

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790810

研究課題名（和文）慢性腎臓病における心病変進展と酸化ストレスの影響

研究課題名（英文）Influence of oxidative stress on the progression of cardiac disease in chronic kidney disease

## 研究代表者

藤井 秀毅 (FUJII HIDEKI)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60416211

## 研究成果の概要（和文）：

今回の研究で、慢性腎疾患（CKD）では酸化ストレスが亢進しており、更にそれが腎障害および心血管系の障害も促進させる機序を解明することを目的とした。平成21年度は、アドリアマイシン+片腎摘、5/6腎摘によるCKDモデルラットを用いた実験を、平成22年度は、2型糖尿病モデルラットを用いた実験を行い、酸化ストレスとこれらの障害の機序を調べ、酸化ストレスの抑制が病変進展を抑制することを証明した。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study is to evaluate the oxidative stress and its relationship with kidney and cardiovascular disease in chronic kidney disease (CKD). In 2009, we performed the experiments using adriamycin CKD model rats and 5/6 nephrectomized CKD model rats. Furthermore, in 2010, we performed the experiment using type 2 diabetes model rats. In these experiments, we demonstrated the detailed mechanisms of the progression of kidney and cardiovascular lesions in CKD and the importance of suppression of oxidative stress for the progression.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腎臓内科

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病（CKD）、酸化ストレス、心腎関連、AST-120

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腎機能障害のみならず微量アルブミン尿でさえもが心血管系イベントのリスクファクターであることが認識されてきており、心腎連関が非常に注目されている。(Ritz E,

et al. J Am Soc Nephrol. 2004;15:513-516.)  
腎疾患と心疾患を合併した場合、非常にその予後が悪いことがわかってきており、実際の臨床の現場でも治療に非常に難渋している。しかしながら、心腎連関に関する病態機序は

非常に複雑であり、まだまだ解明されていないことが多々存在する。その原因の一つとして、慢性腎疾患では酸化ストレスが亢進しており、さらにそれが腎障害を進行させること、また心血管系の障害も促進させることが報告されている。我々は最近の臨床研究で、早期の高血圧性良性腎硬化症の患者において、血中ADMA濃度が腎機能、冠動脈予備能と有意な相関関係を認め、更に腎機能、冠動脈予備能もお互いに有意な相関関係を認めていることを報告した。(Fuji H, Takiuchi S, Fukagawa M, et al. Am J Hypertens. 21(6):650-656, 2008.) 更に我々の研究グループより、抗酸化物質であるチオレドキシンのトランスジェニックマウスにおいて糖尿病性腎症の進展が有意に抑制されることを報告した。(Hamada Y, Fukagawa M, et al. Nephrol Dial Transplant. 22(6):1547-1557, 2007.) このように酸化ストレスの心、腎障害への関連性は報告されているが、酸化ストレスの関係および治療介入によるこれらの変化を調べた臨床研究はほとんど存在しない。また、実験モデルにおいて、CKDにおける心病変進展における、酸化ストレスの関与、また薬剤介入による治療効果を示した研究もほとんど報告がない。

## 2. 研究の目的

我々は、心腎関連の病態機序において、重要な役割を果たしている物質として酸化ストレスに注目した。基礎研究として、CKDモデルにラットにおいて、酸化ストレス抑制薬投与により、その心病変進展抑制ができるかを調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

<平成 21 年度>

8 週齢の雄性 SD ラット (体重 250~270g) に、麻酔下にて少量のアドリアマイシン 3mg/kg を尾静脈内投与し、12 週齢の時点で

麻酔下にて右腎臓を摘出する。以上の処置により、CKD モデルラットを作成する。

14 週齢の時点で、これらのラットをコントロール群、治療群の 2 群に群分けする。群分け後、コントロール群には、粉末高蛋白食を与え、治療群には粉末高蛋白食+AST-120 8% を与えて飼育を行う。2 週ごとに血圧測定、代謝ケージを用いての一日蓄尿、採血を行う。

20 週齢の時点で麻酔下にて、sacrifice を行う。採血を行った後、心臓、腎臓を摘出する。群分け時、sacrifice 前日に代謝ケージにて 1 日蓄尿を、また、群分け時、剖検の際に血液採取を行い、生化学項目測定、及び ELISA 法にて血清、尿中インドキシル硫酸、尿中 8-OHdG、尿中アクロレイン、尿中 NO<sub>x</sub>、血清 LPO などの酸化ストレスマーカーおよび ADMA を測定する。

