

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 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591047

研究課題名（和文）慢性腎臓病と心血管病の連関機序の解明と治療法開発

研究課題名（英文）Investigation on the mechanisms of association of chronic kidney disease (CKD) and cardiovascular diseases.

研究代表者

柏原 直樹 (KASHIHARA NAOKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233701

研究成果の概要（和文）：

アルブミン尿は心血管病と深く関連しており、血管内皮機能障害の反映であると推測されていたが、詳細は不明であった。2光子レーザー顕微鏡を用いて生体腎における微小血流、濾過を可視化検出する *in vivo live imaging* 技術を確立した。糖尿病等の病態糸球体では大分子量物質の過剰濾過状態がアルブミン尿出現前より先行出現することが判明し、またこれには内皮機能障害、内皮グライコカリックスの減少の関与が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Albuminuria is strongly associated with cardiovascular diseases. Endothelial dysfunction has been speculated to be involved in the pathogenesis of albuminuria. We have successfully developed a novel *in vivo* imaging technique which enables us to visualize microcirculation and permeability change in the kidney. Using this technique, we found hyperfiltration of macromolecules precede albuminuria. We also demonstrated endothelial dysfunction, indicated by the loss of glycocalyx along the glomerular vascular wall and uncoupling of eNOS is deeply involved in this condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病、アルブミン尿、内皮障害、グライコカリックス

1. 研究開始当初の背景

先進諸国において慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease:CKD）が増加している。高齢化と糖尿病、高血圧、肥満、メタボリックシンドローム（MetS）等の生活習慣病が主因と目されている。微量アルブミン尿未満の超微量域から CVD 発症の危険因子

となる。CKD の原因となる糖尿病、肥満等では糸球体高血圧（過剰濾過）がアルブミン尿出現に先行することも示されている。一方、アルブミン尿は全身の ECD の一環として出現し故に CVD 発症に関連することも想定されている（Steno 仮説）。糸球体高血圧と糸球体 ECD が病因論上、双方向的

に関与し、結果としてアルブミン尿が出現する可能性が高い。

糸球体内皮細胞は有窓性であり、アルブミン等の macromolecule の透過性制御への関与は少ないと見なされてきた。しかしながら、糸球体内皮細胞表層・窓内は複数の複合糖質、proteoglycan から構成される Glycocalyx 層で被覆されており、Glycocalyx の破綻がアルブミン尿出現と関与することが示されている。CVD 発症の病変主座である冠動脈分枝、脳動脈穿通枝等の血管系と糸球体における ECD の発症機序上の異同に関しても詳細は不明である。生活習慣変化と加齢に起因する CKD の共通基盤病態と CVD 発症機構の解明が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は生活習慣変化と加齢に起因する多彩な要因が、なぜ腎障害を惹起し、心血管疾患の危険因子となりうるのか、その共通基盤病態を解明することにある。以下の課題・仮説を検証したい。

- ・アルブミン等の macromolecule の透過性制御における糸球体内皮細胞の役割、糸球体 ECD によるアルブミン尿出現の可能性、
- ・糸球体高血圧 (過剰濾過) と糸球体 ECD, アルブミン尿出現との病因論上の関連、
- ・CKD における糸球体内皮 ECD の分子機序、
- ・内皮細胞障害と上皮障害との cross-talk,
- ・腎内微小血管系と冠動脈、脳穿通枝を含む systemic な血管系の障害機序の異同、以上を解明し CKD の治療法立案に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CKD における糸球体内皮細胞の ECD とアルブミン尿出現の解析

①糸球体係蹄壁における Glycocalyx の解析と病態腎における変化の検討

糸球体内皮細胞は有窓性(fenestraed)であり、内皮表層・fenestra 内部は無構造と目されていた時期もあるが、組織固定・染色過程の artifact であることが判明した。lanthanum を用いて酸素化した灌流液で灌流固定することにより、50-100nm 厚の Glycocalyx 層を電子顕微鏡で可視化可能である。また lectin(WGA,Isolectin B4 等)を用いて染色観察する。STZ-DM, MetS モデルである Zucker obese rat(ZOR)、高食塩負荷 Dahl 食塩感受性 rat (Dahl HT)、5/6 腎摘(Nx) モデルにおける Glycocalyx 変化を解析する。さらに 2-photon 顕微鏡を用いて、経静脈的に lectin 投与し、生体腎における Glycocalyx の存在様式を解析する。

