

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08196

研究課題名(和文)フリーラジカル可視化技術を用いた腎・臓器連関機序の解析

研究課題名(英文)Mechanisms of kidney failure-related cognitive decline

研究代表者

大和 真由実(Yamato, Mayumi)

九州大学・薬学研究院・学術研究員

研究者番号：30380695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：種々の疾患の進展において、単一臓器に局限する障害はまれであり、多臓器連関を踏まえた疾患の理解が欠かせないと考えられる。例えば、腎臓病患者では腎機能の低下に相関して認知機能が低下することが示唆されているが、その関連性については未だ不明である。そこで、本研究では、多臓器連関に関わる疾患因子としてフリーラジカルと尿毒症物質に着目し、アデニン摂取腎不全モデルマウスを作成し、腎機能障害に伴う認知機能の低下等脳機能障害の機序を明らかにすることとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、膵臓の病気である糖尿病においては、合併症である腎症からさらには慢性腎不全に移行し、透析が必要となる患者の数が急増する等の問題が生じている。通常、腎臓、脳等の臓器間には密接かつ精巧な機能的連関があり、生体内恒常性が維持されている。しかし、疾患発症時においては、この連関が仇となり合併症を引き起こすものと考えられる。疾患時における他の臓器に与える影響を解明し、負の連関を選択的に断ち切ることは、合併症の予防につながり、さらには合併症治療薬開発等の創薬への応用展開へ重要な役割を果たすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence have suggested that kidney failure links dementia.

However, the underlying mechanism remains unclear. Here we show uremic toxin and free radicals

involvement in brain damage in a kidney failure animal model.

For the induction of kidney failure in mice, C57/BL-6 animals were fed with a 0.25%

adenine-containing diet during a period of 6 weeks. It has been reported that guanidinosuccinic acid (GSA), which is one of urinary toxins, transfers to the brain and causes neurological symptoms such

as epilepsy. In adenine-supplemented mice, GSA was also elevated in the blood and brain of mice.

Furthermore, in the disease model mice, a decrease in pyramidal cell number was observed in the hippocampus CA3 region, and a significant decrease in cognitive function was confirmed in the radial water maze test.

These results suggested that in the adenine-supplemented mice, the uremic toxin GSA produced by renal injury causes cognitive decline.

研究分野：生命物理化学

キーワード：脳機能 酸化ストレス 腎不全

## 1. 研究開始当初の背景

現代は、人口の高齢化、肥満、糖尿病や脂質異常症を有する患者の増加などに伴い、合併症を有する患者が多くなっている。これらの疾患では、単一臓器に限局する障害はまれであり、いずれかの臓器が障害されると、互いの臓器を傷つけあう負の連鎖を形成する。例えば、糖尿病腎症が原因となり透析を開始する患者数が急速に増え、患者個人の生活の質(QOL)の低下だけでなく、医療経済上も極めて重大な問題となっている。糖尿病の進行による合併症を防ぎ、透析治療への移行を抑制するために、種々の治療と自己管理が必要であるが、認知機能の低下により自己管理そのものが困難となり、効果的な薬物療法等が行えないという問題が生じている。また、糖尿病患者における認知症の発症率は、腎症等が進んでいる人にリスクが高いことが知られている。これらの事実から、腎症と認知症の発症・進展に何らかの負の連鎖があることが推測されるが、その詳細なメカニズムについては明らかとなっていない。

腎症により体内に蓄積する尿毒症物質グアニジノコハク酸は、NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体作動薬として、知覚異常やけいれん等の神経症状を呈することが知られている (Acta Neurol Belg. 92, 191-206, 1992)。NMDA 受容体は、記憶や学習に重要な機能を持つ一方、カルシウムの過剰流入、その後のフリーラジカル生成を介した神経細胞死に深く関わることから、この受容体への作用は尿毒症物質による脳障害の機序の1つであると考えられる。

また、認知症をはじめとする脳疾患の発症・進展に関わる因子として、フリーラジカルによる酸化ストレスについての研究が数多く報告されている。例えば、我々は、ニトロキシラジカルを造影剤とし、検出器として電子スピン共鳴法(ESR)を用いた脳イメージングにより、脳疾患モデル動物において、脳内酸化ストレスが亢進していること、それが障害の一因となることを明かにしている。さらに、腎症モデルマウス(5/6腎臓摘出モデル)の脳内において、デオキシグアノシンの酸化により生じる8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG)が蓄積すること、及び短期記憶力の低下が認められることを報告している。これらの結果は、脳疾患モデル動物の疾患メカニズムや、腎症モデルマウスにおける認知機能低下において酸化ストレスが関与することを示唆している。

