

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590959

研究課題名（和文）腎不全による記憶障害に対する酸化ストレスの影響および苔状線維の変化と EPO の効果

研究課題名（英文）Carbamylated erythropoietin (CEPO) and Tempol inhibits cerebral oxidative stress and improves spatial memory dysfunction in experimental uremic mice

研究代表者

鶴屋 和彦（TSURUYA GAZUHIKO）

九州大学・医学研究院・寄付講座教員

研究者番号：20372740

研究成果の概要（和文）：尿毒症性脳障害の一因は，酸化ストレスによる神経細胞傷害であり，これにより学習・記憶障害に至ると考えられる。造血作用のない Carbamylated erythropoietin (CEPO) と抗酸化剤 Tempol (TMP) は，この機序を抑制することにより脳保護効果を発揮していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The present study provides evidence that Carbamylated erythropoietin (CEPO) and Tempol (TMP) significantly improve uremia-induced cognitive dysfunction. In addition, the results suggest that CEPO and TMP may be useful in treating cognitive dysfunction associated with CKD

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1500000	450000	1950000
21 年度	1400000	420000	1820000
22 年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：慢性腎不全，尿毒症性脳症，酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全患者は記憶や学習などの高次脳機能が障害されているが，その病態については不明な点が多い。近年，慢性腎不全の脳機能障害において活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）の関与が指摘されている。Yeら（J Clin Invest 1997）は，5/6腎摘（慢性腎不全）モデルラットの脳で，一酸化窒素（NO）合成酵素遺伝子の発現亢進とNOの増加が見られることを示した。また，Dengら（J Am Soc Nephrol 2001）は，5/6腎摘ラットの脳でスーパーオキシド（O<sub>2</sub><sup>-</sup>）とNOの反応産物であるパーオキシナイトライト（ONOO<sup>-</sup>）が増加し，抗酸化剤により

減少することを報告した。

動物モデルにおいて，遺伝子組換えヒトエリスロポエチン（rHuEPO）の有効性が数多く報告されている。EPOの脳保護作用の機序として，抗酸化作用が指摘されており，ROS産生（Sakanaka M et al: Proc Natl Acad Sci 1998）を抑制することが明らかにされている（Hayashi T et al: Brain Res 1999, Rao AM et al: J Neurochem 2000）。高次脳機能の改善についても，Abdullah Kら（Behav Brain Res 2004）は，脳虚血モデルラットにrHuEPO投与（1000U/kg 1回投与）を行い，投与後3週，20週の水迷路テストの成績を比較したところ，非投与群と比して有意に高値

であったと報告した。また、近年では、造血作用のない Carbamylated erythropoietin (CEPO) による臓器保護作用の報告も散見される。

## 2. 研究の目的

CRF の脳における酸化ストレス障害と CEPO の脳保護作用の機序解明を目的として以下の実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 腎不全マウス作成

マウス (C57BL/6J 雄, 8 週齢) に片腎摘および対側腎上下極 1/3 を部分焼灼し、腎不全モデルマウスを作製した。全てのマウスは標準の実験ケージで個々に飼育され、米国国立衛生研究所 (NIH, Bethesda, MD) の実験動物の管理と使用の手引きに概説された理念に基づいて取り扱われた。

マウスに 50 mg/kg のペントバルビタール (ダイナボット社, 大阪) を腹腔内投与して麻酔をかけ、左背部を切開し、左腎動静脈を確保した。4-0 絹糸で結紮後切離し、左腎を摘出した。次に、右背部を切開して右腎を露出し、右腎の上極、下極を焼灼した。出血に対しては、用手圧迫で止血を行った。偽手術は、皮膚切開後、腎の露出まで行い、皮膚を縫合した。

水道水の飲水投与による偽薬投与対象群 (Cont-Veh 群), CEPO (5 g/kg/week) 投与対象群 (Cont-CEPO 群), Tempol (3mM) 飲水投与対象群 (Cont-TMP 群), 偽薬投与腎不全群 (CKD-Veh 群), CEPO 投与腎不全群 (CKD-CEPO 群), Tempol 投与腎不全 (CKD-TMP) の 6 群を作製した。8 週間の経過観察後にマウスの脳機能を評価するために、放射状水迷路試験 (RAWM 試験) を施行した。脳組織の酸化ストレスを評価するために脳海馬における 8 オキシデオキシグアノシン (8-OHdG; 酸化 DNA 損傷マーカー) の免疫組織化学染色, 神経細胞の観察のためヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