PV-1 は内皮細胞表面に caveolin と

co-localize して存在する 2 量体構造の糖蛋白である。正常糸球体内皮には発現しないが、発生過程、病態腎、障害からの修復過程において発現する。PV-1 分子を指標として Glycocalyx 変化と併せて疾患腎の内皮細胞形質変化を評価する。

②糸球体血管内皮細胞機能障害の解析: ROS /NO の均衡変化の解析 (柏原、佐藤)

Diaminorhodamine(DAR-4M:NO 指示薬)、Dichlorofluorescein-diacetate(DCFH-DA:ROS 指示薬) と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、生成 NO (bioavailable NO) を ROS と同時に組織上で可視化検出する in situ 可視化法を確立している(Am J Physiol Renal Physiol 288:1114)。本法により病態モデル腎糸球体における NO (赤色蛍光で検出可能), ROS (緑色蛍光で検出可能) 変化を検討する。以上の知見をあわせることにより、病態腎における糸球体内皮細胞の形態的かつ、機能的変化の解析が可能となる。

(2) 糸球体高血圧(過剰濾過)、糸球体 ECD、アルブミン尿出現の相互関係の検討 (柏原、富田)

Leica 社製 TCS SP2 2-photon レーザー顕微鏡を用いて生体腎における輸出入細動脈径変化、微小血管血流、濾過、再吸収、病的状態下での permeability 亢進を可視化検出しうる技術をほぼ確立している。各種 probe を用いて、ラット及びマウスにおいて糸球体・間質毛細血管血流、糸球体濾過の動態が観察可能であった。輸出入細動脈径も測定可能で、病態での輸入細動脈自動調節能の異常を検出できる。同時に生体糸球体の 3 次元立体構築が観察可能である。

STZ 糖尿病モデル(STZ-DM)を用いて予備実験では、4 週時には輸入細動脈拡張と一部の肥大糸球体から macromolecule(40kD Dextran)の濾過を認めた。尿中アルブミン排泄を認めない早期から、肥大糸球体が hyper-permeable 状態にあることが判明した。本技術により単一ネフロンでの透過性(single nephron permeability) 変化あるいはアルブミンの濾過亢進が評価可能となる。

STZ-DM, ZOR, Dahl HT, Nx モデルにおいて、FITC-Albumin, FITC-40kD, 70kD Dextran の濾過状態を観察する。rhodamine 標識 lectin を先行投与し、糸球体 Glycocalyx を可視化しておけば、Glycocalyx 減少部位からアルブミンが漏出するかどうかを観察できる。同様に DAR-4M を同時灌流し

bioavailable NO の減少部位との関連を評価する。以上により、Glycocalyx 破綻、NO 減少によって示される糸球体内皮 ECD とアルブミン尿出現との関係を検討可能となる。

(3) CKD における内皮機能障害のメカニズムの解明

①ROS/NO 均衡変化の分子機序の解析: NOS uncoupling の分子機序の解析

STZ-DM,5/6Nx モデルで糸球体内 NADPH oxidase 活性化、酸化ストレス亢進を報告してきた。ROS により BH4 は BH2 へと酸化減少し、補酵素 BH4 低下に基づく NOS 機能異常(uncoupling)を介して NO 産生低下と eNOS 由来 ROS 産生亢進が惹起される。ECD 病態形成における NADPH oxidase の役割を明確にするために、NADPH oxidase の構成成分 gp91phox のサブタイプである NOX2 を内皮特異的に高発現する tie2-NOX2 Tg マウス (Oxford 大学 K Channon 教授供与) を用いる。本 Tg を用いて糸球体 ECD (NO 産生能で評価)、Glycocalyx 変化、アルブミン尿漏出 (2-photon 顕微鏡観察) の有無を検討する。

STZ 糖尿病モデルでは、PKC 活性化による NADPH oxidase 活性化および、NOS uncoupling によって ROS/NO 不均衡が増大する。CKD 病態形成における NOS uncoupling の意義を明確にするために、BH4 産生の律速酵素である GTP-cyclohydrolase I(GTPCH)遺伝子を tie2 プロモーター下で内皮特異的に高発現する GTPCH-Tg マウスを用いる。このマウスに STZ 糖尿病モデルを作成 (GTPCH-Tg STZ-DM) し、NOS uncoupling と ROS/NO 不均衡の軽減、アルブミン尿減少の有無を検討する。酸化ストレス亢進環境下では eNOS の発現を亢進させると、uncoupling 未解除のため、酸化ストレスがさらに増大し、bioavailable NO はむしろ減少する。

