

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09297

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸時の低酸素状況における腎脂質応答の検証

研究課題名(英文) Pathophysiological role of kidney in systemic oxidative stress during chronic intermittent hypoxia.

研究代表者

小林 敬 (KOBAYASHI, TAKASHI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70459056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時無呼吸症候群(SAS)を模した慢性間欠的低酸素(CIH)モデルにおいて、CIHは直接腎交感神経活性を亢進し、その下流でレニンアンギオテンシン(RAS)の活性化、酸化ストレスの亢進、血管内皮障害を惹起し、高血圧の発症・進展に寄与することが考えられた。腎交感神経の遮断は、CIHで増強したこれらの変化を抑制することが明らかとなった。一方、肝臓型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は酸化ストレスの軽減に役立っていると示唆され、将来の臓器障害の発生を抑制する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Present study demonstrated that chronic intermittent hypoxia (CIH) -mediated renal sympathetic nerve activation is involved in increased systemic oxidative stress, renin angiotensin system (RAS) activation, and endothelial dysfunction, and therefore contributing to the development of hypertension. These deleterious effects by CIH were completely blocked by renal denervation (RD) treatment. On the other hand, Liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP) overexpression markedly reduced systemic oxidative stress, while RAS and blood pressure levels were not altered in this model during the observation periods. RD as well as L-FABP overexpression could be a novel therapeutic strategy to prevent the development of hypertension and ameliorate oxidative stress in patients with SAS.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：酸化ストレス 睡眠時無呼吸症候群 間欠的低酸素 腎交感神経 高血圧 レニンアンギオテンシン L-FABP

1. 研究開始当初の背景

高血圧は日本・世界において最も頻度の高い疾患の一つであるが、様々な薬剤の研究・開発にもかかわらず、依然治療抵抗性高血圧の頻度が少なくない。また血管合併症である脳血管障害、心疾患、腎疾患は ADL、QOL を著しく損なう重大な問題である。降圧治療に対する抵抗性の原因は様々であるが、腎交感神経活動の亢進が重要な要因の一つと考えられている。

睡眠時無呼吸症候群(SAS)は、心血管病のリスクを増加させ生命予後を悪化させる疾患であり、一般人口では数%の有病率であるのに対し、保存期慢性腎臓病(CKD)患者では65%と高い有病率である。SASの病態として、慢性間欠的低酸素(CIH)状態による交感神経緊張やレニン-アンジオテンシン(RAS)系の亢進に加え、酸化ストレスや炎症に起因する慢性の血管内皮機能障害が生じると考えられており、酸化ストレスマーカーの変動が報告されているほか、SASがCKDの発症や進行の危険因子である可能性も議論されている。

また近年、難治性高血圧に対する腎交感神経除神経(RD)が注目されており、臨床応用が開始されている。また、モデルマウスを用いた様々な基礎実験により高血圧や脳卒中のほかSASを改善するという報告もされており、交感神経や酸化ストレスの関与する病態解明に寄与している。

一方、肝臓型脂肪酸結合タンパク(L-FABP)は、肝臓、腸および腎臓の近位尿細管細胞質に存在する分子量約14Kdの脂肪酸結合蛋白である。腎臓においてL-FABPは、アルブミンと結合した遊離脂肪酸が尿細管細胞に取り込まれた際に、遊離脂肪酸と結合し細胞内小器官へ転送することで酸化を促進する。それだけではなく、酸化ストレスにより生じる過酸化脂質と強く結合し、細胞外へ排出することにより、腎保護的に働くと考えられている。我々はL-FABPの腎での抗酸化作用に以前より注目し、様々な腎疾患での保護作用を報告してきた。

2. 研究の目的

SAS病態(CIH負荷)における高血圧発症への、交感神経、腎内の酸化ストレスの関与を明らかにするために、腎交感神経除神経と、L-FABPのTgマウスを用いて検証した。