### (2) 脳組織の薄切片作製

深麻酔下 (ペントバルビタール 50 mg/kg 腹腔内投与) で、マウスを開腹した後、開胸し、灌流用金属針を左心室より上行大動脈に穿刺固定した。まず、ヘパリン入り (10 単位/ml) リン酸緩衝液 (PBS) を 20 ml 注入し、続いて 4% パラホルムアルデヒド 20 ml を還流した。灌流後、脳ペラを用いて大腦を頭蓋から摘出した。摘出脳は、10%ホルマリンに浸漬固定した (4°C, 一晩)。その後、6 mm 幅に切断し、エタノール、クロロホルムで脱水、置換後、パラフィンで包埋した。回転式マイクロトーム (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、海馬が含まれるように、Bregma より 1~2 mm の部位を 4 μm 厚の薄切片を作成した。

### (3) 免疫組織化学染色

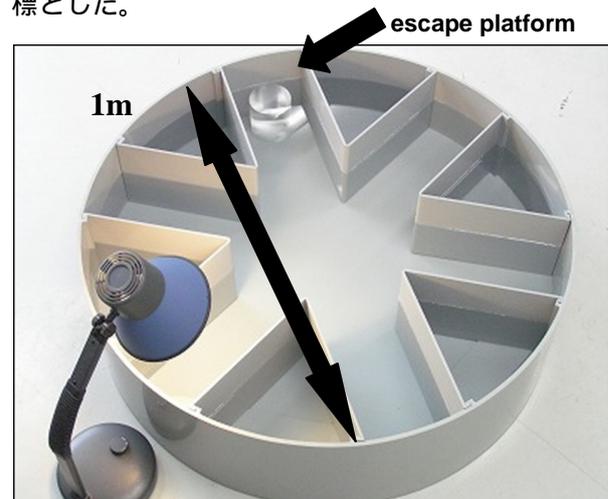
パラフィン包埋したブロックを 4 μm に薄切り、シランコートされたスライドガラスに載せ、脱パラフィン後に脱水した。免疫組織化学染色の操作の各ステップは、温度を表記している箇所以外の部分は、全て室温で行った。8OHdG の染色は、以下のように行った。抗原不活化のため、プロテイナーゼ K (Sigma, St. Louis, MO) および塩酸による前処理を行った。まず、脱パラフィン後の切片をプロテイナーゼ K 溶液 (10 μg/ml) に 7 分間、続いて 4N 塩酸溶液に 20 分間浸漬した。次に、0.3% 過酸化水素-メタノールと 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。5% 仔牛血清アルブミン (BSA, Sigma) を含む PBS 液に溶解した 5% スキムミルク (明治乳業, 東京) 溶液で 30 分間インキュベートして抗体の非特異的反応を抑制した後、抗 8-oxo-dG マウスモノクローナル抗体 (2 μg/ml, JaICA, 静岡) と、4°C で一晩反応させた。0.1% Triton X (Amresco, Solon, OH) -PBS 液で洗浄し、ビオチン化ウサギ抗マウス抗体 (10 μg/ml, ニチレイ, 東京) と 30 分間反応させた。

### (4) 神経細胞の評価

HE 染色を行った標本を光学顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE E800M 東京) を用いて、海馬の変性神経細胞数を ×100 および ×400 倍視野で計測した。

### (5) 放射状水迷路試験 (RAWM 試験)

下図のような放射状水迷路を用い、毎日ゴールである escape platform の位置を変更しながら各群 4 日間のトレーニングを行い、5 日目に escape platform への到達回数を計測し、エラー回数を高次脳機能・記憶能力の指標とした。

