

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390218

研究課題名(和文)慢性腎臓病の基盤病態と心血管病との関連機序の統合的理解と新規治療法開発

研究課題名(英文)Comprehensive understanding of pathophysiology of Chronic Kidney Disease and its association of Cardiovascular Disease.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病CKDは末期腎不全のみならず、脳卒中、心血管病、認知機能障害等の独立したリスク因子である。アルブミン尿はごく微量から心血管病と強く関連している。血管障害の最早期病態は内皮障害と微小炎症である。アルブミン尿が内皮障害を反映すると想定されてきたが、糸球体内皮が有窓性であるため、仮説に止まっていた。微小循環動態、透過性変化を生体において解析しうるin vivo imaging技術を確立し、血管内皮障害の役割を解明した。加齢腎、腹膜組織線維化にも内皮障害が関与することも明らかにした。CKDと心血管病の共通基盤病態は内皮機能障害であり、CKD・心血管病予防・治療のための標的病態を確定した。

研究成果の概要(英文)：Patients with Chronic Kidney Disease (CKD) have a high risk of developing of end stage renal disease, cardiovascular disease (CVD), and cognitive impairment as well. A wide range of pathophysiological pathways have been suggested to be implicated in this association. Endothelial dysfunction has been speculated to be a possible link between CKD and CVD. To test this hypothesis, we have successfully developed the novel in vivo imaging technique with multi-photon laser microscopy, which enabled us to examine the alterations in microcirculation and permeability in the kidney vasculatures. We have elucidated that endothelial injuries is deeply associated with the development of albuminuria, a hall mark of CKD.

Taken all these data together, we have identified that endothelial dysfunction plays a pivotal role as a common link of CKD and CVD. Therefore, endothelial dysfunction is a critical target for the prevention of development of CVD and also progression of CKD as well.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 アルブミン尿 内皮機能障害 酸化ストレス 一酸化窒素 in vivo imaging 加齢 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 CKD は脳卒中、虚血性心疾患、心不全等の心血管病 (Cardiovascular disease:CVD)及び死亡さらに認知機能障害とも連関する。健康寿命延伸を阻む障害因子のひとつである。

CKD 概念の中でも、アルブミン尿は微量アルブミン尿の下限値未満の「超微量」域からこれらのリスクとなる。CVD 発症の最早期病態は血管内皮障害 (Endothelial cell dysfunction:ECD)と微小炎症であり、認知機能障害にも脳内微小循環障害と ECD の関与が示されている。以上の臨床的諸事実は、アルブミン尿発症と CVD,認知機能障害には共通基盤病態として ECD と微小炎症の関与を強く示唆している。しかしながら、糸球体内皮細胞 (glomerular endothelial cell:GEC)は有窓性 (fenestrated) であるがために、透過性制御は主に上皮細胞、基底膜が担っていると考えられてきた。

近年になり GEC も透過性制御に一定の役割を果たしていることが明らかになってきた。fenestrae 内は glycocalyx (GLX) と総称される複合糖質からなる layer で被覆されている。GLX 層が透過性制御に関与し、その破綻がアルブミン尿を惹起することが次第に明瞭になってきた。私共もメタボリックシンドローム (MetS) モデル糸球体において GLX の減少がアルブミン尿と連関することを明らかにした (Diabetologia 2010)。

内皮細胞機能の主体は、一酸化窒素 (NO) 産生である。NO は短命のガス状分子であるため、組織において実体を直接検出することが極めて困難である。組織において NO と活性酸素種 (ROS) を同時に可視化、検出する方法を開発し得た。本法を用いて、糖尿病、高血圧、MetS、加齢モデル糸球体において ROS 産生亢進と鏡像的な NO 産生低下 (ROS/NO 不均衡) が生じており、その原因のひとつが NO 産生酵素 (eNOS) の機能異常 (uncoupling) にあることを見いだした (Am J Physiol 2005, Lab Invest 2011 等)。Microcirculation 2010)。

