulation and muscle strength among adult men. *European Journal of Applied Physiology* in Press. 2011 (査読有)
2. 森 建文、宮田 敏男、佐藤 博、伊藤 貞嘉. AKI 発症と酸化/カルボニルストレス Modern Physician Vol.31 No.1;30-33, 2011. (査読無)
3. Susumu Ogawa, Keisuke Nakayama, Masaaki Nakayama, Takefumi Mori, Masato Matsushima, Masashi Okamura, Miho Senda, Kazuhiro Nako, Toshio Miyata, Sadayoshi Ito. Methylglyoxal is a predictor in type 2 diabetic patients of intima-media thickening and elevation of blood pressure. *Hypertension*. 56(3):471-6, 2010. (査読有)
4. Ryoji Nagai, Takefumi Mori, Yasuhiko Yamamoto, Yuichi Kaji, Yoshikazu Yonei Significance of Advanced Glycation End Products in Aging-Related Disease. *Anti-Aging Medicine*. 7(10):112-119, 2010 (査読有)
5. Susumu Ogawa, Hiroyuki Kobori, Naro Ohashi, Maki Urushihar, Akira Nishiyama, Takefumi Mori, Tsuneo Ishizuka, Kazuhiro Nako, Sadayoshi Ito. Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers Reduce Urinary Angiotensinogen Excretion and the Levels of Urinary Markers of Oxidative Stress and Inflammation in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy.: *Biomark Insights*. 4:97-102, 2009. (査読有)
6. Qi Guo, Takefumi Mori, Jiang Yue, Chunyan Hu, Yusuke Osaki, Yoshimi Yoneki, Ying Sun, Takuma Hosoya, Akihiro Kawamata, Susumu Ogawa, Masaaki Nakayama, Toshio Miyata, Sadayoshi Ito. Methylglyoxal Contributes to the Development of Insulin Resistance and Salt Sensitivity in Sprague Dawley Rats. *J. Hypertens*. 27(8):1664-71, 2009. (査読有)
7. Chunhua Jin, Chunyan Hu, Aaron Polichnowski, Takefumi Mori, Meredith Skelton, Sadayoshi Ito, Allen W. Cowley, Jr. Effects of renal perfusion pressure on renal medullary H2O2 and NO production. *Hypertension*. 53(6):1048-53, 2009 (査読有)
8. Takefumi Mori, Sadayoshi Ito. Carbonyl stress in hypertension, insulin resistance and chronic kidney disease. *IMARS highlights*. 4(1):15, 2009. (査読無)
9. 森 建文、陳 献廣、胡 春艶、大崎雄介、朱 万君、米城淑美、郭 琪、中道崇、細谷拓真、長澤 将、井上英行、小川 晋、中山昌明、伊藤貞嘉. 慢性腎臓病の進展に対する Methylglyoxal の影響. *Therapeutic Research* 2008, 29(11):1884-1886. (査読無)

[学会発表] (計 125 件)

国際学会

1. Yi Lu, Takefumi Mori, Chunyan Hu, Yusuke Ohsaki, Bryan C Dickinson, Christopher J Chang, Allen W Cowley Jr, Sadayoshi Ito.; Angiotensin II Increases Mitochondrial Reactive Oxygen Species through Mitochondrial Respiratory Chain in Medullary Thick Ascending Limb of the Rat Kidney ; 64th Council for High Blood Pressure Research; 2010/10/14 Washington DC ,USA(Poster)
2. Takefumi Mori, Akihiro Kawamata, Takuma Hosoya, Yoshimi Yoneki, Eiko Mitsui, Yoko Hasegawa, Michi Ota, Megumi Ito, Hiromi Sato, Shigeru Kabayama, Sadayoshi Ito, Wataru Hida: Enhanced oxidative and carbonyl stress predicts salt sensitive in obese young adults. ; Experimental Biology2010 ;2010/04/26;California, USA (Oral and Poster)
3. Takefumi Mori, Akihiro Kawamata, Takuma Hosoya, Yoshimi Yoneki, Eiko Mitsui, Yoko Hasegawa, Michi Ohta, Shigeru Kabayama, Kyoza Suyama, Toshinobu Sato, Takuo Hirose, Masaaki Nakayama, Toshio Miyata, Yutaka Imai,

