

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 4 月 24 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591043

研究課題名（和文）間欠的虚血ストレスの糖尿病性腎症への影響と脂肪酸結合蛋白の役割

研究課題名（英文） Intermittent hypoxia in the progression of diabetic nephropathy and Role of fatty acid binding protein

研究代表者

木村 健二郎（Kimura Kenjiro）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：00161555

研究成果の概要（和文）：

睡眠時無呼吸症候群（sleep apnea syndrome, SAS）は、糖尿病を悪化させる事に加え、交感神経を興奮させ、夜間高血圧を惹起することにより、糖尿病性腎症を進行させる可能性がある。そこで、遺伝的糖尿病モデルと高血圧モデルに間欠的低酸素刺激（一日 12 時間、10 分間ごとに 10%の酸素濃度になるように設定）を与え、SAS が、糖尿病や血圧を悪化させ、腎障害を進行させることを検討したが、基礎実験では、間欠的低酸素刺激が、糖尿病性腎症や高血圧性腎障害の進行に関与していることを証明できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Because sleep apnea syndrome (SAS) may contribute to poor control of diabetes or hypertension, it is possible that SAS is a risk factor for the progression of diabetic nephropathy. In this study, genetic models of type 1 diabetes or hypertension model were examined. The mice or rats were housed within a cycled oxygen chamber and were exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) in which oxygen and nitrogen flow rates were adjusted to achieve episodic (10 minute) reductions of ambient oxygen from 21% to 10% for CIH for 12 hours. However, it was not demonstrated that chronic intermittent hypoxia was related to the deterioration of kidney disease induced by diabetes or hypertension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・腎臓内科学

キーワード：間欠的低酸素、虚血ストレス、脂肪酸結合蛋白、低酸素、高血圧、糖尿病、

1. 研究開始当初の背景

近年、腎症の進行に、腎微小循環障害が大きな要因となっている事が注目されている。糖尿病は、微小循環障害を惹起する典型的な疾患であり、腎微小循環障害は糖尿病性腎症の進行に深く関与している。

糖尿病では、非糖尿病に比較して睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome, SAS) を合併しやすいたことが知られている。SAS は、間欠的な低酸素血症と交感神経緊張によって微小循環障害を発症または増悪させると考えられる。SAS が糖尿病を悪化させているという事実も示されている。

また、SAS は交感神経を興奮させ、夜間高血圧を惹起することにより糖尿病性腎症を進行させる可能性もある。以上より、糖尿病性腎症の進行に SAS が深く関与している可能性がある。

ヒト腎臓の近位尿細管に発現している肝臓型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) には、抗酸化作用による腎保護作用がある事が、明らかにされている。げっ歯類の腎臓には、L-FABP が発現していないことから、ヒト L-FABP 染色体遺伝子導入 (Tg) マウスを作成した。このマウスには転写調節領域を含めたヒト L-FABP 遺伝子を導入しているため、マウスでのヒト L-FABP 発現はヒトと同様の転写調節を受けている。この Tg マウスを使用し、腎疾患における L-FABP の役割を検討してきた。その結果、慢性腎疾患において、L-FABP は、虚血や低酸素など微小循環障害を惹起するストレスにより腎臓での発現が亢進することを示した。また L-FABP Tg マウスでは、野生型マウスに比べて腎障害が緩和された事から、L-FABP は虚血や低酸素刺激による腎障害の進展を緩和する可能性ある。さらに、片腎摘施行後の STZ 糖尿病マウスでは、著明

な間質尿細管障害を認めたが、L-FABP Tg マウスでは、野生型マウスに比べて腎障害が緩和された。L-FABP は、糖尿病性腎症の進行を抑制する可能性がある。

2. 研究の目的

- ・間欠的虚血ストレスは、耐糖能異常の悪化を生じ、糖尿病性腎症を進展させることを明らかにする。
- ・間欠的虚血ストレスは、高血圧を悪化させ、腎障害を進展させることを明らかにする。
- ・腎臓における L-FABP の発現が、間欠的虚血ストレスを緩和し、糖尿病性腎症の進行を抑制する事を明らかにする。

3. 研究の方法

実験 1 : Akita オスマウス (n=10) および野生型オスマウス (c57/black, n=10) を用いた。腎障害の進行をより促進するため、すべてのマウスで片腎摘出を行い、一週間後に Akita マウス (n=10) および野生型マウス (n=10) をそれぞれ 2 群にわけた。低酸素刺激を行う群では、一日 12 時間、10 分間ごとに 10% の酸素濃度になるように設定した Oxycycler® 内に 12 週間入れ、その後、腎摘を行った。コントロールは、Oxycycler® に入れず、通常の飼育環境に 12 週間おいた後、腎摘を行った。4 週間ごとに血圧、血糖、尿アルブミン、尿 NAG, 尿 NGAL の測定を行った。12 週間後に摘出された腎臓から遺伝子・蛋白抽出を行い、炎症性サイトカインの発現を検討した。RNA 抽出は、キアゲンの RNA 抽出キットを用いた。蛋白抽出は、lysis buffer (0.1 mol/L phosphate buffer, 1 µg/ml leupeptin, 1% Triton X-100, and 0.05 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride) を用いて、ホモジナイズし、30 分間 15,000 rpm で遠心し、上清を回収した。