以上の研究経過を背景として、CKD の治療標的となる病態・分子を確定するために、CKD の病態をより包括的、かつ分子レベルでの解明を目指して本研究に取り組んだ。最終目標は CKD の予防、治療方法の開発であり、健康寿命延伸策を提案し、国民福祉に貢献することにある。

2. 研究の目的

CKD と心血管病の共通基盤病態を内皮 (機能) 障害に求め、アルブミン尿出現の分子機序、内皮障害の役割を解明する、

CKD の基盤病態と心血管病との連関機序について分子レベルと血行動態変化の両面から詳細な検討を加えて理解を深化させる、CKD 進展阻止と心血管病予防のための統合的治療法を構築すべく、標的とな

る病態・標的分子を明確化する、以上を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 糸球体内皮細胞障害とアルブミン尿の関連の解明

アルブミン尿出現メカニズムにおける内皮障害の病因的役割を端的に証明するために、2つの遺伝子改変動物を利用した。NOX2 (NAD(P)H oxidase 主要要素) を内皮特異的に高発現する tie2-NOX2 transgenic mouse (Tg)、及び BH4 (eNOS 機能維持に必須補酵素) の産生律速酵素である GTPCH-1 を内皮特異的に高発現する tie2-GTPCH-1Tg である。

腎障害モデルとして糖尿病自然発症マウスである Akita マウスとの交配、及び STZ 糖尿病モデル、5/6 腎摘モデルを作成した。2光子レザ顕微鏡を用いて糸球体血管壁の透過性変化を解析した。

(2) GTPCH-1 活性・発現調節の分子機構の解明：AMPK の関与の検討

GTPCH-1 は eNOS 機能発現に必須であり、内皮機能調節において中心的役割を果たしている。GTPCH-1 は proteasome 依存性経路により分解調節されている。AMP-activated protein kinase (AMPK) は proteasome 抑制活性を有しており、予備実験では AMPK 活性化は GTPCH-1 の分解抑制を介して GTPCH-1 発現を維持しうることが判明した。Metformin は LKB1 依存性に AMPK をリン酸化・活性化する。糖尿病モデル (Akita, STZ) に metformin を投与し、AMPK 活性化を介した GTPCH-1 発現亢進による腎障害進展の抑制効果を評価した。

(3) 加齢腎における内皮機能障害の関与の解析

加齢と共に全身の血管内皮機能障害が進行し、同時に腎機能が低下する。加齢腎における腎内小血管の内皮機能障害が腎機能に与える影響について解析した。同時に加齢腎における血管新生阻害因子の探索を行った。

(4) 線維化の内皮機能障害の関与の検討

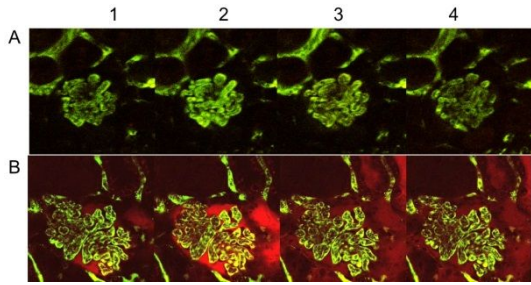
線維化モデルとして腹膜機械損傷モデルを用いた。eNOS 遺伝子欠損マウスを用いて、機械損傷後の腹膜修復の差異について解析した。

4. 研究成果

(1) 腎内微小循環、透過性変化を可視化解析しうる in vivo imaging 技術の開発

2光子 (two-photon) 励起方式レザ顕微鏡 (2光子レザ顕微鏡) を利用し、各種分子量の蛍光標識 probe を用いたラット、マウスの腎内微小血流、透過性変化を直接可視化する in vivo imaging 法を確立し得た (図 1)。