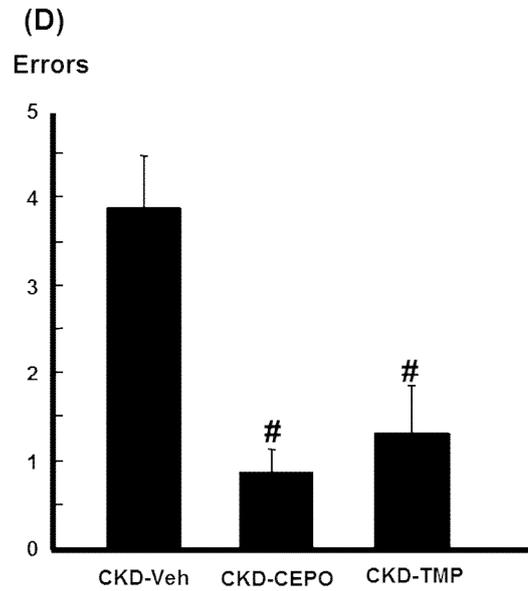
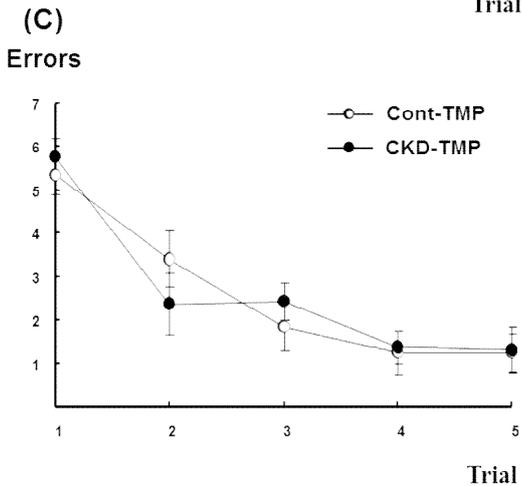
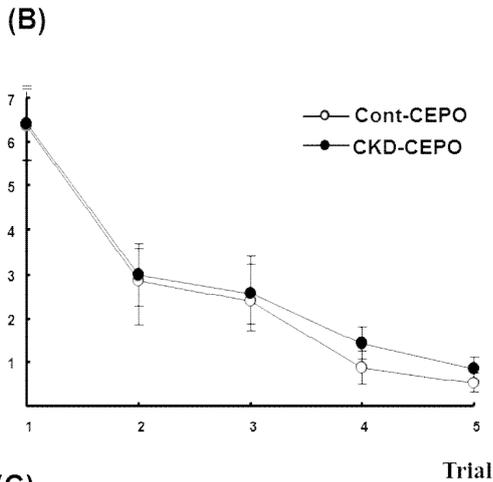
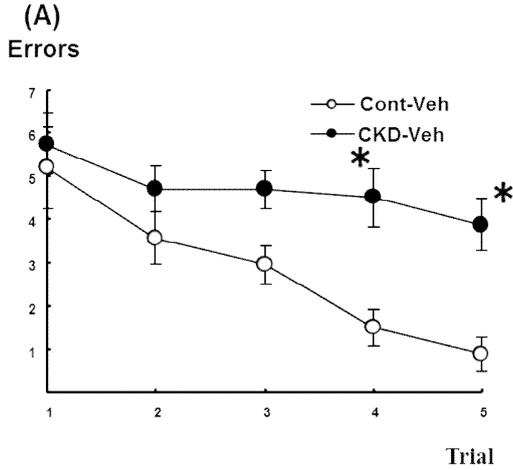


## 4. 研究成果

偽手術群と腎不全群の尿素窒素 (BUN) は有意な差があり、十分な腎不全モデルが作成出来た (Cont-Veh: 30 ± 1.6 mg/dl, Cont-CEPO: 29 ± 1.6 mg/dl, Cont-TMP: 28 ± 1.8 mg/dl,

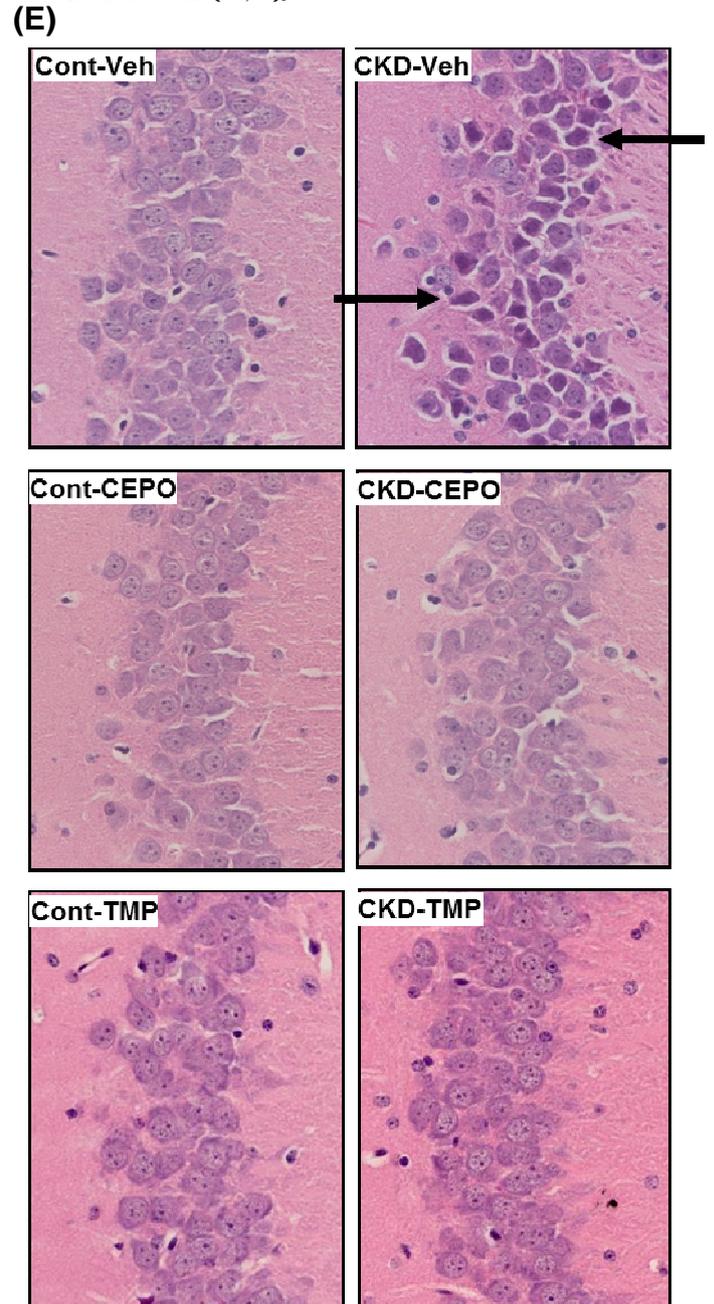
CKD-Veh:  $79 \pm 3$ , 1 mg/dl, Cont-CEPO:  $82 \pm 6$ , 0 mg/dl, Cont-TMP:  $80 \pm 5.0$  mg/dl 平均値  $\pm$  標準誤差)

