

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390259

研究課題名（和文）生活習慣病と心腎連関の機序の検討

研究課題名（英文） Mechanisms of cardiovascular-renal connection on life-style diseases

研究代表者

伊藤 貞嘉（ITO SADAYOSHI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40271613

研究成果の概要（和文）：

本研究では慢性腎臓病における脳心腎障害と methylglyoxal MG の関与を検討した。Dahl 食塩感受性高血圧(DS)ラットに1%MGを経口飲水投与すると高血圧と心腎障害が観察された。次に高食塩を負荷した脳卒中易発症自然高血圧発症ラット(SHR-SP)での脳腎障害を検討したところ、脳と腎障害に関連がみられ血圧および酸化ストレスの関与している可能性が示唆された。腎髄質外層尿細管は管腔内 glucose 濃度の上昇により、ミトコンドリア活性酸素および過酸化水素は増加し、Glyoxylase 1 過剰発現ラットではこの反応が抑制され、カルボニルストレスの関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Present study determined the mechanisms of cardiovascular renal injury in CKD and the role of MG. 1%MG in drinking water was administered to Dahl salt sensitive rats exhibited increase in blood pressure associated with cardiovascular renal injury. Cerebrovascular renal injury was observed in high salt fed stroke-prone spontaneously hypertensive rats, which was associated with blood pressure and oxidative stress. Glucose induced mitochondrial oxidative stress was observed in the tubules of juxtamedullary nephron, which was inhibited in glyoxalase 1 transgenic rats, indicating that carbonyl stress is responsible for glucose mediated renal injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：メチルグリオキサール、腎血行動態、酸化ストレス、インスリン抵抗性、高血圧

1. 研究開始当初の背景

生命の進化の過程において、かつては生命維持に不可欠な構造や分子が、現代社会においては逆に生命を脅かす存在になっているものがある。その代表例として、レニン・アンジオテンシン (RA) 系、酸化ストレスや炎症があげられる。現代は生活習慣病を基盤とした心血管病や腎臓病の克服が大きな課題となっており、特に、慢性腎臓病 (CKD) は脳・心血管病の強力なリスクであり、心腎連関として注目されている。しかし、その詳細は不明である。我々は、生活習慣病と心腎連関の機序には、進化の過程において生命維持に必須であった生体の構造や機能が、現代社会の環境下では逆に有害に作用していると仮説を立てて、検討を重ねてきた。

メチルグリオキサール (MG) は糖の非酵素的分解によりできるアルデヒド化合物で、極めて反応性が高く、AGE の産生や DNA 損傷を引き起こす。また、MG は Angiopoietin などの遺伝子発現に影響を与え、糖尿病性網膜症や腎症に重要役割を果たすと考えられている (Cell 124:258, 2006)。MG は進化の過程において、クエン酸回路に関与し、生命維持に重要な物質と推測されているが、現代社会では逆に生体に有害な物質となっている。組織や血漿 MG 濃度は高血圧、糖尿病、慢性腎臓病で高く、MG による臓器障害メカニズムをカルボニルストレスと呼ばれ、盛んに研究されている。

MG は極めて反応性が高く、その測定は必ずしも容易ではないが、我々は、本学工学部との共同研究により MG の安定した測定法を開発し、ヒトにおいて血漿 MG 濃度が腎機能の低下とともに上昇すること、及び、心血管病の独立した危険因子であることを報告した (Am J Nephrol, 2008)。また、MG は H₂O₂ と反応して全く新たなラジカルを発生させること (Redox Rep. 2007)、MG と H₂O₂ の細胞傷害性には相乗的増強効果があることなどを報告している (Nephrol Dial Transplant, 2008)。生体において H₂O₂ は細動脈の内皮細胞で産生される内皮細胞由来過分極因子である (Shimokawa, J Mol Cell Cardiol, 2005)。糖尿病や腎不全における動脈病変の特徴は細動脈病変であり、MG と H₂O₂ の相互作用が関連している可能性がある。

腎機能障害やアルブミン尿が心血管病のリスクであることは良く知られているが、その機序の詳細は明らかでない。我々は、心血管病と腎障害の共通の基盤として、太い動脈から直接分枝し、高い圧力に曝され、かつ、緊張度の高い細動脈が重要であると提唱している (Strain Vessel Hypothesis: Hypertens Res 32: 115-121, 2009)。すなわち、穿通枝