図1 in vivo imaging 技術を用いた糸球体透過性変化の解析



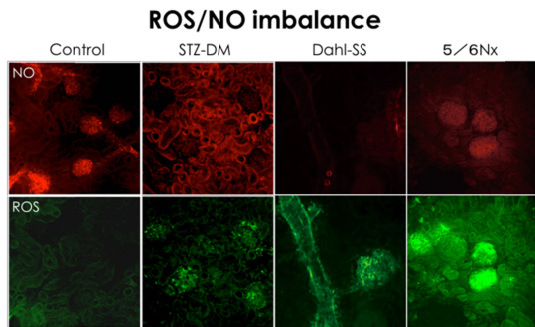
正常糸球体(A)からはテキサスレッド標識アルブミンの漏出を認めないが、糖尿病腎(B)ではアルブミン尿出現以前の段階で、糸球体レベルで大分子量物質の漏出を認める。

(2)糸球体血管内皮細胞機能障害の解析

Diaminorhodamine(DAR-4M : NO 指示薬)、Dichlorofluorescein-diacetate(DCFH-DA:ROS 指示薬) と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、生成NO (bioavailable NO) を ROS と同時に組織上で可視化検出する in situ 可視化法を確立した。

本法を活用して病態モデル腎糸球体におけるNO (赤色蛍光で検出可能), ROS (緑色蛍光で検出可能) 変化を検討し、病態腎における糸球体内皮細胞の形態的かつ、機能的変化の解析が可能となった。糖尿病、高血圧性腎障害、加齢腎では共通して酸化ストレスが亢進し、NO が減少 (ROS/NO 不均衡) が生じていることが判明した(図2)。

図2 疾患腎糸球体における ROS/NO 不均衡



(3)GTPCH-1 活性・発現調節の分子機構の解明 : AMPK の関与の検討

GTPCH-1 は proteasome 依存性経路により分解調節されており、糖尿病腎組織において減少することが判明した。AMPK は proteasome 抑制活性を有しており、AMPK 活性化は GTPCH-1 の分解抑制を介して GTPCH-1 発現を維持しうることを判明した。Metformin は LKB1 依存性に AMPK をリン酸化・活性化する。糖尿病モデル (Akita, STZ) に metformin を投与し、AMPK 活

性化を介した GTPCH-1 発現亢進によってアルブミン尿の抑制効果を認めた。

GTPCH-1 は eNOS 機能発現に必須であり、内皮機能調節において中心的役割を果たしている。糖尿病(Akita DM)糸球体内皮では形態的 (Fenestrae の消失、Glycocalyx 層の減少)、機能的 (NO 産生能低下、eNOS uncoupling) が生じている(図 3-1, 2)。一連の変化は GTP-CH1Tg マウスを Akita マウスとの交配により抑制された。

糖尿病腎では eNOS 機能発現に必須の補酵素 BH4 が低下する。BH4 不足を起因として eNOS uncoupling)が生じる。BH4 産生の律速酵素が GTPCH1 であり、糖尿病では AMPK 活性低下によりプロテアソーム系亢進により分解が亢進している(図 3-4)。GTPCH1 は腎症の治療標的となりうるということが判明した。

