

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12573

研究課題名(和文)腎臓リハビリテーションの新たな展開：多発性嚢胞腎への運動療法の有効性の検証

研究課題名(英文)Effects of chronic exercise in polycystic kidney rats

研究代表者

伊藤 修 (ITO, OSAMU)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00361072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかの腎疾患動物モデルにおいて、長期的運動の腎保護効果が近年明らかになってきたが、本研究では、多発性嚢胞腎モデルのPCKラットを用いて長期的運動の効果を検討した。6週齢の雄PCKラットを非運動群と運動群に分け、運動群にはトレッドミル走行運動を12週間実施した。長期的運動は、尿蛋白、血清クレアチンを低下させ、組織学的には、糸球体硬化や上皮障害のみならず、腎嚢胞形成や腎線維化も軽減した。また、長期的運動は、合併する肝嚢胞形成や肝線維化も軽減した。以上の結果から、PCKラットにおいて、長期的運動は糸球体障害、腎および肝嚢胞形成や線維化の進行を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The present study assessed the effects of chronic exercise on renal function and cystic formation in polycystic kidney disease(PKD) model. Six-week-old male polycystic kidney (PCK) rats were divided into the sedentary group and chronic exercise group (n=10 in each group). Chronic exercise underwent forced treadmill running for 12 weeks. Ex significantly reduced proteinuria and plasma creatinine, and it ameliorated glomerular sclerosis, podocyte injury and cyst formation and interstitial fibrosis not only in kidney but also in liver. These results indicate that chronic exercise ameliorates glomerular injury, cystic formation and fibrosis in the kidney and liver of PCK rats. Chronic exercise may be a new therapeutic approach for PKD.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：リハビリテーション 腎臓 循環器・高血圧 ストレス 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓リハビリテーションは、腎疾患や透析医療に基づく身体的・精神的影響を軽減させ、症状を調整し、生命予後を改善し、心理社会的ならびに職業的な状況を改善することを目的として、運動療法、食事療法と水分管理、薬物療法、教育、精神・心理的サポートなどを行う長期にわたる包括的なプログラムである。腎臓リハの中核である運動療法は、透析患者の運動耐容能、低栄養・炎症・動脈硬化複合症候群、QOLの改善などをもたらす。最近では、保存期の慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)患者においても、適度な運動が運動耐容能や糖・脂質代謝、QOLのみならず、腎機能自体を改善するという報告もある。

申請者らは、これまで種々の腎障害モデルラットを用いて、腎障害の進展機序の解明、運動や各種薬剤による腎障害進展抑制効果、その機序に関する研究を行ってきた。5/6腎摘除腎不全ラットにおいてトレッドミルによる長期的運動が降圧および腎保護効果を有することを世界で初めて明らかにした(J Hypertens 2001、Am J Hypertens 2006)。また、糖尿病性腎症モデルラットにおいては長期的運動が降圧効果を示すことなく腎保護効果を有することも明らかにした(J Hypertens 2008)。一連の研究を通じて、長期的運動の腎保護作用の機序として、糸球体硬化だけでなく、それ以上に腎間質線維化を抑制すること(Am J Hypertens 2006)、腎内酸化ストレスを軽減し、尿細管 eNOS や nNOS 発現を増加することを明らかにした(Clin Exp Pharma Physiol 2013)。

腎障害モデルラットで長期的運動の腎保護効果が認められることから、保存期CKD患者での検証が待たれるところであるが、これまで研究で用いてきた腎障害モデルは腎摘除手術や特殊食餌によって人為的に短期間で腎障害を発症・進展させており、実際の腎障害患者の病態とは異なる点も多い。また、長期的運動による腎保護効果のメカニズムは、長期的運動の腎組織への直接効果ではなく、降圧や糖・脂質代謝改善といった全身性効果を介する二次的な効果である可能性も否定できない。したがって、長期的運動による腎保護効果のメカニズムを解明するためには、腎障害の成因や進展様式がヒトの疾患と共通で、高血圧や糖・脂質代謝異常を併存しない腎障害モデルを用いることによって腎組織への長期的運動の直接効果を検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

主に尿細管間質が病変である常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD)と同様な病態を呈するpolycystic kidney(PCK)ラットの嚢胞増大や腎不全進行への長期的運動の効果を検討し、現在有効な治療法がなく、