また、HE 染色/PAS 染色を行い、形態学的検討を行った。

実験 2 : 4 週齢雌の Wister ラット (n=12) を用いた。右腎臓を摘出し、その 1 週間後より高食塩の食事(7%NaCl)を与え、低酸素刺激を行う群とコントロール群の 2 群にわけた。低酸素刺激を行う群では、一日 12 時間、10 分間ごとに 10%の酸素濃度になるように設定した Oxyccycler®内に 4 週間入れ、その後、腎摘を行った。コントロールは、Oxyccycler®に入れず、通常の飼育環境に 4 週間おいた後、腎摘を行った。腎臓摘出時に血圧、血糖、尿蛋白の測定を行った。4 週間後に摘出された腎臓から遺伝子・蛋白抽出を行い、炎症性サイトカインの発現を検討した。また、HE 染色/PAS 染色を行い、形態学的検討を行った。

実験 3 : アンジオテンシン II を浸透圧ポンプに入れて、L-FABP 遺伝子導入マウスの皮下に埋め込み、一日 12 時間、10 分間ごとに 10%の酸素濃度になるように設定した Oxyccycler®内に 4 週間入れ、その後、腎摘を行った。摘出された腎臓を用いて、低酸素刺激を行わなかった群と比較して、腎障害の程度を遺伝子・蛋白解析および形態学的に評価した。

4. 研究成果

実験 1 : 血圧は、4 群間で同程度であった。血糖は、野生型に比べ、有意に Akita マウスで高値であったが、低酸素による影響はなかった(100-200mg/dl vs 450-600mg/dl)。尿中アルブミン排泄は、野生型に比べ、有意に Akita マウスで高値であったが、低酸素による影響はなかった(18-74mg/g. cre vs 62-192mg/g. cre)。尿中 NAG や尿中 NGAL は、4 群間で同程度であった。腎臓での MCP-1 発現は、4 群間で同程度であった。形態学的検討でも、すべての群で尿細管間

質障害は、認められなかった。

片腎摘出した Akita マウスに 12 週間という長期間、低酸素刺激を負荷し続けたにも関わらず、尿細管間質障害を発症させることができなかった。

実験 2 : 血圧は、低酸素刺激を行った群で有意に高値であった。血糖は、両群で同程度であった。尿蛋白排泄は、低酸素刺激を行った群では、コントロール群に比べ、有意に低値(10mg/g. cre vs 25mg/g. cre)であった。形態学的検討では、両群で皮髄境界部に尿細管間質障害を認めたが、その程度は、有意ではないものの、低酸素刺激を行った群に比べ、コントロール群で強い傾向であった。炎症性サイトカインの産生は、認められなかった。

今回のモデルでは、低酸素刺激を行った群では、コントロール群に比べ、血圧の上昇は認められたが、尿細管間質障害の程度は、むしろ軽減していた。

間欠的低酸素刺激が、高血圧による腎障害の進行に関与していることは証明できなかった。

実験 3 : 結果 : 血圧は、間欠的低酸素刺激を行った群で有意に高値であった。しかし、尿蛋白排泄は、低酸素刺激を行った群の方が、低酸素刺激を行わなかった群に比べ、有意に低値であった(76.0 ug/mg. cre vs 1138ug/mg. cre, p=0.05)。炎症性サイトカインの産生や形態学的腎障害の検討でも、低酸素刺激を行った群に比べ、低酸素刺激を行わなかった群で、むしろ強い傾向であった。

今回の検討でも、低酸素刺激を行った群では、低酸素刺激を行わなかった群に比べ、血圧の上昇は認められたものの、腎障害の程度は、むしろ軽減していた。さらに、腎臓での FABP 発現の増加はコントロールと比較し、同程度であった。

基礎実験では、間欠的低酸素刺激が、高血

圧性腎障害の進行に関与していることを証明できなかった。間欠的低酸素刺激が、腎障害に与える影響は、ヒトとマウスで異なる可能性がある。今後、別の実験系による検討が必要と思われる。

以上より、間欠的低酸素刺激が、糖尿病性腎症や高血圧性腎障害の進行に関与していることを証明できなかった。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 健二郎 (KIMURA KENJIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号 00161555

(2) 研究分担者

菅谷 健 (SUGAYA TAKESHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・客員教授

研究者番号 40381561

池森 敦子 (IKEMORI ATSUKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号 80350635

(3) 連携研究者

なし