図3-1 糖尿病腎糸球体内皮障害とGTP-CH1遺伝子高発現による改善

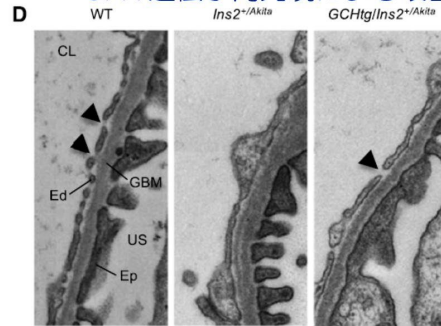


図3-2 糖尿病腎糸球体におけるeNOS uncoupling, ROS/NO不均衡

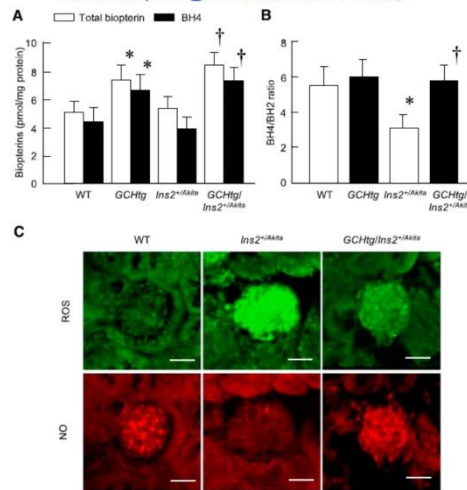


図3-3 GTP-CH1遺伝子Tgマウスにおける糖尿病腎におけるアルブミン尿抑制効果

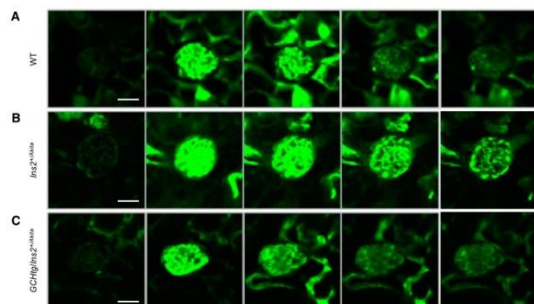
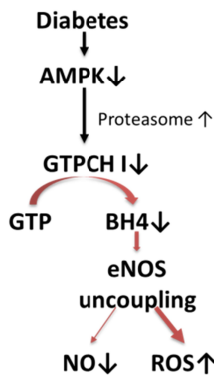


図3-4 糖尿病における内皮機能障害eNOS-uncouplingの分子メカニズム



(4) 蛋白尿による腎障害のメカニズム解析

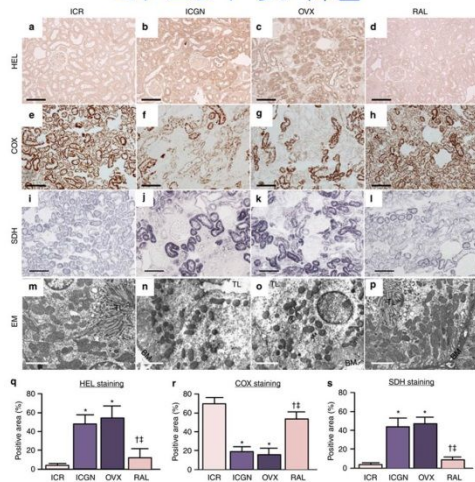
蛋白尿は独立した腎機能障害進展因子である。臨床研究では蛋白尿の増加と共に腎機能予後が不良となることが証明されている。

蛋白尿は腎障害進展の「原因」であるが、その分子機構の詳細は不明であった。

尿中に排泄されるアルブミン分子には遊離脂肪酸が会合している。近位尿細管でアルブミンが再吸収される際に遊離脂肪酸も吸収され、ミトコンドリアに運搬される。ミトコンドリア呼吸鎖機能亢進とともにミトコンドリア酸化ストレスが亢進し、尿管管障害を惹起することが判明した(図4)。

腎臓病の予後には性差が存在する(閉経までは女性が良好)。興味深いことに選択的エストロゲン受容体アゴニストラロキシフェン投与により腎障害が軽減し、その際に、ミトコンドリアにおける Thioredoxin reductase (TrxRD)、SOD 2 活性の亢進を認めた。

図4 アルブミン尿による尿細管ミトコンドリア障害



(5) 加齢腎の病態形成と内皮機能障害

加齢と共に、腎機能(GFR)は低下する。組織学でときには腎間質の線維化、尿管管萎縮腎内小血管の内腔狭小化が進行する。一連

の組織変化を背景として腎血流量が低下し、GFRも進行性に低下する。一方、高齢者では、全身の血管内皮機能が低下することも示されている。

加齢腎の病態形成における血管内皮機能障害の役割について検討した。

Microarray解析により加齢腎組織では、血管新生阻害因子であるAngiostatinが増加することを見いだした。Angiostatinはplasminogenを前駆体としてcathepsin Dにより切り出される。加齢腎ではcathepsin D活性が亢進することを示した。興味深いことに血管内皮機能低下とともにcathepsin D発現、機能が亢進することも明らかとなった。