このような背景を踏まえ、申請者は、腎機能の低下により生体内の尿毒症物質濃度が増加し、脳内において酸化ストレスを惹起し認知機能の低下に関与しているのではないかと仮説を立てた(図1)。神経症状等の自覚症状はなく透析治療には至らないまでも、軽度あるいは中程度に尿毒症物質が増加している状態において、どのようなラジカル種が生成し、どのタイミングで脳障害を引き起こすのか等、詳細なメカニズム明かになれば、有効な治療法・予防法の開発につながると思われる。

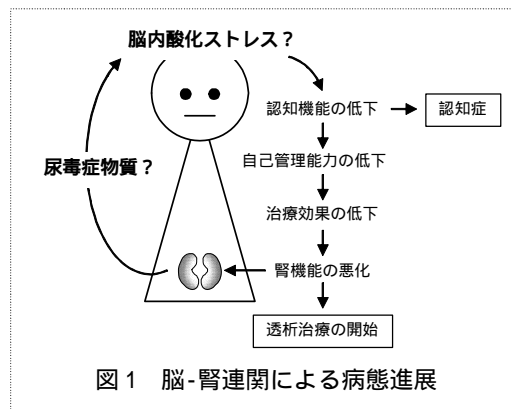


図1 脳-腎連関による病態進展

## 2. 研究の目的

本研究では、臓器連関によって進行する障害の原因物質として、フリーラジカルと尿毒症物質に着目し、腎・脳連関における毒性発現機序を明らかにする。

具体的には、マウスにアデニンを摂取させることで腎不全モデルを作成し、脳機能障害に対するフリーラジカルおよび尿毒症物質の影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 疾患モデルの作成

アデニン摂取腎不全モデルは、高尿酸血症の原因物質である種々のプリン体をラットに摂取させる中で見いだされたモデルであり、血液中の尿素窒素やクレアチニンが高値を示し、時間経過により腎障害から慢性腎不全に進行していくことが知られている(Nakazawa et al. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 28, 519-526, 1982)。本研究においても既報に従い、C56/bl6 マウス(、6週齢)に、アデニン含有(0.25%)食餌を6週間摂取させ腎不全モデルを作成した。

### (2) 組織障害の評価

モデルマウスにおける腎障害は、血液中・尿中のクレアチニン等の測定や組織病的解析により、脳内酸化ストレスは8-OhdGの免疫染色により、グアニジノ化合物の評価は、質量分析法により行った。さらに、脳機能の評価として、短期記憶の評価については、放射状水迷路試験を実施した。

### (3) 培養細胞を用いた検討

グアニジノ化合物による神経障害の機序を明らかにする為に、神経様細胞の分化 PC12 細胞にグアニジノ化合物を添加し、細胞死やその機序について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 腎障害の評価

アデニン摂取腎不全モデルマウスにおいては、対象群と比較して、血漿中クレアチニン及び尿素窒素 (BUN) の有意な上昇が認められた。

本モデルは、アデニン過剰投与により腎組織に 2,8-Dihydroxyadenine の結晶が形成沈着され、炎症、そして線維化を引き起こし腎不全をとることが知られている。そこで、腎臓の組織障害を検討したところ、2,8-Dihydroxyadenine 結晶の沈着、及び結晶周囲の炎症細胞の集積が認められた。さらに、尿管拡張 (Periodic acid-Schiff (PAS) 染色) や、間質の線維化 (Masson trichrome stain (MT) 染色) も観察された (図 2)。