に代表されるような Strain vessel は、食塩摂取が困難であり、循環障害が起こり易い環境下で、生命維持に重要な臓器の中でも特に重要な部位の灌流を維持する為に必要なものである。しかし、逆に、高血圧などにより障害を受け易いと考えられる。SHR-SP に食塩を负荷すると、アルブミン尿の出現後 1-2 週間で脳卒中を起こして死亡する。我々は、アルブミン尿の程度と太い弓状動脈に近い傍髄質系球体病変及び穿通枝病変が関連することを見出している。

2. 研究の目的

我々は、MG を通常餌飼育の正常ラットに投与しても異変は起こらないが、高塩食や高カロリー食と同時に投与すると、高血圧が発症し、心臓や腎臓に傷害が誘発されること、MG がインスリン感受性を低下させること (グルコースクランプ法による) などを見出した。すなわち、食塩やエネルギー摂取が少ない環境下では MG は有害物質ではないが、生活習慣病では糖代謝の結果必然的に産生される MG が臓器傷害の発症や進展に関与すると推測できる。われわれは、MG は生活習慣病の病態の増幅因子として特有な役割を果たしていると仮説を立てた。

したがって本研究では脳心腎連関メカニズムに対する、血圧と酸化/カルボニルストレスの役割について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1 : 慢性腎臓病の病態に対する MG の役割。

Dahl 食塩感受性高血圧ラットに 1%MG 液を経口飲水投与し 12 週間 (プロトコール 1) 観察し、心腎障害を組織切片により検討した。またプロトコール 2 では同様に 4 週間投与し、一部のラットにはアンジオテンシン I I 受容体拮抗薬を併用投与し、レニン・アンジオテンシン系の関与を検討した。酸化ストレス、炎症およびカルボニルストレスをそれぞれ 8-OHdG、ED-1 およびカルボキシルエチルリジン (CEL) の免疫染色で検討した。染色組織は画像に取り込み、画像解析ソフトを用いて染色領域を半定量解析した。また、皮質の NADPH oxidase 活性を測定し、酸化ストレスの指標とした。

実験 2 : 脳腎連関における Strain Vessel に対する血圧と酸化ストレス、炎症の役割

9 週齢の脳卒中易発症自然高血圧発症ラット (SHR-SP) に高食塩を 2 週間負荷し、血圧、アルブミン尿と脳腎組織について組織切片の免疫染色により検討した。

実験 3 : Strain Vessel 灌流領域尿細管に対する糖負荷の影響

Strain Vessel 灌流領域である腎髄質外層のヘンレのループ太い上行脚を用手単離し、ミ

トコンドリア酸化ストレス（活性酸素、過酸化水素）反応性の蛍光色素で染色した後、蛍光顕微鏡下のチャンバー内で培養し、細いガラスピペットで管腔内を灌流した。灌流液の糖濃度を 5mM から 25mM に増加した際のミトコンドリア酸化ストレスをリアルタイムイメージング法で観察した。

4. 研究成果

実験 1：

慢性腎臓病の病態に対する MG の役割。

8 週齢の Dahl 食塩感受性高血圧 (DS) ラットに 1%MG0 を経口飲水投与し 12 週間観察したところ、血圧が上昇するとともに尿蛋白が増加し糸球体尿細管障害がみられ、腎内のカルボキシエチルリジン (CEL) と 8-OHdG は増加した。また同時に心筋および心血管周囲の線維化を認めた。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンの投与により MG0 の投与による DS ラットの血圧上昇は有意に抑制され、糸球体尿細管障害および心筋、心血管周囲線維化は有意に抑制された。