図4-1 加齢腎における血管新生阻害因Angiostatinの増加

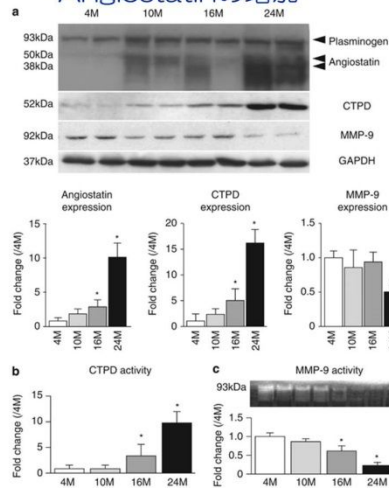
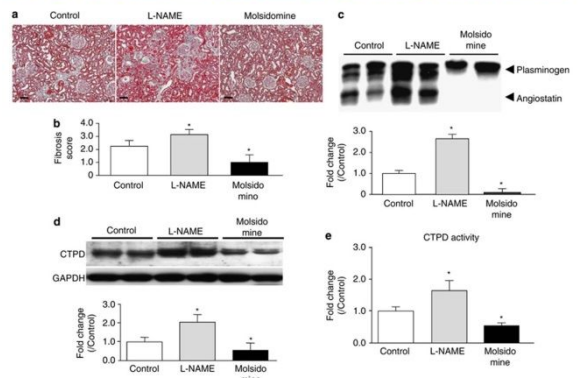


図4-2 内皮機能障害によるCathepsinD活性と腎線維化の亢進

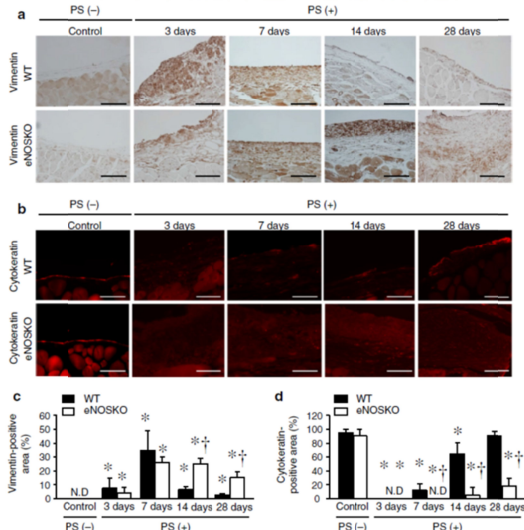


(6) 線維化と血管内皮機能障害

臨床的には高血圧、糖尿病等の血管内皮機能障害を付随する病態において、創傷治癒が遷延することが示されている。線維化の進行、修復に及ぼす血管内皮機能障害の影響を検討した。