②Glycocalyx 変化の分子機序の解析

糖尿病腎における heparanase 発現亢進 (酸化ストレスとレニン-アンジオテンシン系が関与)、heparanase 活性抑制によるアルブミン尿減少が報告されている (KI 70,2100)。STZ-DM, ZOR, Dahl-HT, Nx モデル等の病態腎における糖鎖分解酵素群及び、糖鎖転移酵素 (N-Deacetylase/ N-Sulfotransferase:NDST) の発現変化とその機序を解析する。

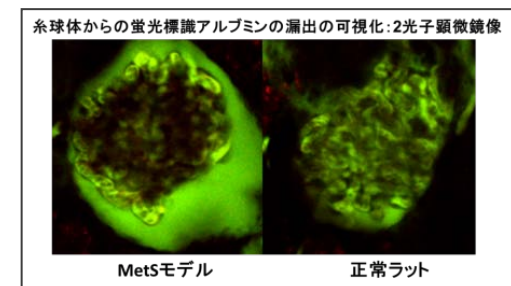
③糸球体内皮障害と上皮障害の cross-talk の検討

糸球体内皮障害が起因となり、上皮障害へと波及する可能性を検討する。病態モデルにおいて、内皮障害と上皮障害 (desmin 発現、nephrin/podocin 発現減少) を経時的に解析する。

④糸球体における ECD および systemic vasculature の ECD の関連の検討

STZ-DM, ZOR, Dahl-HT, Nx モデル等の病態腎糸球体内皮の障害機序の検討 aorta 標品を用いて、内皮依存性血管拡張反応を評価する。また心臓冠動脈、中大脳動脈穿通枝の Glycocalyx 変化、ROS/NO 均衡変化を解析する。本実験により、糸球体内皮細胞と systemic vasculature の内皮細胞における障害機序・出現時期の異同が明らかとなる。

またこれらの病態モデルに、レニン-アンジオテンシン系阻害薬 (NADPH oxidase 抑制作用あり)、Ca チャネルブロッカー (一部に GTPCH 活性亢進作用あり)、statin(eNOS 活性化作用)投与群を設定し糸球体及び systemic vasculature の ECD 改善効果を検証し、臨床への feedback を試みる。

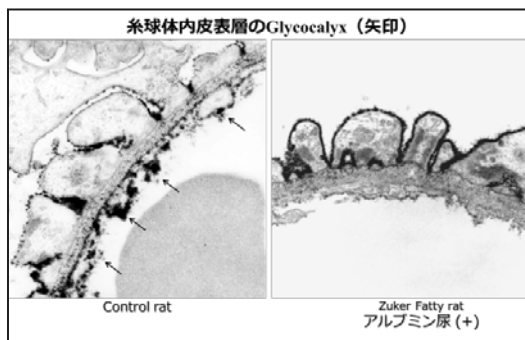


⑤母胎環境が CKD 発症に及ぼす影響の解析

妊娠母体の栄養状態によって規定される母胎内環境や出生時体重、出生早期の栄養環境が生後のネフロン数、CKD の発症に影響することが疫学・実験研究により示されている。現在、本邦においては妊娠年齢女性の BMI は経年的に減少しており、連動して出生児体重の漸減傾向が継続している。

妊娠 rat を用い妊娠後期 14~21 日間、8% 低蛋白食あるいは 50% カロリー制限を加える。出生後、一群には授乳期間を通して食事介入を行う。出生仔腎のネフロン数計測、高食塩食負荷時の血圧変化 (食塩感受性)、aorta 標品を用いた内皮機能の評価を行う。また STZ 糖尿病、腎摘モデルを作成し、内皮機能障害、アルブミン尿出現に対する susceptibility の変化を解析する。将来的な