図 1：プロトコール 1、MG12 週間投与後の心腎障害

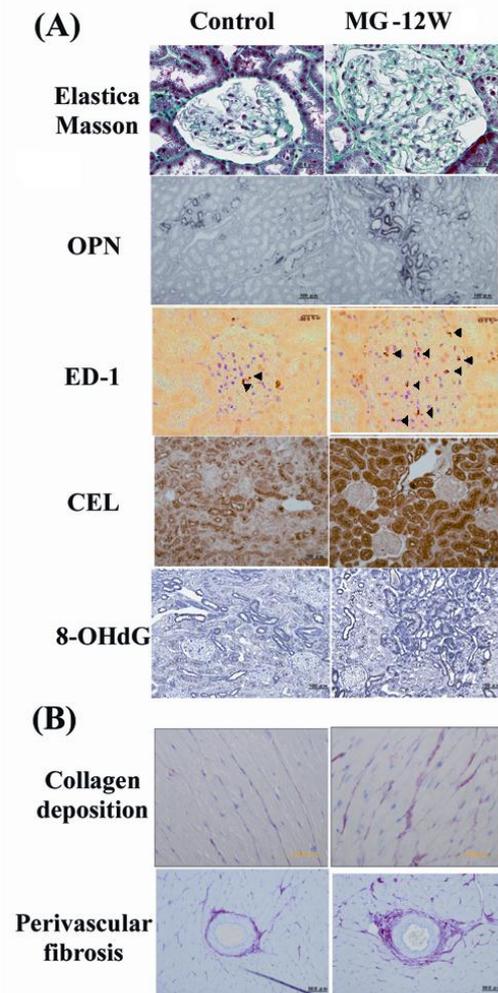
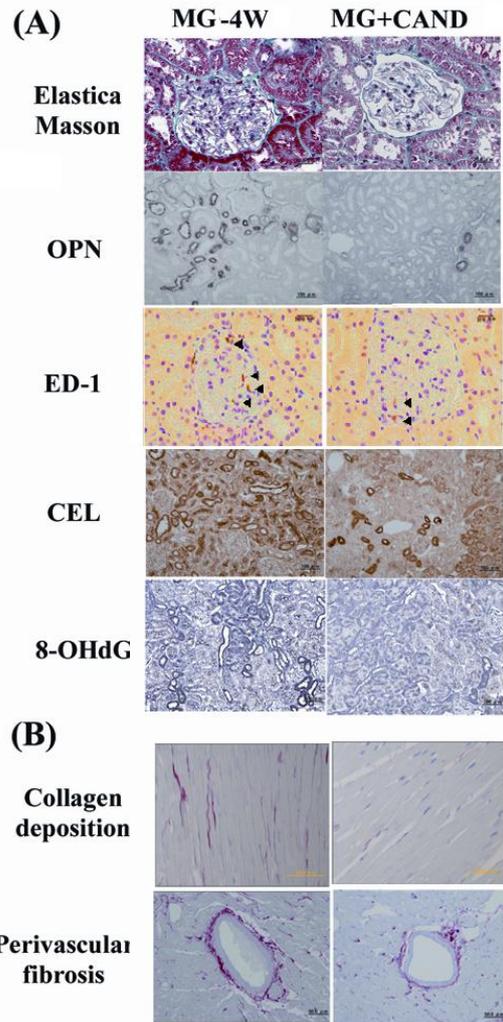


図 2：プロトコール 2、MG



実験 2：

9 週齢の脳卒中易発症自然高血圧発症ラット (SHR-SP) に高食塩を 2 週間負荷した所、血圧は食塩負荷により有意に上昇したが、図 3 に示すようにニフェジピンの投与により、有意に抑制された。この時、尿中のアルブミン排泄量は食塩負荷により有意に増加したが、ニフェジピンの投与により減少した (図 3)。腎 Strain vessel 灌流領域の間質障害、傍髄質糸球体障害もまた食塩負荷により有意に増加したがニフェジピンの投与により減少した。腎髄質外層では炎症や酸化ストレスに関わる分子 (osteopontin, MCP-1 および TGF- β) が髄質外層に多く発現し (図 4)、これはニフェジピンの投与により改善した。傍髄質糸球体の strain vessel の肥厚はニフェジピンの投与により改善し (図 5)、このラットにおいて脳卒中は有意に減少していた (図 6)。

図3：血圧 (A) とアルブミン尿 (B)