マウスの腹膜を機械的に擦過損傷を与え、経時的に創傷治癒、線維化の進行を評価した。eNOS遺伝子欠損マウスとwildマウスを比較した(図5)。

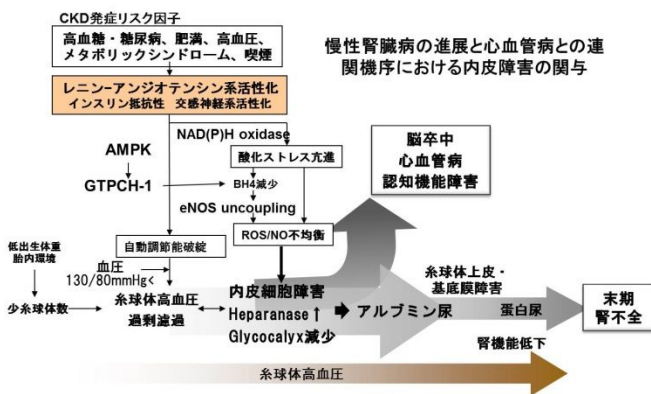
図5 内皮機能障害と腹膜線維化



【まとめ】

糖尿病、高血圧等の生活習慣病を基盤とするCKDは腎内血行動態異常(糸球体高血圧) 諸種の代謝異常を2大基盤病態として発症、進展する。糸球体高血圧と内皮(機能)障害が重複すると、アルブミン尿が出現する。さらに蛋白尿へ移行し腎不全へと至る。

内皮機能障害はアルブミン尿出現に関与し、糖尿病、高血圧、加齢腎に共通した基盤病態であり、CKDとCVDの連関機序である。内皮機能障害は線維化にも関与しており、CKD/CVDの有望な治療標的病態である。



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14件)

Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. Kadoya H, Satoh M, Kashihara N. 他3名 FASEB J. 2015 [Epub ahead of print] <http://www.fasebj.org/content/early/2015/06/08/fj.15-271734.long> 査読有

Relationship between vascular function indexes, renal arteriosclerosis, and renal

clinical outcomes in chronic kidney disease. Namikoshi T, Fujimoto S, Kashihara N, 他5名 Nephrology (Carlton). 2015 [Epub ahead of print] doi: 10.1111/nep.12483. 査読有

Deficiency of endothelial nitric oxide signaling pathway exacerbates peritoneal fibrosis in mice. Kadoya H, Satoh M, Kashihara N, 他2名. Clin Exp Nephrol. 2014 [Epub ahead of print]

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10157-014-1029-3> 査読有

Combinations of olmesartan and a calcium channel blocker or a diuretic in elderly hypertensive patients: a randomized, controlled trial. Ogihara T, Saruta T, Rakugi, Kashihara N, 他19名. COLM Investigators. J Hypertens. 2014;32(10):2054-63 doi: 10.1097/HJH.0000000000000281. 査読有

Angiotensin II regulates islet microcirculation and insulin secretion in mice. Ihoriya C, Satoh M, Kuwabara A, Sasaki T, Kashihara N. Microcirculation. 2014;21(2):112-23. doi:10.1111/micc.12094. 査読有

Hypertension promotes islet morphological changes with vascular injury on pre-diabetic status in SHRsp rats. Satoh M, Haruna Y, Kashihara N, 他4名. Clin Exp Hypertens. 2014;36(3):159-64 doi: 10.3109/10641963.2013.804539. 査読有

Maintenance of endothelial guanosine triphosphate cyclohydrolase I ameliorates diabetic nephropathy. Kidokoro K, Satoh M, Channon KM, Yada T, Sasaki T, Kashihara N. J Am Soc Nephrol. 2013;24(7):1139-50. doi: 10.1681/ASN.2012080783. 査読有

Erythropoietin-producing tubercle granuloma in a hemodialysis patient. Satoh M, Kashihara N, 他3名 BMC Nephrol. 2013 21;14:91. doi: 10.1186/1471-2369-14-91. 査読有

Selective estrogen receptor modulation attenuates proteinuria-induced renal tubular damage by modulating mitochondrial oxidative status. Nishi Y, Satoh M, Kashihara N, 他5名. Kidney Int. 2013;83(4):662-73 doi: 10.1038/ki.2012.475. 査読有

Angiostatin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. Satoh M, Kidokoro K, Kashihara N, 他6名. Lab Invest. 2013;93(3):334-43. doi: 10.1038/labinvest.2012.171. 査読有

Establishment of a blood purification system for renal failure rats using small-size dialyzer membranes. Yorimitsu D, Satoh M, Kashihara N, 他5名. Ther Apher Dial. 2012;16(6):566-72 doi:

