

令和元年6月21日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09637

研究課題名(和文)メタボリック症候群における脳腎関連メカニズム～AGEs-RAGE系の役割

研究課題名(英文)The mechanism of brain-renal interaction on metabolic syndrome-role of AGEs-RAGE system-

研究代表者

深水 圭 (FUKAMI, KEI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80309781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：今回、脳腎関連におけるAGEs-RAGE系の関与について検討を行った。脳腎関連の一つの促進因子であるaldosterone (aldo)-mineralocorticoid receptor (MR) systemにターゲットを絞り、まずはメタボリック症候群の最も重要な因子であるMRに着目し検討を行った。その結果、MR活性化因子であるDOCAを投与することにより腎臓においてアルブミン尿の出現がみられ、それらは腎障害を伴っていた。RAGEノックアウトマウス、RAGE-aptamerはMRの発現を抑制し、腎組織修復をもたらした。今後はこの現象が脳傷害時にもみられるかの検討が必要と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の現状の問題点として、慢性腎臓病患者の増大、とりわけ透析患者数の増大と、脳卒中罹患の増加がある。脳と腎臓はお互いに連携を取り合っている可能性が示唆されており、今回はAGEs-RAGE系に着目して研究を行った。AGEs-RAGE系の活性化に今回脳傷害にも重要な因子であるMRが関与していることが明らかとなり、AGEs-RAGE-MR系の遮断のために我々はRAGEノックアウトマウス、RAGE-aptamerを使用して検討を行った結果、RAGEを遮断することで腎傷害が著明に改善することを突き止めた。今後は創薬を念頭に脳傷害に対するRAGE-aptamerの効果を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation endproducts (AGEs) stimulate intracellular pathways through the receptor for AGEs (RAGE), which is thought to be involved in the brain-kidney injury. Uninephrectomized 8-week-old C57Bl/6J male mice were divided into three groups; 4% salt diet (control), 4% salt diet with DOCA (50mg), and DOCA with hydralazine (Hyd). Administration of DOCA significantly increased UAE independent of blood pressure. Renal RAGE protein expression and plasma carboxymethyl lysine (CML) levels were elevated in DOCA-induced HN mice. RAGE was co-localized with MR in podocytes by immunohistochemical analysis. DOCA-induced increase in UAE, renal ROS generation, RAGE expression, plasma CML levels, GTP-bound Rac1 activation, and MR overexpression were significantly inhibited by the administration of RAGE-aptamer. AGEs-RAGE axis and Rac1-MR pathway may be correlated with each other, which could lead to kidney injury in HN. Next we investigate the role of AGEs-RAGE system on brain-kidney injury.

研究分野：腎臓病

キーワード：AGEs RAGE AGEs-RAGE 高血圧症 aptamer

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の欧米化により、若い世代の肥満、耐糖能異常が問題となっている。オランダの報告では、飢餓状態が腎臓の発育を遅延させ、後の腎障害に關与することが報告されている。さらに、オーストラリアのアポリジニにおける観察研究では低体重児は、後に尿アルブミン排泄が増加すると報告されており(Hoy WE et al. Lancet.1998)、妊婦の食事が出生児の将来のメタボリック症候群・腎障害発症に重要であることが報告されている(Armitage et al. J Physiol 2005)。事実、我々は雌ラットに high-fructose, high-fat を負荷すると、仔のポドサイト障害が誘発され、アルブミン尿が発症する事実を突き止めている。この事実は、まさに母体の環境が、後の子の腎症発症に密接に關与するということを示唆している。近年、脳腎連関という概念が提唱されている。すなわち、慢性腎臓病(CKD)は後の認知症発症の強力なリスクファクターであり、糖尿病を合併しているとそれは顕著となる。Strain vessel hypothesis がそのメカニズムを説明しうる有力な仮説であるが、メタボリック症候群などのCKD にセカンドヒットとして慢性的な刺激が腎臓に加わった際の脳の反応については不明である。我々は老化物質である終末糖化産物である AGEs とその受容体である receptor for AGEs(RAGE)がそこに重要な役割を担っていると考えている。我々は AGEs の蓄積や RAGE を介した生物化学的反応が、糖尿病性血管合併症の発症・進展に重要な働きを担っていることを報告してきた。事実、AGEs は RAGE を介し、renin-angiotensin system (RAS), TGF- β -Smad signaling を活性化し、メサンギウム領域におけるマトリックスの増加や、細胞周期蛋白の調節に深く關与していることを解明した(Fukami et al. Kidney Int. 2004)。さらに AGEs-RAGE 系の活性化は、細胞内酸化ストレスを活性化し、レドックス感受性シグナル伝達物質である NF- κ B を介して腎症進展に關与することを突き止めている(Fukami et al. Curr Pharm Des. 2008)。我々は、この反応が脳腎連関の病態に深く關与している可能性について探求したいと考えている。すなわち CKD に対するセカンドヒットとしての慢性の変化の主体であるのは AGEs-RAGE であり、それぞれ中心的な役割を担っていると考えられる。以上より、CKD における AGEs-RAGE による慢性変化が脳に与える影響が、脳腎連関の主体である可能性を検討することとした。