60歳までに約半数が透析導入となるPKDへの運動療法の有効性・安全性を検証する。

## 3. 研究の方法

5週齢の雄性Sprague-Dawley(SD)ラットとPCKラットを入手し、1週間の順化飼育後、SDラットを1)対照(Control:Con)群(n=10)とし、PCKラットを2)非運動(Sedentary:Sed)群(n=10)と3)運動(Exercise:Ex)群(n=10)に無作為に分け、12週間飼育した。Ex群には、ラット用トレッドミル装置を用いた走行(28m/分、傾斜角度0°、60分間/日、5日/週)を行った。

体重は毎週測定した。収縮時縮時血圧(systolic blood pressure:SBP)は17週齢時にtail-cuff法にて、無麻酔下で覚醒中に測定した。

運動介入前後となる5,17週齢時の非運動日に、心肺運動負荷試験(cardio pulmonary exercise test:CPX)を実施し、総走行距離と最大酸素摂取量( $VO_{2max}$ )を算出した。すなわち、初期速度を15m/minとし、3分ごとに5m/minずつ漸増するプロトコールで実施し、ラットが走行不能になるまで走行距離と $VO_2$ を計測した。

血漿サンプルは、実験最終日にペントバルビタールナトリウムによる腹腔内麻酔後、腹部大動脈から採血した。遠心後に得られた血漿の一般生化学パラメータは標準的な自動解析法により測定した。

組織重量を測定後、腎臓と肝臓の一部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋した。次いで2 $\mu$ m厚の切片を作製し、糸球体硬化の解析ではperiodic acid-Schiff(PAS)染色、嚢胞の解析ではHematoxylin Eosin(HE)染色、線維化の解析ではPicro-sirius Red(PSR)染色を行い、染色切片を光学顕微鏡で観察し、糸球体硬化指数、嚢胞指数、線維化指数を求めた。

糸球体上皮障害の指標であるデスミン蛋白発現と細胞増殖マーカーであるKi-67陽性細胞をデスミン抗体とKi-67抗体を用いた免疫染色で検討した。染色した切片を光学顕微鏡で観察し、1切片当たり30個の糸球体を評価し、糸球体当たりのデスミン染色陽性領域を算出、細胞500個当たりのKi-67陽性細胞数(Ki-67 labeling index)を算出した。

## 4. 研究成果

(1)体重、血圧、運動耐容能に対する長期的運動の影響

3群の体重は介入期間中徐々に増加した。介入開始2週間後からEx群の体重は他の2群より有意に低かった。介入終了時、Con群に比較してSed群では有意に低く( $p<0.05$ )、Sed群に比較してEx群ではさらに有意に低かった( $p<0.01$ )(Con群,  $546 \pm 13$  g; Sed群,  $508 \pm 8$  g; Ex群,  $426 \pm 4$  g)。

介入終了時のSBPは、各群間において有意差は認めなかった。介入開始時の総走行距離

と  $VO_{2max}$  は、PCK ラットでは SD ラットより有意に低かった ( $p < 0.01$ )。介入前後の比較では、総走行距離は Ex 群で有意に増加したが ( $p < 0.01$ )。その他の群では変化は認めなかった。 $VO_{2max}$  は Con 群、Sed 群で 12 週間後に有意に減少したが ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。Ex 群では有意に増加した ( $p < 0.05$ )。介入終了時の総走行距離は、Sed 群では Con 群より有意に低く ( $p < 0.01$ )。Ex 群では Con 群や Sed 群より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。 $VO_{2max}$  は Sed 群では Con 群より有意に低く ( $p < 0.01$ )。Ex 群では Sed 群より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

### (2)生化学検査

尿蛋白は、Con 群に比較して Sed 群で有意に高く ( $p < 0.05$ )。Ex 群では Sed 群より有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Con 群,  $0.58 \pm 0.11$  mg/day; Sed 群,  $8.30 \pm 1.01$  mg/day; Ex 群,  $3.66 \pm 0.69$  mg/day)。

総コレステロールは、Con 群に比較して Sed 群で有意に高く ( $p < 0.05$ )。Sed 群より有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Con 群,  $67.9 \pm 5.1$  mg/dl; Sed 群,  $148.2 \pm 8.6$  mg/dl; Ex 群,  $114.1 \pm 7.6$  mg/dl)。クレアチニンは、Con 群に比較して Sed 群で有意に高く ( $p < 0.05$ )。Sed 群より有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Con 群,  $0.28 \pm 0.01$  mg/dl; Sed 群,  $0.35 \pm 0.02$  mg/dl; Ex 群,  $0.30 \pm 0.01$  mg/dl)。