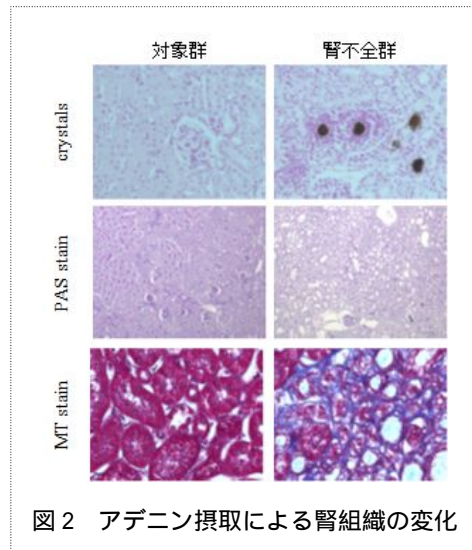


図 2 アデニン摂取による腎組織の変化

### (2) グアニジノコハク酸の検出

尿毒素の一つであるグアニジノコハク酸が、脳へ移行し、てんかんなどの神経症状を惹起することが報告されている。そこで、本モデルマウスにおいて、グアニジノコハク酸が生成するのか、また、生成したとして脳へ移行するのか否かについて検討するために、質量分析法を用いて、その検出を試みた。

図 3 に示すように、アデニン摂取マウスのグアニジノコハク酸は、対象群と比較して、血漿中では約 8 倍、脳内においては約 5 倍有意に上昇した。

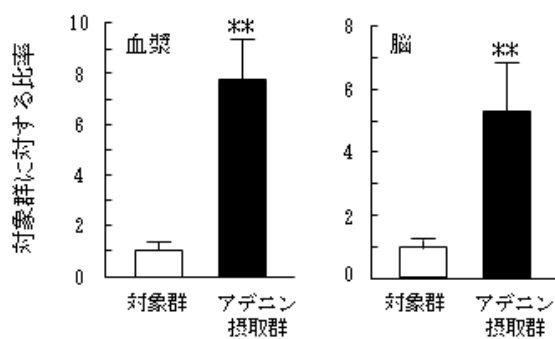


図 3 血漿及び脳内グアニジノコハク酸の評価

### (3) 脳障害の評価

アデニン摂取腎不全マウスでは、海馬 CA1 領域における変化は認められないものの、CA3 領域における錐体細胞数の減少が確認された。また、放射状水迷路試験によって、認知機能が有意に低下していることが明かとなった。海馬の CA1 領域における「場所細胞」が正確な場所情報を伝えるのに必要な「位相歳差」という現象に、CA3 領域からの情報の入力が必要であることが報告されている (Middleton SJ and McHugh TJ. Nat Neurosci., 19(7):945-51, 2016)。本モデルマウスにおいても、CA3 領域が障害を受けることにより、空間認知機能の低下が認められる可能性が示唆された。

### (4) 細胞障害機序の検討

次に、グアニジノコハク酸による神経障害の機序を明らかにする為に、神経様細胞の分化 PC12 細胞にグアニジノコハク酸を添加したところ、濃度依存的に細胞死が引き起こされた。同時に活性酸素を産生していることが明かとなった。加えて、このグアニジノコハク酸による細胞障

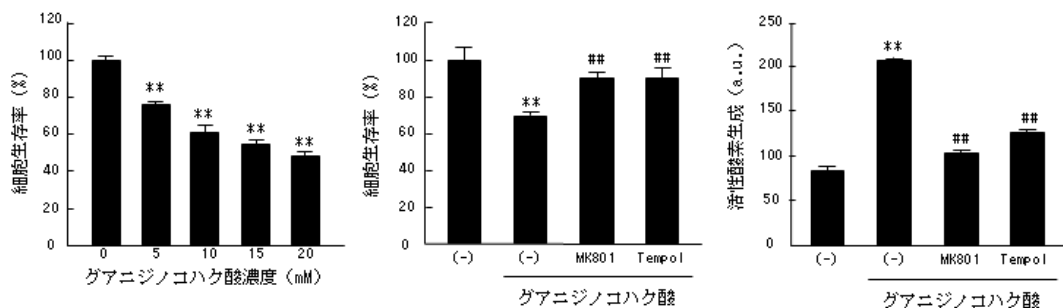


図 4 細胞障害機序の検討

害は、NMDA 受容体アンタゴニスト MK801 又は抗酸化剤である TEMPOL の添加によって抑制された。以上のことから、グアニジノコハク酸は、NMDA 受容体に作用することにより、活性酸素を生成し、細胞障害を引き起こすことが示唆された(図4)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

廣石 将和, 大和 真由実, 松岡悠太, 山田 健一  
腎症モデルマウスにおける脳障害の機序解明  
第72回 日本酸化ストレス学会学術集会(2019年6月27-28日)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。