2. 研究の目的

欧米化する食事による母体環境変化が後の新生仔の脳障害を惹起する機序に、AGEs が關与し、次世代新規分子標的治療薬であるアプタマーが腎・脳障害を改善しうるかについて解明することを目的とした。我々はすでに high-fructose, high fat diet が後の仔のポドサイト障害-アルブミン尿発症を惹起することを確認していた。しかしながら、母体環境が仔の脳腎連関にどのように影響するか、さらには AGEs-RAGE 系がいかに關与するかは不明である。以上を明らかにすべく研究を立案した。

3. 研究の方法

6週令雌 SD ラットに 60%HFD + 0.1mg/ml Glucose + 0.1mg/ml Fructose(HFD+G+F)を与え、10週間飼育する。コントロールとして同週令の雌 SD ラットに通常餌を与えた。飼育 10週間後(16週令)における体重・血圧(tail-cuff method)、血糖を測定し、代謝ケージにて蓄尿し、尿アルブミン排泄量、酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG 濃度を ELISA にて測定した。その後、16週令(雌と同週令)の健康雄と交配し、妊娠後約 1 か月で新生仔が出生した。妊娠・出産後も臨床に即した形で HFD+G+F を与えた。新生仔は雄・雌両者をエントリ し、20週経過を追った後に、代謝ケージで採尿、sacrifice し、血漿、血清、脳、腎臓を採取、4%ホルマリン固定と各種臓器凍結保存を行った。新生仔は雄雌それぞれ 4pattern に分け、それぞれ NF/NF 群、HF+G+F/NF 群、NF/HF+G+F 群、HF+G+F/HF+G+F 群に群別し解析を行った。次に 8週令雄 C57BL/6J を片腎摘し、高食塩食+DOCA (DOCA/salt 群)、ヒドララジン(hyd)、スピロノラクトン (spiro)、RAGE への結合を阻害する核酸化合物 RAGE-DNA-aptamer (RAGE-apt) 投与群を作製した。RAGE-KO マウスを使用し、同様に DOCA/salt を負荷することで腎障害や脳傷害の進展が起きるかを検討した。

4. 研究成果

HFD+G+F を与え、交配をかけた仔の腎、脳の組織を検討したが、有意な AGEs-RAGE 系の動きと脳の変化を見出すことはできなかった。メタボリック症候群の重要なコンポーネントである高血圧に着目して腎障害進展の機序を明らかにすべく、脳腎連関の一つの促進因子である aldosterone (aldo)-mineralocorticoid receptor (MR) system にターゲットを絞り検討を行った。その結果、MR 活性化因子である DOCA+4%食塩を投与することにより腎臓においてアルブミン尿の出現がみられ、それらは腎障害を伴っていた。血圧を下げたヒドララジンでは腎傷害の改善は見られなかった。RAGE ノックアウトマウス、RAGE-aptamer は MR の発現を抑制し、腎組織修復をもたらした。今後はこのモデルにおいて脳傷害がみられるかについての検討が必要と思われる。

In vitro の研究としてヒト近位尿細管細胞を使用し、糖尿病状態を模倣する実験を行った。正常グルコース濃度(5mM)、高濃度グルコース(30mM)にて細胞を刺激し、RAGE を含めたサイトカインの動態を詳細に観察した。脳腎に効果的と考えられている SGLT2 阻害薬を使用することに