CKD-Veh 群のエラー回数は有意な高値を示し、記憶力障害が存在することが判明した (A)。CEPO 投与および TMP 投与した腎不全群は偽手術群と同等な記憶力を示した (B,C,D)。このことより CEPO と Tempol には、腎不全による脳機能障害を改善させる効果を有することが示唆された。

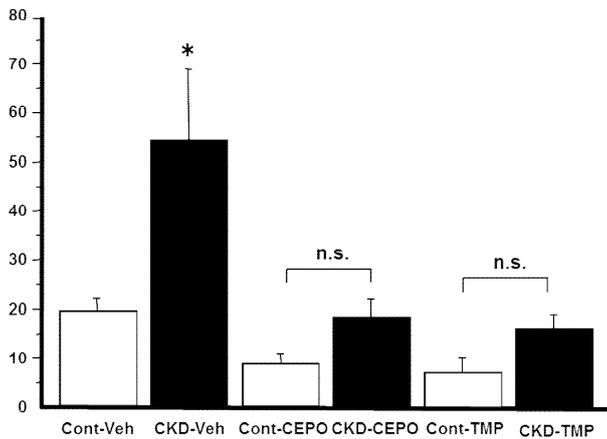


#  $P < 0.05$  vs. CKD-Veh 群

海馬の HE 染色では、CKD-Veh 群において、クロマチンの凝集した変性神経細胞 (矢印) を多数観察した。CEPO および Tempol 投与を行った腎不全モデルでは、変性神経細胞は有意に少なかった (E,F)。