CKD 減少へ向けての public health 上の対策立案に貢献したいと考えている。



4. 研究成果

(1) 糸球体高血圧(過剰濾過)、糸球体 ECD、アルブミン尿出現の相互関係の検討

Leica 社製 TCS SP2 2-photon レーザ顕微鏡を用いて生体腎における輸出入細動脈径変化、微小血管血流、濾過、再吸収、病的状態下での permeability 亢進を可視化検出する技術を確立した。各種 probe を用いて、ラット及びマウスにおいて糸球体・間質毛細血管血流、糸球体濾過の動態が観察可能であった。輸出入細動脈径も測定可能で、病態での輸出入細動脈自動調節能の異常を検出しえた。同時に生体糸球体の 3 次元立体構築変化を解析した。

STZ-DM, ZOR, Dahl HT, N_x モデルにおいて、FITC-Albumin、FITC-40kD、の濾過状態を観察した。rhodamine 標識 lectin を先行投与し、糸球体 Glycocalyx を可視化しておけば、Glycocalyx 減少部位からアルブミンが漏出することを確認した。同様に DAR-4M を同時灌流し bioavailable NO の減少部位との関連を評価した。以上により、Glycocalyx 破綻、NO 減少によって示される糸球体内皮障害がアルブミン尿出現に関係することが判明した。

(2) ROS/NO 均衡変化の分子機序の解析 : NOS uncoupling の分子機序の解析

糖尿病やメタボリックシンドローム、ネフロン数減少などの病態腎糸球体では、BH₄低下に起因する NOS uncoupling、NO 産生低下と eNOS 由来の ROS 産生亢進を既に報告している。BH₄ 産生の律速酵素である GTP-cyclohydrolase I (GTPCH) の遺伝子改変動物を用いて、本酵素の糸球体内皮機能維持、NOS uncoupling、Glycocalyx 変化、アルブミン尿出現における役割を明らかにした。また基質である L-arginine 減少によっても NOS uncoupling が生じるが、L-arginine 分解酵素 Arginase 1, 2 の CKD 病態形成における役

割を検討した。ROS/NO の均衡変化は、我々の開発した in situ 可視化法を利用し、生成 NO (bioavailable NO) を ROS と同時に組織上で検出し、病態モデルにおける変化を検討し報告した

(3) Glycocalyx 変化の分子機序の解析

糖尿病腎における heparanase 発現亢進、活性抑制によるアルブミン尿減少が報告されている。病態腎における糖鎖分解酵素群の発現変化と、その機序を解析する。また糸球体からのアルブミン分子の漏出、血管透過性変化を解析する上で、2 光子励起方式レーザー走査型顕微鏡 (two-photon laser scanning fluorescence microscope : two-photon 顕微鏡) を利用した。高い時間・空間分解能を有し生体臓器の深部まで、蛍光標識小分子の生体内挙動を 3 次元的に検出可能であり、長時間観察、動画で記録可能であった。各種分子量の蛍光標識 probe を用いてラット、マウスの糸球体血流の可視化、アルブミン等の macromolecule の糸球体係蹄壁からの漏出状態を直接個々の糸球体毎に可視化する方法を確立した。糖鎖分解酵素を用いて、Glycocalyx 層を破綻させ、Glycocalyx 減少糸球体からのアルブミン尿の出現の有無を解析し、アルブミン尿出現における Glycocalyx の役割を明らかにした。

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)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Nagasu, H, Satoh, M, Fujimoto, S, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: Azelnidipine attenuates glomerular damage in Dahl salt-sensitive rats by suppressing sympathetic nerve activity. *Hypertens Res*, 35:348-55, 2012.
2. Nagasu, H, Satoh, M, Kidokoro, K, Nishi, Y, Channon, KM, Sasaki, T & Kashihara, N: Endothelial dysfunction promotes the transition from compensatory renal hypertrophy to kidney injury after unilateral nephrectomy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302:F1402-8, 2012.