より、それら尿細管障害が改善するかについても同様に検討した。その結果、正常血糖状態と比較し、炎症性サイトカインである MCP-1 の発現は有意に上昇し、それらは SGLT2 阻害にて改善した。RAGE の発現については HG にて上昇しなかったものの、SGLT2 阻害によりさらに低下を認め、高血糖に依存しない SGLT2-RAGE interaction の存在が確認された。さらに、NADPH oxidase のコンポーネントである NOX5 の発現調節を観察したところ、同様に HG にて上昇を認め、それらは SGLT2 阻害薬によって有意に改善を認めている。以上より、脳腎関連促進の因子として RAGE と SGLT2 が関与し、HG における尿細管細胞障害を惹起している可能性が考えられる。一連の糖毒性における腎傷害が、脳傷害にいかに関与するかについて、すなわち脳腎関連が実際に高血糖を介した SGLT2-RAGE 系によってもたらされるかについて、今後のさらなる詳細な検討が必要と思われる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Yamada-Obara N, Yamagishi SI, Taguchi K, Kaida Y, Yokoro M, Nakayama Y, Ando R, Asanuma K, Matsui T, Ueda S, Okuda S, **Fukami K**. Maternal exposure to high-fat and high-fructose diet evokes hypoadiponectinemia and kidney injury in rat offspring. *Clin Exp Nephrol*. 20:853-861, 2016

Tahara A, Tahara N, Yamagishi SI, Honda A, Igata S, Nitta Y, Bekki M, Nakamura T, Sugiyama Y, Sun J, Takeuchi M, Shimizu M, Yamazaki H, **Fukami K**, Fukumoto Y. Ratio of serum levels of AGEs to soluble RAGE is correlated with trimethylamine-N-oxide in non-diabetic subjects. *Int J Food Sci Nutr*. 23:1-8,2017

Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, Nakamura N, **Fukami K**, Yamagishi SI. RAGE-Aptamer Blocks the Development and Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 66,6:1683-1695,2017

Nakamura N, Matsui T, Ishibashi Y, Sotokawauchi A, **Fukami K**, Higashimoto Y, Yamagishi SI. RAGE-aptamer Attenuates the Growth and Liver Metastasis of Malignant Melanoma in Nude Mice. *Mol Med*. 2017 Nov 6;23. doi: 10.2119/molmed.2017.00099.

Taguchi K, Yamagishi SI, Yokoro M, Ito S, Kodama G, Kaida Y, Nakayama Y, Ando R, Yamada-Obara N, Asanuma K, Matsui T, Higashimoto Y, Brooks CR, Ueda S, Okuda S, **Fukami K**. RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice. *Sci Rep*. 8;8(1):2686, 2018

Advanced glycation end products evoke inflammatory reactions in proximal tubular cells via autocrine production of dipeptidyl peptidase-4. Kaifu K, Ueda S, Nakamura N, Matsui T, Yamada-Obara N, Ando R, Kaida Y, Nakata M, Matsukuma-Toyonaga M, Higashimoto Y, **Fukami K**, Suzuki Y, Okuda S, Yamagishi SI. *Microvasc Res*. 26;120:90-93, 2018

Nakamura K, Sakaguchi M, Matsubara H, Akagi S, Sarashina T, Ejiri K, Akazawa K, Kondo M, Nakagawa K, Yoshida M, Miyoshi T, Ogo T, Oto T, Toyooka S, Higashimoto Y, **Fukami K**, Ito H. Crucial role of RAGE in inappropriate increase of smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*. 4;13:e0203046, 2018

Fujisawa H, Nakayama Y, Ueda K, **Fukami K**. Role of AGEs-RAGE system in CKD-MBD. *Clin Calcium*. 29:193-198, 2019

〔学会発表〕(計 3 件)

Fukami K. AGEs-RAGE system as a novel therapeutic target for the development and progression of diabetic nephropathy. JSN 2016

Fukami K. AGEs-RAGE system as a promising therapeutic target for diabetic kidney disease. ERA-EDTA 2017

Fukami K. AGEs-RAGE-MMP system as a therapeutic target in experimental renal fibrosis. JSN 2019

〔図書〕(計2件)

田口顕正、甲斐田裕介、深水 圭: AGEs-RAGE 系と血管障害. 血管,39:107-116,2016

甲斐田裕介、深水 圭: 女性医療のすべて AGEs と腎機能. P135-141, メディカルレビュー社,2016, 東京(分担執筆)

〔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:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、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。