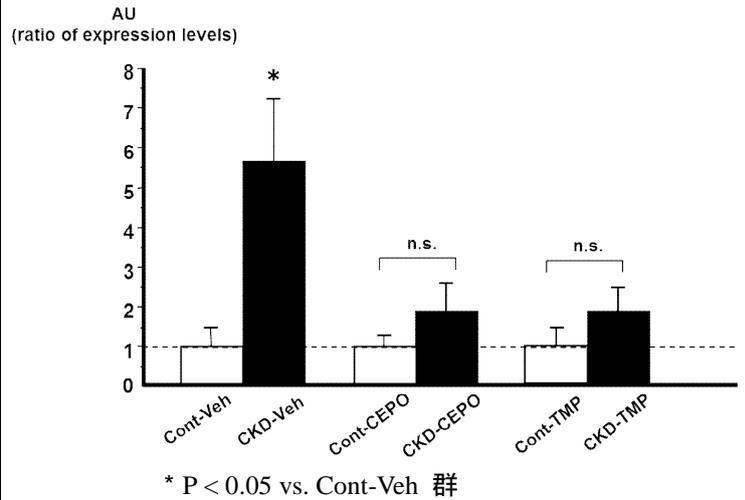
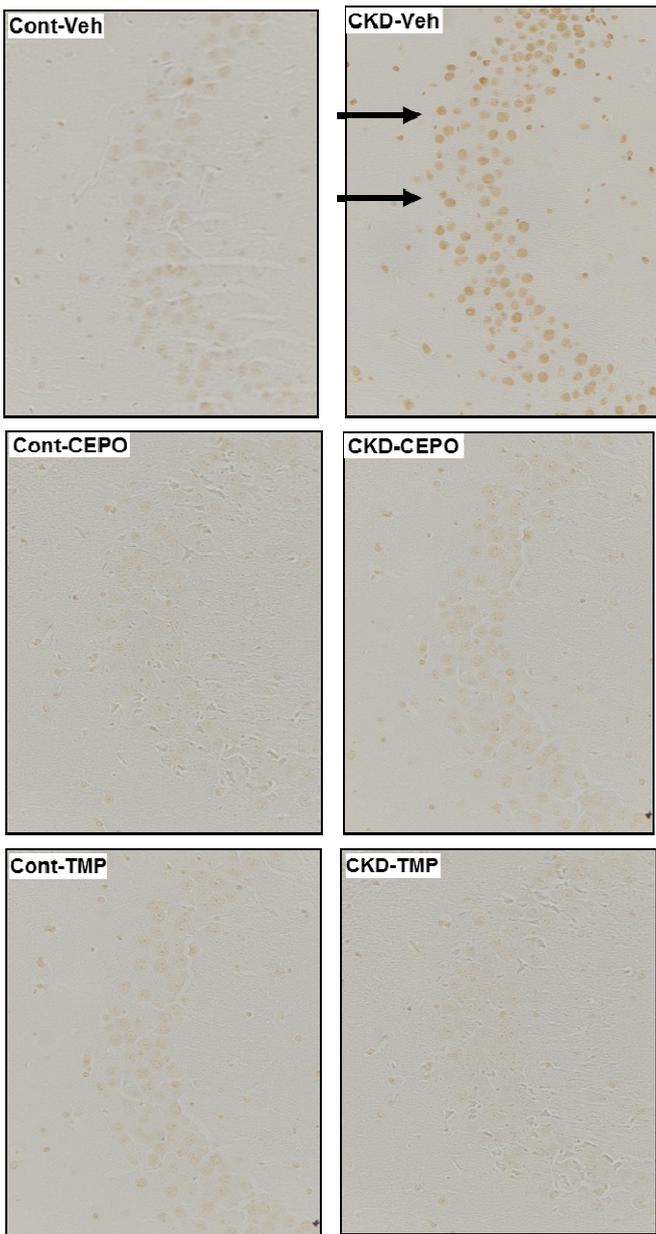


(F) 変性神経細胞数/海馬



\* P < 0.05 vs. Cont-Veh 群

海馬の 8OHdG 免疫組織化学染色



\* P < 0.05 vs. Cont-Veh 群

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

第 51 回日本腎臓学会学術総会

「慢性腎不全における脳内酸化ストレスと記憶障害の検討」

藤崎毅一郎, 鶴屋和彦, 大和真由実, 内海英雄, 飯田三雄

American Society of Nephrology Renal Week  
2008 Annual Meeting and Scientific Exposition  
Carbamylerthropoietin (CEPO) inhibits cerebral oxidative stress and improves spatial memory dysfunction in experimental uremic mice  
Kiichiro Fujisaki, Kazuhiko Tsuruya, Mayumi Yamato, Masatomo Taniguchi, Kousuke Masutani, Hideo Utsumi, Mitsuo Iida

第 52 回日本腎臓学会学術総会

「尿毒症性脳障害におけるカルバミル化エリスロポエチン (CEPO) の脳保護効果」

藤崎毅一郎, 鶴屋和彦, 大和真由実, 内海英雄, 飯田三雄

American Society of Nephrology Renal Week  
2009 Annual Meeting and Scientific Exposition  
Neuroprotective effect of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a mouse uremic memory dysfunction model  
Kiichiro Fujisaki, Kazuhiko Tsuruya K, Mayumi Yamato, Masatomo Taniguchi, Kousuke Masutani, Hideo Utsumi, Mitsuo Iida.

第 53 回日本腎臓学会学術総会  
「尿毒症性脳障害における抗酸化薬 Tempol  
(TMP) の脳保護効果」  
藤崎毅一郎, 鶴屋和彦, 大和真由実

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鶴屋 和彦 (TSURUYA KAZUHIKO)  
九州大学・医学研究院 包括的腎不全治療学  
寄付講座 准教授  
研究者番号: 20372740

##### (2) 研究分担者

谷口 正智 (TANIGUCHI MASATOMO)  
九州大学・医学研究院病態機能内科学・助教  
研究者番号: 60419562

中野 敏昭 (NAKANO TOSHIAKI)  
九州大学・大学病院 腎疾患治療部・助教  
研究者番号: 10432931

##### (3) 連携研究者

なし