摘出した心臓、腎臓を用いて、重量、組織の評価などを行う。また、心臓、腎臓より RNA を抽出し、eNOS の発現、ADMA の合成酵素である PRMT-1、PRMT-3、そして分解酵素である DDAH の mRNA の組織での発現を RT-PCR 法を用いて調べる。組織学的検討では、アザン染色により心筋の線維化、冠微小血管周囲の線維化、腎間質の線維化の程度によりスコアリングを行い、その障害度を評価する。また 8-OHdG、アクロレインなどの免疫染色を行い、その陽性細胞数をカウントすることによって酸化ストレスの評価を行う。更にこれらの結果と尿中、血中の酸化ストレスマーカーの関係を調べる。

<平成 22 年度>

8 週齢の雄性 SD ラット (体重 250~270g) に、麻酔下にて左腎の 2/3 に切除術を施行する。その 1 週間後、9 週齢の時点で反対側の右腎摘出術を行い、以上の処置により、5/6 腎摘 CKD モデルラットを作成する。

14 週齢の時点で、これらのラットをコントロール群、治療群の 2 群に群分けする。群分け後、コントロール群には、粉末高蛋白食を与え、治療群には粉末高蛋白食+AST-120 8% を与えて飼育を行う。2 週ごとに血圧測定、代謝ケージを用いての一日蓄尿、採血を行う。

20 週後の 34 週齢の時点で麻酔下にて、sacrifice を行う。採血を行った後、心臓、腎臓を摘出する。群分け時、sacrifice 前日に代謝ケージにて 1 日蓄尿を、また、群分け時、剖検の際に血液採取を行い、腎機能、一日尿蛋白量、生化学項目測定、及び ELISA 法にて血清、尿中インドキシル硫酸、尿中 8-OHdG、尿中アクロレイン、尿中 NO<sub>x</sub>、血清 LPO などの酸化ストレスマーカーなどを測定する。

摘出した心臓、腎臓を用いて、重量、組織の評価などを行う。心臓、腎臓より RNA を抽出し、eNOS の発現、ADMA の合成酵素である PRMT-1、PRMT-3、そして分解酵素である DDAH の mRNA の組織での発現を RT-PCR 法を用いて調べる。組織学的検討では、アザン染色により心筋の線維化、冠微小血管周囲の線維化、腎間質の線維化の程度によりスコアリングを行い、その障害度を評価する。また 8-OHdG、アクロレインなどの免疫染色を行い、その陽性細胞数をカウントすることによって酸化ストレスの評価を行う。更にこれらの結果と尿中、血中の酸化ストレスマーカーの関係を調べる。

#### 4. 研究成果

アドリアマイシン+片腎摘、5/6 腎摘による CKD モデルラットを用いて、in vivo の系における酸化ストレスおよび心傷害についての検討を行った。CKD 群では、酸化ストレスは血中および心組織中で有意に上昇しており、その傷害度と有意な相関関係を示して

いた。尿毒症物質を吸着して腎不全の進行を遅らせることがわかっている経口吸着活性炭 (AST-120) は、酸化ストレスを抑制することが近年報告されている。これら CKD モデルラットに対して、この投与を行ったところ、酸化ストレスが有意に抑制され、心肥大および心臓の傷害も改善することがわかった。

更に CKD の原因として重要である糖尿病性腎症における酸化ストレスの関与を調べるため、非肥満 2 型糖尿病モデルラット (SDT ラット) を用いて、その病態解明のための実験を行った。早期の糖尿病性腎症では、酸化ストレスおよび NO が上昇し、これらが相互作用を起こし、ニトロストレスを亢進させ、腎障害進展に関係していることがわかった。また尿毒症物質の 1 つである Asymmetric dimethylarginine (ADMA) の血中レベルが上昇しており、この分解酵素である Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH- I、DDAH- II) の発現が低下していた。ADMA は、心血管疾患と深く関わっており、酸化ストレスを亢進させることが知られている。我々の研究結果からは、この ADMA も早期の糖尿病性腎症において腎症進展に関わっている可能性が推測された。

#### 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 3 件)

① Fujii H, Nakai K, Fukagawa M. Role of oxidative stress and indoxyl sulfate in progression of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Ther Apher Dial.* 15:132-134, 2011.

② Fujii H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Am J Nephrol.* 31:342-352, 2010.

③Fuji H, Nishijima F, Goto S, Sugano M, Yamato H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 24:2082-2088, 2009.

〔学会発表〕(計 3 件)

①藤井秀毅, 第 55 回 日本透析医学会総会 国際シンポジウム 「Role of indoxyl sulfate and oxidative stress in the progression of cardiac damage in chronic kidney disease」 2010.6.18.

②Fuji H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oxidative and nitrosative stress are associated with the progression of diabetic nephropathy in non-obese type 2 diabetes. *International Society of Nephrology, NEXUS*, 2010.4.17.

③藤井秀毅, 濱田康弘, 駒場大峰、北澤理子、北澤荘平、深川雅史. 第 52 回日本腎臓学会学術総会 2009.6.7

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 秀毅 (FUJII HIDEKI)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60416211

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者