- Sadayoshi Ito, Wataru Hida. Carbonyl and oxidative stress may predict salt sensitivity of hypertension in obese young adults; ISN nexus 4/16, 2010 Kyoto, Japan (Poster)
4. Takefumi Mori, Qi Guo, Chunyan Hu, Xianguang Chen, Yusuke Ohsaki, Yoshimi Yoneki, Toshio Miyata, Masayuki Kanazawa, Masahiro Kohzuki, Sadayoshi Ito. Carbonyl stress mediated myocardial fibrosis and renal injury in Dahl salt sensitive rats; ISN nexus 4/16, 2010 Kyoto, Japan (Poster)
5. Qi Guo, Takefumi Mori, Xianguang Chen, Chunyan Hu Yusuke Ohsaki, Yoshimi Yoneki, Toshio Miyata, Sadayoshi Ito. Carbonyl stress mediated cardio-renal connection in Dahl salt sensitive rats. 14th International Congress of Endocrinology 2010/3/28, Kyoto (Poster)
6. T Mori, Q Guo, M Nakayama, S Ogawa, K Suyama, T Miyata, S Ito. Role of Carbonyl Stress on Pathogenesis of Chronic Kidney Disease. 10th International Symposium on the Maillard Reaction. 2009/8/31, Cairns, Australia (Oral invited speaker)
7. Qi Guo, Takefumi Mori, Chunyan Hu, Yusuke Ohsaki, Yoshimi Yoneki, Takashi Nakamichi, Takuma Hosoya, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito. Losartan reverse thiazide diuretics-exacerbated insulin resistance through modulation capillary density in skeletal muscle in fructose-fed rats. 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation. 2009/6/3, Matsushima, Miyagi, Japan (Peer reviewed, Poster)

国内学会

8. 森 建文、他 アンジオテンシン II による腎尿細管ミトコンドリア酸化ストレスの役割 第 84 回日本内分泌学会学術総会(口演) 2011 年 4 月 21 日、神戸
9. 芦 毅、森 建文、宮田 敏男、伊藤貞嘉 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酸化ストレスの検討 (若

- 手希望) 第 20 回メイラード学会(口演) 2010 年 9 月 17、東京
10. 森 建文 慢性腎臓病の腎、心血管障害に対するカルボニルストレスの役割 第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(口演) 2009 年 10 月 24 日、大宮
11. 郭 其, 森 建文, 大崎 雄介, 米城 淑美, 江 悦, 胡 春艶, 中道 崇, 細谷 拓真, 小川 晋, 中山 昌明, 佐藤 博, 宮田 敏男, 伊藤 貞嘉 慢性腎臓病の進展因子に対する Methylglyoxal の役割 第 52 回日本腎臓学会学術総会 (口演) 2009 年 6 月 4 日、横浜
12. 森 建文, 郭 其, 孫 穎, 大崎 雄介, 胡 春艶, 佐藤 博, 須山 享三, 宮田 敏男, 伊藤 貞嘉 Methylglyoxal のメラミン腎障害に及ぼす影響 第 52 回日本腎臓学会学術総会 (口演) 2009 年 6 月 3 日、横浜
13. 森 建文, 郭 琪, 江 悦, 胡 春艶, 大崎雄介, 中道 崇, 細谷拓真, 長澤 将, 井上英行, 小川 晋, 中山昌明、宮田敏男、伊藤貞嘉. メチルグリオキサールの食塩感受性高血圧を介した慢性腎臓病進展機序、第 20 回日本糖尿病性腎症研究会、2008 年 12 月 7 日、東京 (口演)
14. 郭 琪、森 建文、江悦、大崎雄介、米城淑美、胡春艶、中道崇、細谷拓真、長澤将、井上英行、小川晋、中山昌明、宮田敏男、伊藤貞嘉 メチルグリオキサールのインスリン抵抗性に対する作用と食塩感受性との関連 第 31 回日本高血圧学会総会 (ポスター) 2008 年 10 月 11 日 札幌

[その他]
ホームページ等
<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 建文 (MORI TAKEHUMI)
東北大学・病院・准教授
研究者番号：40375001

(3) 連携研究者

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