3. 研究の方法

手技1: CIH負荷

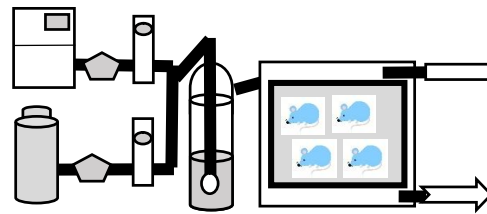


図1 慢性間欠的低酸素装置
コンプレッサーにて圧縮した空気と窒素ガスを交互にチャンバー内に流入した。

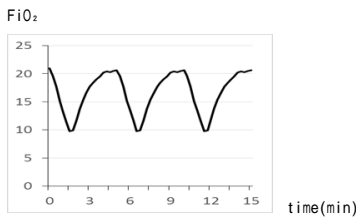


図2 オキシメーター
90秒で急激にFiO₂21から10%への減少し、再呼吸を模して3.5分かけて再びFiO₂21%に戻した。この繰り返しをマウスの睡眠時間と考えられる明期に1日8時間、4週間継続した。今回これをSAS病態を模したCIHモデルとして使用した。

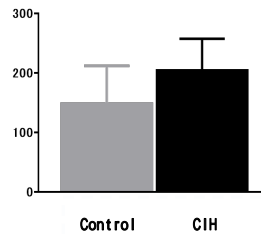


図3 尿中アルビウムの濃度 (ng/day)
交感神経活性の指標である、尿中アルビウムの濃度の上昇(P<0.05)がみられた。

手技2: RD処置



- 腎動脈
- 腎静脈
- リンパ管
- 腎交感神経

図4 腎交感神経

顕微鏡下で腎動静脈周囲を剥離し、腎交感神経を手動的に切断し、フェノールを塗布する。

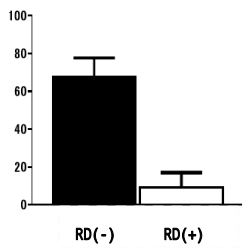


図5 腎組織レニン濃度 (ng/g wet tissue) RD 処置により腎組織レニン濃度の著明な減少 ($P < 0.01$) を確認し、処置の成否を確認した。

野生型マウス (WT) 及び L-FABP Tg マウス (LFTg) にコントロール (CONT) 群、CIH のみ負荷した (CIH) 群、また CIH に加えてさらに RD を前処置した (RD/CIH) 群を設定した。

4. 研究成果

WT マウス

■ CONT ■ CIH ▨ RD/CIH

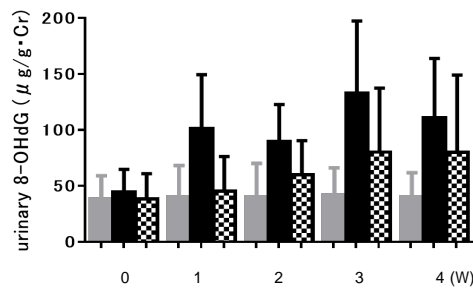


図6 尿中 8-OHdG 全身性酸化ストレスのマーカーとされている 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の尿中排泄レベルは、CIH 負荷により有意に増加 (CONT vs CIH : $P < 0.001$) し、RD により抑制 (CIH vs RD/CIH week1 : $P < 0.01$ week2/3 : $P < 0.05$) されることが観察された。