10.1111/j.1744-9987.2012.01091.x. 査読有
Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Am J Physiol Renal Physiol. 2012 15;303(12):F1641-51. doi: 10.1152/ajprenal.00460.2012. 査読有

[Internal medicine and neurological disease: progress in diagnosis and treatment. Topics: IV. Chronic kidney disease (CKD) and cerebrovascular diseases]. Kashihara N. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2012 10;101(8):2195-203 https://www.jstage.jst.go.jp/article/naika/101/8/101_2195/_pdf 査読無

Tacrolimus induces glomerular injury via endothelial dysfunction caused by reactive oxygen species and inflammatory change. Kidokoro K, Satoh M, Kuwabara A, Kashihara N,他5名 Kidney Blood Press Res. 2012;35(6):549-57. doi: 10.1159/000339494. 査読有

〔学会発表〕(計 45 件)

In Vivo Serial Multiphoton Imaging of the Early Changes in Glomerular Structure and Function in Nephrotic NEP25/Podocin-Confetti Mice. Kidokoro K, Burford JL, Matsusaka T, Kashihara N, Peti-Peterdi J. ASN 2014 2014.11.15 (Philadelphia, PA, USA)

Klotho Overexpression Attenuates Peritoneal Fibrosis via Suppression of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Mice. Kadoya H, Satoh M, Kashihara N,他 3 名 ASN 2014 2014.11.15 (Philadelphia, PA, USA)

Low-Dose Colchicine Treatment Attenuates Renal Fibrosis in Mice Unilateral Ureteral Obstruction. Itano S, Satoh M, Kashihara N,他 4 名 ASN 2014 2014.11.15 (Philadelphia, PA, USA)

Enhancement of Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inducing Cell Cycle Arrest at the G2/M Phase in Tubular Epithelial Cells. Satoh M, Kashihara N, 他 5 名 ASN 2014 2014.11.14 (Philadelphia, PA, USA)

Activation of eNOS/NO Signaling Attenuates Renal Interstitial Fibrosis in Mice by the Increase of β -Catenin Degradation. Kadoya H, Satoh M, Kashihara N,他 3 名 ASN 2014 2014.11.14 (Philadelphia, PA, USA)

Rosuvastatin Activates Transcription Factor Nrf2 through p21cip1 Expression and Prevents Albuminuria through Preservation of Glomerular Endothelial Integrity in AKITA Diabetic Mice. Ihoriya

C, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N. ASN 2013 2013.11.9 Georgia World Congress Center (Atlanta, USA)

Comparison of Combination Therapy with Irbesartan/Amlodipine and Irbesartan/Cilnidipine for Attenuation of Albuminuria in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. Satoh M, Nishi Y, Kadoya H, Sasaki T, Kashihara N. ASN 2013 2013.11.9 Georgia World Congress Center (Atlanta, USA)

T Type Ca-Channel Blocker Exerts Anti-Albuminuric Effect through Amelioration of eNOS Uncoupling in Hypertensive Kidney Disease Model. Itano S, Kidokoro K, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N. ASN 2013 2013.11.7 Georgia World Congress Center (Atlanta, USA)

Implication of Inflammasome Activation via Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Development of Renal Interstitial Fibrosis Induced by Aldosterone. Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N. ASN 2013 2013.11.7 Georgia World Congress Center (Atlanta, USA)

Rosuvastatin Activates Transcription Factor Nrf2 and Prevents Albuminuria through Preservation of the Glomerular Endothelial Integrity in Akita Diabetic Mice. Ihoriya C, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N. ASN 2012 2012.11.3 (San Diego, USA)

その他 WCN2013 5 件, ASN2012 6 件, 第 57 回日本腎臓学会学術総会 13 件, 第 56 回日本腎臓学会学術総会 11 件

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.kawasaki-jinzo.net/>

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

佐藤 稔 (SATO MINORU)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70449891

春名 克祐 (HARUNA YOSHISUKE)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40341094

桑原 篤憲 (KUWABARA ATSUNORI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50368627