3. Nagasu, H, Satoh, M, Kuwabara, A, Yorimitsu, D, Kidokoro, K, Nishi, Y, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011.
4. Nagasu, H, Satoh, M, Yorimitsu, D, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: Comparison of combination therapy of olmesartan plus azelnidipine or hydrochlorothiazide on renal and vascular damage in SHR/NDmcr-cp rats. *Kidney Blood Press Res*, 34:87-96, 2011.
5. Satoh, M, Fujimoto, S, Horike, H, Ozeki, M, Nagasu, H, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney. *Lab Invest*, 91:190-202, 2011.
6. Mochizuki, S, Takayama, A, Sasaki, T, Yada, T, Endo, K, Horike, H, Kashihara, N, Ogasawara, Y & Kajiya, F: Clear Correlation of Tetrahydrobiopterin with Nitric Oxide Bioavailability in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Blood Purif*, 30:96-97, 2010.
7. Nagasu, H, Satoh, M, Kuwabara, A, Yorimitsu, D, Sakuta, T, Tomita, N & Kashihara, N: Renal denervation reduces glomerular injury by suppressing NAD(P)H oxidase activity in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant*, 2010.
8. Sakuta, T, Morita, Y, Satoh, M, Fox, DA & Kashihara, N: Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers. *Arthritis Rheum*, 62:1319-28, 2010.
9. Satoh, M, Fujimoto, S, Horike, H, Ozeki, M, Nagasu, H, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: Mitochondrial damage-induced impairment of angiogenesis in the aging rat kidney. *Lab Invest*, 2010.
10. Kashihara, N, Haruna, Y, Kondeti, VK & Kanwar, YS: Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem*, 17(34):4256-69. 2010.
11. Satoh, M, Haruna, Y, Fujimoto, S, Sasaki, T & Kashihara, N: Telmisartan improves endothelial dysfunction and renal autoregulation in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*, 33:135-42, 2010.
12. Kuwabara, A, Satoh, M, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: Deterioration of glomerular endothelial surface layer induced by oxidative stress is implicated in altered permeability of macromolecules in Zucker fatty rats. *Diabetologia*, 53:2056-65, 2010.
13. Mochizuki, S, Takayama, A, Sasaki, T, Yada, T, Endo, K, Horike, H, Kashihara, N, Ogasawara, Y & Kajiya, F: Clear Correlation of Tetrahydrobiopterin with Nitric Oxide Bioavailability in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis.

Blood Purif, 30:96-97, 2010.

14. Satoh, M, Kobayashi, S, Kuwabara, A, Tomita, N, Sasaki, T & Kashihara, N: In vivo visualization of glomerular microcirculation and hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microcirculation*, 17:103-12, 2010.
15. Yada, T, Shimokawa, H, Hiramatsu, O, Satoh, M, Kashihara, N, Takaki, A, Goto, M, Ogasawara, Y & Kajiya, F: Erythropoietin Enhances Hydrogen Peroxide-Mediated Dilatation of Canine Coronary Collateral Arterioles during Myocardial Ischemia in Dogs in Vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010.

[学会発表] (計 6 件)

1. Nagasu, H, Satoh, M, Kidokoro, K, Kashihara, N, Endothelial Cell Interacted with Podocyte and Mesangial Cells Via NAD(P)H Oxidase. 49th ERA-EDTA Congress, May 25, 2012, Paris, France
2. Kidokoro, K, Satoh, M, Nagasu, H, Nishi, Y, Ihoriya, C, Kadoya, H, Yada, T, Keith M Channon, Sasaki, T, Kashihara, N, Preservation of Endothelial GTP Cyclohydrolase I Activity and Improvement of Renal Nitric Oxide Availability Prevent the Development of Diabetic Nephropathy. 49th ERA-EDTA Congress, May 25, 2012, Paris, France
3. Kashihara, N, The Glycocalyx. Third International Symposium on Albuminuria, November 30, 2011, Groningen, the Netherlands

4. Nagasu, H, Satoh, M, Kuwabara, A, Kidokoro, K, Tomita, N, Sasaki, T, Kashihara, N, Implications of Oxidative Stress Derived from Endothelial NAD(P)H Oxidase in the Development of Diabetic Nephropathy. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, November 11, 2011, Philadelphia, USA
5. Nagasu, H, Satoh, M, Kidokoro, K, Tomita, N, Sasaki, T, Kashihara, N, Cyclic GMP Dependent Protein Kinase-Akt Pathway is Essential for Compensatory Renal Hypertrophy and Maintenance Renal Function After Unilateral Nephrectomy. World Congress of Nephrology 2011, April 10, 2011, Vancouver, Canada
6. Nagasu, H, Satoh, M, Tomita, N, Sasaki, T, Kashihara, N, Nitric Oxide Induces Tubular Cell Hypertrophy Via Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase in Rat Compensatory Renal Hypertrophy. American Society of Nephrology Renal Week 2010, November 19, 2010, Denver, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏原 直樹 (KASHIHARA NAOKI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：10233701

(2) 研究分担者

富田 奈留也 (TOMITA NARUYA)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70314432
佐藤 稔 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70449891