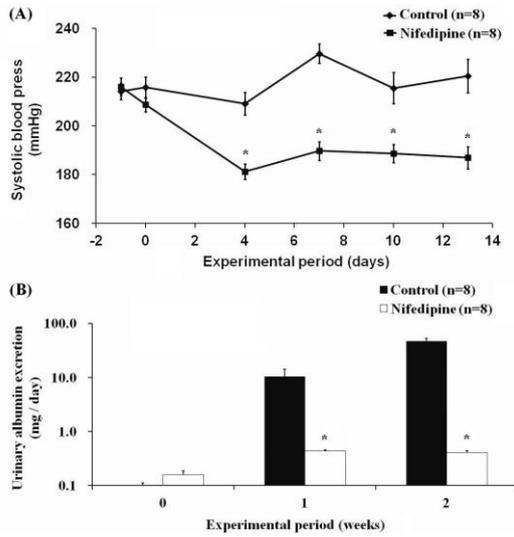


図4：酸化ストレス、炎症関連分子の発現

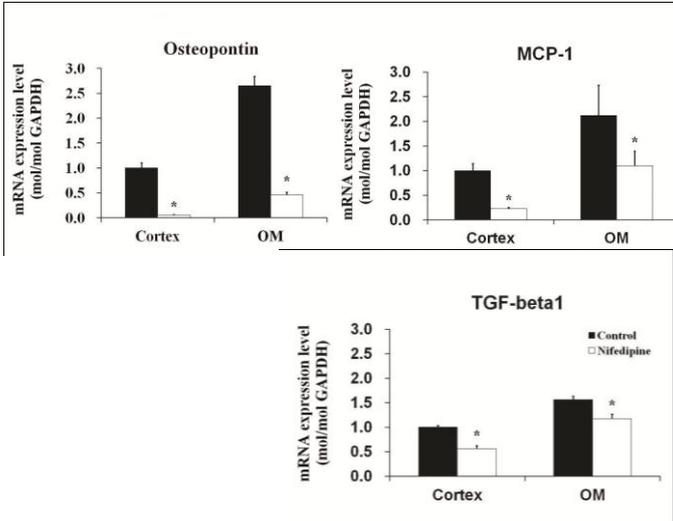


図5：Strain Vessel の肥厚

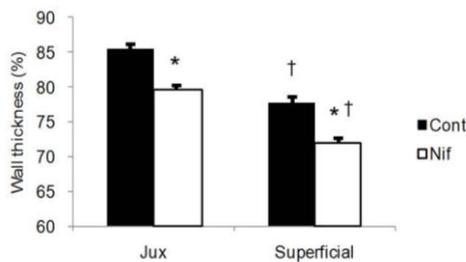
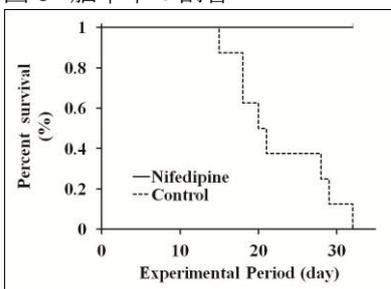


図6：脳卒中の割合



実験3：Strain Vessel 灌流領域尿細管に対する糖負荷の影響

単離灌流尿細管に 25mM glucose を投与すると時間依存性にミトコンドリア活性酸素および過酸化水素の増加が観察された (図7、8)。

この反応は rotenone により抑制され、電子伝達系の関与が示唆された (図7、8)。一方、同様に ouabain でも抑制され、NaK-ATPase の関与が考えられた。またカルボニルストレスの関与を検討するために、まずピリドキサミンに対する効果を検討した所活性酸素、過酸化水素とも有意に抑制され、カルボニルストレスの関与が示された。さらに、カルボニルストレスの関与を確認するために、グリオキサレースの過剰発現ラットで高濃度 glucose に対するミトコンドリア酸化ストレスを検討した所、活性酸素、過酸化水素ともに抑制されていた (図9、図10)。