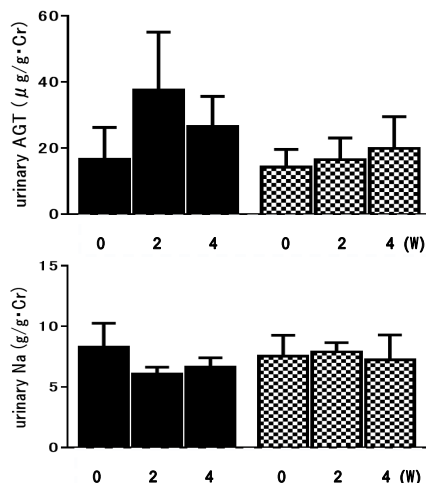


図7 (上)尿中 AGT (下)尿中 Na

腎内 RAS 活性のバイオマーカーであるアンギオテンシノーゲン (AGT) の尿中排泄レベルは、CIH 負荷によって顕著に増加 (CIH week0 vs week2 : $P < 0.05$) し、RD でほぼ完全に抑制 (CIH vs RD/CIH week2 : $P < 0.05$) された。この結果と一致して CIH 負荷で尿中 Na 排泄レベルは減少 (CIH week0 vs week2 : $P < 0.05$) し、RD により対照レベルにまで (CIH vs RD/CIH week2 : $P < 0.001$) 戻った。

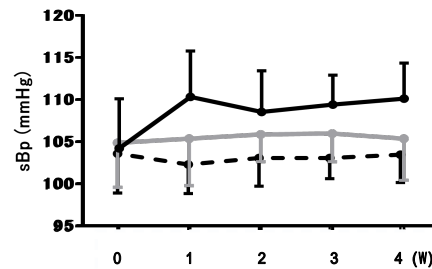


図8 収縮期血圧 CIH 負荷 1 週間後には血圧上昇 (week0 vs week1/2/3/4 : $P < 0.01$) が認められ、RD 処理によりこの変化は完全に抑制 (CIH vs RD/CIH : $P < 0.001$) された。

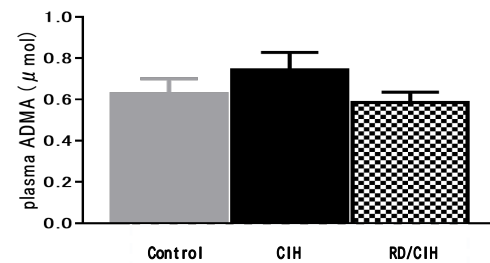


図9 血清 ADMA (Asymmetric Dimethylarginine) 今回作成したモデルでは血圧の上昇以外、明らかな臓器障害は認めなかったが、内皮障害のサロゲートマーカーである ADMA の上昇 (Control vs CIH : $P < 0.01$) が観察され、RD 処理によって抑制 (CIH vs RD/CIH : $P < 0.001$) された。

L-FABP マウス

■ CONT ■ CIH

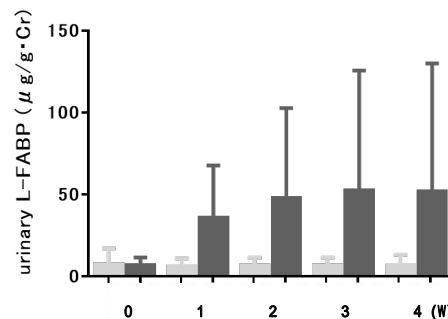


図10 尿中 L-FABP CIH による内因性の L-FABP の動態を確認したところ、アップレギュレート (Control vs CIH)

week1/3:P<0.05 wee2k:P<0.01)されることが確認された。

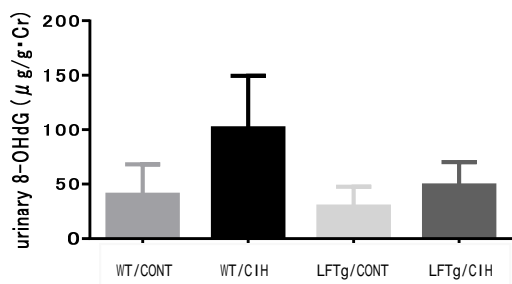


図 11 尿中 8-OHdG

酸化ストレスは、L-FABP の CIH モデルにおいても有意に増加(LFTg CONT vs CIH:P<0.001)したが、WT、LFTg それぞれを比較すると、LFTg マウスでは、尿中 8-OHdG レベルの増加の程度を抑制(WT/CIH vs LFTg/CIH:P<0.01)することがわかった。

今回の観察期間においては RAS や、血圧、RD 処置への影響は観察されなかった。

<考察>

CIH は直接的に腎交感神経活性を亢進し、それに伴い RAS、血管内皮障害、酸化ストレスの亢進が惹起され、高血圧の発症・進展に寄与することが考えられた。逆に RD 処理を行うことによりそれらを軽減できた。一方、L-FABP は酸化ストレスの軽減に役立っていると思われる、将来の臓器障害の発生を抑制する可能性があると考えられた。

<結語>

SAS 病態における、高血圧や心血管病の発症・進展に、腎交感神経の亢進が極めて重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件) 現在投稿中

[学会発表](計9件)

2016 年

腎と脂質研究会、

睡眠時無呼吸時の慢性間欠的低酸素状況における酸化ストレス変化に関する機序の検討 高橋敬子、鈴木祐介、小林敬、菅谷健、西山成、藤澤良秀、堀越哲

日本腎臓学会

慢性間欠的低酸素状況での腎臓を介した酸化ストレス発生機序に関する検討 高橋敬子、小林敬、菅谷健、西山成、藤澤良秀、堀越哲、鈴木祐介

欧州腎臓学会・欧州透析医学会

Pathophysiological role of kidney in

systemic oxidative stress during chronic intermittent hypoxia. Takahashi K, Kobayashi T, Sugaya T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Horikoshi S, Suzuki Y

アジア太平洋腎臓学会議

Pathophysiological role of kidney in systemic oxidative stress during chronic intermittent hypoxia. Takahashi K, Kobayashi T, Sugaya T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Horikoshi S, Suzuki Y

2017 年

血管不全学会

腎交感神経除神経は慢性間欠的低酸素によるレニン-アンジオテンシン系と酸化ストレス亢進を抑制することで睡眠時無呼吸症候群における高血圧発症を抑制する 高橋敬子、上田誠二、小林敬、西山成、鈴木祐介

日本腎臓学会

腎交感神経除神経は慢性間欠的低酸素によるレニン-アンジオテンシン系と酸化ストレス亢進を抑制することで睡眠時無呼吸症候群における高血圧発症を抑制する 高橋敬子、上田誠二、小林敬、西山成、藤澤良秀、菅谷健、堀越哲、鈴木祐介

欧州腎臓学会・欧州透析医学会

Renal sympathetic nerve denervation inhibits chronic intermittent hypoxia-induced hypertension by decreasing renin-angiotensin system and oxidative stress in a mouse model of sleep apnea syndrome Keiko Takahashi, Seiji Ueda, Takashi Kobayashi, Akira Nishiyama, Yoshihide Fujisawa, Takeshi Sugaya, Satoshi Horikoshi, and Yusuke Suzuki

日本高血圧学会

睡眠時無呼吸由来高血圧発症における腎交感神経の役割の解明 高橋敬子、上田誠二、小林敬、西山成、藤澤良秀、本田大介、堀越哲、鈴木祐介

2018 年

国際腎臓学会

Chronic intermittent hypoxia-mediated renal sympathetic nerve activation is involved in the development of hypertension and cardiovascular disease. Keiko Takahashi, Seiji Ueda, Takashi Kobayashi, Akira Nishiyama, Yoshihide Fujisawa, Takeshi Sugaya, Satoshi Horikoshi, and Yusuke Suzuki

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 敬 (KOBAYASHI, Takashi)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号：70459056

(2)研究分担者

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)

順天堂大学 医学部 教授

研究者番号：70372935

菅谷 健 (SUGAYA, Takeshi)

順天堂大学 医学部 非常勤講師

研究者番号：40381561

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)

順天堂大学 医学部 名誉教授

研究者番号：60130077

(4)研究協力者

高橋 敬子 (TAKAHASHI, Keiko)

順天堂大学腎臓内科 非常勤助手