### (3)臓器重量

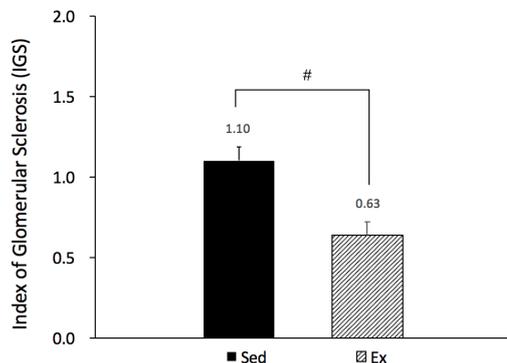
腎重量/体重比は、Con 群と比較して Sed 群で 71%高値であり ( $p < 0.01$ )。Sed 群と比較して Ex 群では有意な変化はなかった。

肝重量/体重比は、Con 群と比較して Sed 群で 73%高値であり ( $p < 0.01$ )。Sed 群と比較して Ex 群で 25%低値であった ( $p < 0.01$ )。

### (4)糸球体硬化と上皮障害

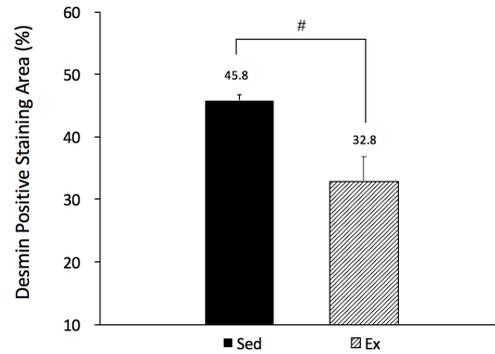
糸球体硬化指数は、Sed 群に比較して Ex 群では有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Sed 群,  $1.10 \pm 0.04$ ; Ex 群,  $0.63 \pm 0.05$ ) (図 1)。

図 1 . 糸球体硬化指数への Ex の効果



デスミン染色陽性領域は、Sed 群に比較して Ex 群では有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Sed 群, 45.8%; Ex 群, 32.8%) (図 2)。

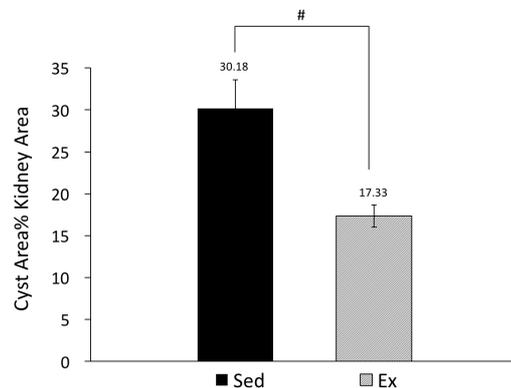
図 2 . デスミン染色陽性領域への Ex の効果



### (5)嚢胞形成と線維化

腎嚢胞は、主に髄質外層に認められ、腎嚢胞面積は、Sed 群に比較して Ex 群では有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (Sed 群, 30.2%; Ex 群, 17.3%) (図 3)。腎線維化は嚢胞の尿細管上皮細胞周囲に認められ、Sed 群と比較して Ex 群では線維化は 67%抑制されていた ( $p < 0.05$ ) (Sed 群, 28.8%; Ex 群, 9.6%)。

図 2 . 腎嚢胞面積への Ex の効果



肝嚢胞面積は、Sed 群に比較して Ex 群では有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (Sed 群, 24.6%; Ex 群, 17.0%)。肝線維化は嚢胞の胆管上皮細胞周囲に認められ、Sed 群と比較して Ex 群では線維化は有意に抑制されていた ( $p < 0.01$ ) (Sed 群, 17.0%; Ex 群, 9.8%)。

### (6)細胞増殖

腎臓における Ki-67 陽性細胞は、嚢胞の尿細管上皮細胞とその周囲に高く発現していた。SD ラットと比較して PCK ラットの Ki-67 陽性細胞は多く認められ、Sed 群と比較して Ex 群では Ki-67 陽性細胞数は 32%減少していた ( $p < 0.05$ ) (Sed 群, 36.8%; Ex 群, 11.5%)。