図7：高濃度 glucose に対するミトコンドリア活性酸素の反応

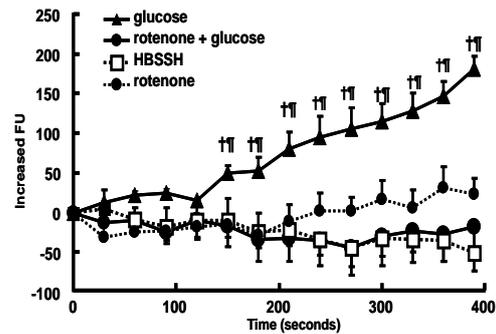


図8：高濃度 glucose に対するミトコンドリア過酸化水素の反応

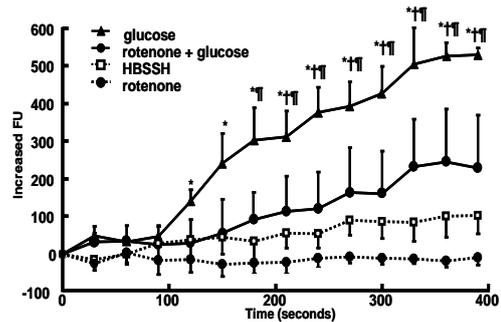


図9：高濃度 glucose 誘導性ミトコンドリア活性酸素に対するカルボニルストレスの役割 (GLO-1 過剰発現ラットでの検討)

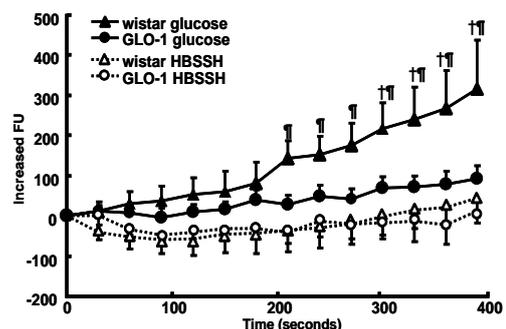
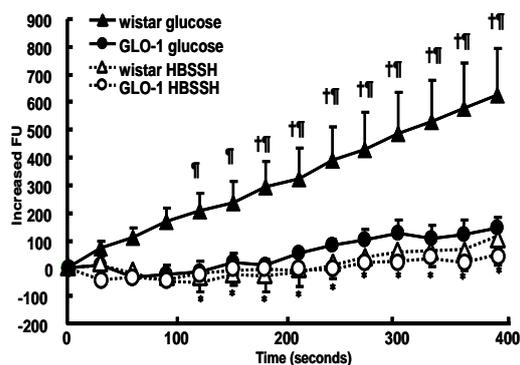


図10：高濃度 glucose 誘導性ミトコンドリア過酸化水素に対するカルボニルストレスの役割 (GLO-1 過剰発現ラットでの検討)



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 18 件)

1. Ito S
Cardiorenal connection in chronic kidney disease
Clin Exp Nephrol、査読有、16巻、2011、8-16
2. Ogawa S、Mori T (5番目)、Ito S (6番目)、他3名
Aliskiren reduces albuminuria and oxidative stress, and elevates glomerular filtration rates in Japanese patients with advanced diabetic nephropathy.
Hypertens Res、査読有、34(3)、2011、400-401
3. 森建文 (筆頭)、伊藤貞嘉 (4番目)、他2名
AKI 発症と酸化/カルボニルストレス
Modern Physician、査読無、30(1)、2011、30-33
4. 鳴海 かほり、森建文、伊藤貞嘉
心腎連関、Cardiovascular Frontier
査読無、2(4)、2011、268-272
5. 伊藤貞嘉
心腎連関、レジデント 査読無、4(6)、2011、50-59
6. Ohsaki Y、Mori T (3番目)、Ito S (8番目)、他6名
Increase of sodium delivery stimulates the mitochondrial respiratory chain H₂O₂ production in rat renal medullary thick ascending limb
Am H Physiol Renal Physiol、査読有、302巻、2011、F95-F102
7. Souma T、Ito S (14番目)、他12名
Luminal alkalinization attenuates proteinuria-induced oxidative damage in proximal tubular cells.
J Am Soc Nephrol、査読有、22(4)、2011、635-648
8. 伊藤貞嘉
降圧薬による脳・心・腎連関「特集にあたって」
Medicinal、査読無、2(1)、2011、4-5
9. 伊藤貞嘉
腎臓からみた心腎連関
月刊糖尿病、査読無、4(2)、2011、12-20
10. 伊藤貞嘉
脳・心・腎連関の疫学と機序
Medicinal、査読無、2(1)、2011、6-15
11. 中道 崇、森建文、伊藤貞嘉
脳・心・腎連関
臨床高血圧、査読無、17(4)、2011、230-237
12. 伊藤貞嘉
Trial & Meta-analysis ROADMAP
臨床高血圧、査読無、17(2)、2011、140-141
13. Ogawa S、Mori T (4番目)、Ito S (10番目)、他7名
Methylglyoxal Is a Predictor in Type 2 Diabetic Patients of Intima-Media Thickening and Elevation of Blood Pressure.
Hypertension、査読有、56(3)、2010、471-476
14. Miyazawa N、Ito S (7番目)、他5名
Methylglyoxal augments intracellular oxidative stress in human aortic endothelial cells
Free Radic Res、査読有、44(1)、2010、101-107
15. 森建文 (筆頭)、伊藤貞嘉 (3番目)、他1名
アルブミン尿の出現機序と心血管病との関連
Medical Science Digest、査読無、36(6)、2010、12-15
16. Ito S
Usefulness of RAS inhibition depends on baseline albuminuria
Nature Reviews Nephrology、査読有、6巻、2010、10-11
17. Guo Q、Mori T (2番目)、Ito S (13番目)、他10名
Methylglyoxal Contributes to the Development of Insulin Resistance and Salt Sensitivity in Sprague Dawley Rats
J. Hypertens、査読有、27巻、2009、1664-71
18. 森建文、伊藤貞嘉
Carbonyl stress in hypertension,

insulin resistance and chronic kidney disease

IMARS highlights、査読有、4巻、2009、15-15

[学会発表] (計 11 件)

1. 芦 毅、他
グルコースによる尿細管上皮細胞のミトコンドリア内酸化ストレス亢進機序
第41回日本心脈管作動物質学会、2012年 2月10日、秋田
2. 伊藤 貞嘉
心腎連関と尿酸
第34回日本高血圧学会 (招待講演)、2011年10月22日、宇都宮
3. 芦 毅、他
リアルタイムイメージングによる腎尿細管上皮細胞のブドウ糖誘導性ミトコンドリア内酸化ストレスの検討
第34回日本高血圧学会総会、2011年 10月21日、栃木
4. 森 建文、他
ミトコンドリア酸化ストレスを介した新たな高血圧発症メカニズムの解明
第三回腎疾患と高血圧研究会、2011年 7月2日、大阪
5. 伊藤 貞嘉
CKD と高血圧
日本内科学会信越支部第 44 回生涯教育講演会 (招待講演) 2011 年 6 月 26 日、長野
6. 森 建文
腎髄質血流および酸素代謝を考慮した腎保護とバイオイメージングの開発
第54回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)、2011年 6月15日、横浜
7. 森建文、他
リアルタイムイメージングを用いた尿糖による腎ミトコンドリア酸化ストレスの検討
第11回日本抗加齢医学会総会、2011年 5月28日、京都
8. 森 建文、他
高血圧がもたらす傍髄質ネフロン障害とCKD 発症メカニズム
第 53 回日本腎臓学会、2010年6月17日、神戸
9. Ito S
Strain Vessel: New hypothesis for the cardiorenal syndrome
ISN-NEXUS 2010、2010 年 4 月 17 日、京都
10. 森建文
慢性腎臓病の腎、心血管障害に対するカルボニルストレスの役割
第 13 回日本心血管内分泌代謝学会学術

総会、2009年10月24日、大宮

11. Mori T、他
Role of Carbonyl Stress on Pathogenesis of Chronic Kidney Disease
10th International Symposium on the Maillard Reaction、2009年8月29日-31日、Cairns, Australia

[図書] (計 1 件)

1. 伊藤 貞嘉
富野康日己監修; 中外医学社
慢性腎臓病を合併する高血圧治療においてレニン・アンジオテンシン系阻害薬をどのように使用すればよいのでしょうか? ; EBM 腎臓病の治療 2011 - 2012
2011、158-161

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 貞嘉 (ITO SADAYOSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40271613

(2) 研究分担者

森 建文 (MORI TAKEFUMI)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 40375001

阿部 倫明 (ABE MICHIAKI)

東北大学・病院・助教
研究者番号: 40400246
(2009年~2010年)