肝臓における Ki-67 陽性細胞は、嚢胞の胆管上皮細胞とその周囲に高く発現していた。SD ラットと比較して PCK ラットの Ki-67 陽性細胞は多く認められ、Sed 群と比較して Ex 群では Ki-67 陽性細胞数は 32%減少していた ( $p < 0.01$ ) (Sed 群, 20.1%; Ex 群, 13.7%)。

以上の結果から、PCK ラットにおいて、長

期的運動は血圧には影響せず、血清クレアチニンや蛋白尿を減少させる。長期的運動は、組織学的には糸球体硬化や上皮障害を抑制するのみならず、腎や肝の嚢胞形成や線維化を抑制する。この長期的運動の嚢胞形成や線維化の抑制効果の機序の一部には、腎尿細管や肝内胆管周囲の細胞増殖抑制が関与すると示唆される。また、PCK ラットの運動耐容能は SD ラットよりも著明に低下していることも明らかになった。

#### 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5件)

1. 佐藤陽一, 三浦平寛, 仇 嘉禾, 上月正博, 伊藤 修. 多発性肝嚢胞モデルラットの肝病変に対する長期的運動の効果. 運動器リハビリテーション 28: 421-427, 2018 (査読あり)  
DOIなし
2. 伊藤 修. 腎臓と肝臓のリハビリテーション医学・医療. 医学のあゆみ 264: 1247-1251, 2018 (査読なし)  
DOIなし
3. Ito O. Renal rehabilitation in patients with chronic kidney disease. Physic Med Rehabil Res 2(5): 1-4, 2017 (査読あり)  
DOI: 10.15761/PMRR.1000S1002
4. Kohzuki M, Ito O. Chronic Kidney Disease is a New Target of Cardiac Rehabilitation. Cardiovascular Innovations and Applications 2: 387-393, 2017 (査読あり)  
DOI: 10.15212/CVIA.2017.0006
5. 伊藤 修. 腎臓リハビリテーション. The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine 54: 788-792, 2017 (査読なし)  
DOI: 10.2490/jjrmc.54.788

[学会発表](計9件)

1. 三浦平寛, 仇 嘉禾, 佐藤陽一, 上月正博, 伊藤 修. 多発性嚢胞腎モデルラットの腎病変に対する長期的運動の効果. 第8回日本腎臓リハビリテーション学会. 2018年
2. 伊藤 修, 上月正博. 長期的運動による腎保護作用 - 動物実験から. 第8回日本腎臓リハビリテーション学会. 2018年 (招待講演)
3. 伊藤 修, 上月正博. 長期的運動の腎保護効果: 尿細管間質障害の抑制効果. 第8回日本腎臓リハビリテーション学会.

2018年(招待講演)

4. Qui J, Miura T, Sato Y, Kohzuki M, Ito O. chronic exercise improves the progression of renal cyst and podocyte injury in polycystic kidney disease model rats. International Society of Nephrology Frontiers (Tokyo). 2018
5. Sato Y, Miura T, Qiu J, Kohzuki M, Ito O. Effects of long-term exercise on liver cyst complicated polycystic kidney disease. International Society of Nephrology Frontiers (Tokyo). 2018
6. 三浦平寛, 仇嘉禾, 佐藤陽一, 上月正博, 伊藤 修. 多発性腎嚢胞モデルラットの腎病変に対する長期的運動の効果. 第25回嚢胞性腎疾患研究会. 2017年
7. 伊藤 修, 上月正博. 心臓リハビリの運動療法: 動物モデルでの知見から. 第23回日本心臓リハビリテーション学会. 2017年
8. 三浦平寛, 伊藤 修, 坂田佳子, 森 信芳, 上月正博. 多発性嚢胞腎ラットにおける長期的運動の腎保護効果の検討. 第53回日本リハビリテーション医学会(京都), 2016
9. Miura T, Ito O, Komatsu M, Ogawa Y, Muroya Y, Kohzuki M. Effects of exercise training in the kidney of polycystic kidney rats. 10th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine World Congress (Kuala Lumpur) 2016

[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

伊藤 修 ( ITO OSAMU )  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講  
師  
研究者番号：00361072

(2)研究分担者

上月 正博 ( KOHZUKI MASAHIRO )  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70234698

森 信芳 ( MORI NOBUYOSHI )  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講  
師  
研究者番号：50464790

小川 佳子 ( OGAWA YOSHIKO )  
帝京大学・医療技術学部・助教  
研究者番号：90733791

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )