

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02355

研究課題名（和文）酸化ストレスがもたらす腎臓近位尿細管の微細構造障害メカニズムの解明とその治療

研究課題名（英文）The mechanism of microstructural damage of the proximal tubule of the kidney caused by oxidative stress

研究代表者

米澤 智洋（Yonezawa, Tomohiro）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：10433715

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,890,000円

研究成果の概要（和文）：猫は慢性腎臓病の罹患率が高い。本研究では、慢性腎臓病の進行と酸化ストレスの関係を明らかにするとともに、5-アミノレブリン酸（5-ALA）による治療介入の可能性について評価することを目的とした。猫の腎上皮細胞による実験、ALAS1発現低下マウスを用いた実験、実験猫を用いた安全性・有効性試験、慢性腎臓病に罹患した猫に対する臨床試験を実施した。酸化ストレスは腎臓近位尿細管のミトコンドリア障害を引き起こすこと、慢性腎臓病は血中の酸化ストレスマーカーの上昇を引き起こすこと、5-ALAの投与はそうした酸化障害の一部を軽減することが示された。本研究の成果は猫だけでなく人類の慢性腎臓病の理解や治療にも役立つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、猫の慢性腎臓病の進行過程において酸化障害が糸球体の基底膜の構造や近位尿細管のミトコンドリア機能を犯すことを示した点で学術的意義がある。また、抗酸化物質の一つである5-ALAを合成する代謝酵素の不全が腎臓病を増悪し、5-ALAを経口投薬することによってこれを改善しうることを示したことは、治療法の開発に直結する点で社会的な意義がある。さらに、猫を用いた安全性試験および症例を用いた臨床試験を実施したことにより、これらの成果の社会的な意義の高さが裏打ちされている。

研究成果の概要（英文）：Cats have a high incidence of chronic kidney disease (CKD). In this study, we aimed to clarify the relationship between the progression of chronic kidney disease and oxidative stress, and to evaluate the possibility of therapeutic intervention with 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Feline renal epithelial cells, ALAS1 (+/-) mice, healthy experimental cats, and clinical patients with chronic kidney disease were used. The results suggest that oxidative stress could cause mitochondrial damage mainly in the renal proximal tubules, that some definitive oxidative stress markers increase in the CKD cats, and that administration of 5-ALA could alleviate the oxidative damage. These findings should be useful for understanding and treating chronic kidney disease not only in cats but also in humans.

研究分野：獣医学

キーワード：慢性腎臓病 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎臓病は小動物臨床において頻繁に遭遇する疾患で、特に猫では7歳以上の3割以上が罹患している。急性腎障害であれば部分的に回復することもあるが、残った障害は慢性腎臓病へと進行し、失われた機能は回復しないとされている。このため、急性腎障害でも慢性腎臓病でも、いかに腎臓病を初期の状態に把握し、発症や進行を防ぐかが治療の重要なポイントとなる。

(2) 腎臓病の発症や進行には、ネフロンにおける酸化ストレスが大きく関わっていることが知られているが、ネフロンは複雑な構造であることから、どの細胞のどの障害が腎臓病の発症・進行に根源的に重要なのか、詳細な発症メカニズムは分かっていない。

(3) 本研究の代表者はこれまで、抗酸化物質の一つである5-アミノレブリン酸(5-ALA: 5-aminolevulinic acid)に着目して研究を進めてきた。5-ALAは食事性に摂取されるか、細胞内の合成酵素ALAS1(Aminolevulinic acid synthase 1)によって合成されるアミノ酸の一種で、ミトコンドリア呼吸鎖複合体やシトクロームCの構成要素となることで強い抗酸化作用を持つ。

(4) 研究代表者らは、予備実験により、ALAS1ホモ欠損マウスは胎生致死となるが、ALAS1をヘテロ欠損させたマウスでは腎臓の近位尿細管上皮細胞に病変の生じることを見出した。この結果は、5-ALA低下状態がもたらす酸化ストレスを引き金とした腎臓病の発症機序が存在する可能性を示している。

2. 研究の目的

酸化ストレスは、如何にして腎臓の近位尿細管を傷害し、腎臓病を発症・進行させるのかを学術的な問いとした。下記に示す実験手法を用いて、腎臓病の酸化障害による発症機構を明らかにすること、効果的な腎臓病早期診断マーカーを発見すること、さらにはそれらが5-ALAの補充によって改善可能かを調べ、猫の腎臓病の発症予防法・治療薬を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験1: 猫腎上皮細胞培養実験系を用いた酸化ストレス条件が細胞にもたらす影響

猫腎上皮細胞株(CRFK cells)実験系を用いて、過酸化水素の添加などによる酸化ストレス負荷が尿細管の機能、形態、5-ALA代謝、酸素消費速度に及ぼす影響を、蛍光ライブ・セル・イメージング・デバイスや免疫染色、酵素活性測定、分子生物学的手法などを用いて、形態・機能の両側面から明らかにすることとした。酸化ストレスマーカーには、8-ヒドロキシ・デオキシグアノシン(8-OHdG)、過酸化脂質、スーパー・オキシド・ジスムターゼ(SOD)活性などといった一般的な指標だけでなく、5-ALA代謝と関連の深いポルフィリンIX(PpIX)、ミトコンドリア呼吸鎖複合体およびシトクロームCの活性、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)、Keap1-Nrf2制御系の変動などを測定した。

(2) 実験2: ALAS1遺伝子改変マウスを用いた酸化ストレスが近位尿細管に及ぼす病態の解明

ALAS1ホモ欠損マウスは胎生致死となるが、ALAS1をヘテロ欠損させたマウスは一見正常に生まれ、成長、繁殖できる。本研究では、ALAS1ヘテロ欠損マウスの血中尿素窒素やクレアチニン、尿中アルブミン濃度、腎組織の形態的観察を経時的に行い、ALAS1の発現低下が腎機能に及ぼす影響を観察した。

(3) 実験3: 猫の臨床症例を対象とした新しい腎臓病早期診断法・予防/治療薬の開発

1. 腎臓病の猫の病理組織における近位尿細管と酸化ストレス障害の関係について観察した。特殊染色だけでなく、実験1、2で調べた蛋白質の免疫組織化学染色や電子顕微鏡による微細構造の観察を行い、実験2の結果との共通点と相違点を洗い出した。

2. 東京大学附属動物医療センターに訪れた腎臓病の猫の尿および血漿を収集した。検体は通常診療で採取されたものの余剰分を利用した。IRISの腎臓病ステージ分類に則って、初期のものから重度に進行した腎臓病まで幅広く収集した。これらの検体について、8-OHdGやMDA濃度を測定し、臨床的な有用性を評価した。

3. 腎臓病の猫の症例に5-ALAまたはその関連物質を投与する臨床試験を実施した。組み入れ基準はIRISステージ2~3の腎臓病の猫とした。2か月間の5-ALAの投薬の前後で、腎臓病の病態改善や進行の抑止ができるかを評価した。

4. 研究成果

(1) 実験1ではCRFKに酸化ストレスを負荷することにより、細胞増殖能の低下、アポトーシス細胞の増加、8-OHdG、SOD1、4HNEの上昇といった酸化障害がヒトの細胞と同様に生じることが明らかになった。この実験系の確立により、猫の腎上皮細胞に対する酸化ストレス条件における遺伝子発現や細胞障害の程度を評価することが*in vitro*環境にて実施することが可能になった。

5-ALA を培養液中に添加すると、酸化ストレスマーカーの発現は減少し、細胞数の低下が抑制された。この結果からも、上記の実験系の有用性が示されたと考えられる。

(2) 実験 2 では、ALAS 1 ヘテロ欠損マウスは中年齢（28 週齢）では腎数値の上昇がみられるとともに、尿蛋白の増加が認められた。さらに、8-OHdG や MDA の上昇といった酸化障害、GFR の低下など、腎機能の低下が観察された。組織学的にも、糸球体基底膜の肥厚や尿細管上皮細胞のミトコンドリアの萎縮と障害が特徴的に認められた。さらにこの病変がミトコンドリアの障害に伴い生じるラメラ小体であることを確認した。こうした病理変化は、慢性尿細管間質性腎炎の多い、猫の慢性腎臓病の病態とよく合致する。微細形態学的なもののみならず、PAS 染色やマッソントリクローム染色により、尿細管に障害が生じていることを確認した。そして、この動物に 5-ALA を反復投与すると、これらの病変は改善した。病変の一部は可逆的であり、慢性腎臓病と評価される状況であっても、5-ALA の投与によって一定の治療効果があることを明らかにした。

(3) 実験 3 - 1 では、自然発症した腎臓病の猫の病理組織における近位尿細管と酸化ストレス障害の関係について観察するために、試料集めを行った。慢性腎臓病でなくなった猫の多くは剖検されることがないため、試料の採取は予想以上に困難であった。各大学の病理部門、および民間の検査会社に打診し、慢性腎臓病各ステージの腎臓を数例ずつ収集した。病理組織学的に慢性間質性腎炎とされた猫 22 例、および対照として著変なしとされた剖検猫 3 例の腎臓を用いた。その結果、猫の腎組織において、8-OHdG は糸球体および近位尿細管、4-HNE は遠位尿細管および集合管、SOD1 は近位尿細管の一部で主に陽性シグナルが認められた。陽性面積を定量し比較したところ、各分子とも群間で統計的有意差は認められなかったが、中等度以上の慢性間質性腎炎の群において、8-OHdG および 4-HNE の陽性面積が特に大きかった症例がそれぞれ 16 例中 3 例ずつ認められた。この成果はいずれも本研究の目的である酸化ストレスがもたらす腎臓近位尿細管の微細構造障害メカニズムの解明とその治療を進展させるのに繋がると期待される。

(4) 実験 3 - 2 では、猫慢性腎臓病の臨床検体における酸化ストレスの状況を調べるために、剖検または腎生検による検体を用いてその酸化状態を比較した。免疫組織化学では、8-OHdG は糸球体および近位尿細管、4-HNE は遠位尿細管および集合管、SOD1 は近位尿細管の一部で主に陽性シグナルが認められた。陽性面積を比較したところ、中等度以上の慢性間質性腎炎の群において 8-OHdG および 4-HNE の陽性面積の大きい症例が一部認められた。腎臓病の猫の血液および尿中の 8-OHdG と MDA の濃度が慢性腎臓病の猫で増加しており、病気が進むにつれて上昇傾向にあることが明らかになった。猫における精度の高い腎臓病の酸化ストレスマーカーは存在せず、これが確立すれば臨床上大変有意義であると考えられる。また、酸化ストレスマーカーの一つである血中 / 尿中マロンジアルデヒド (MDA) の測定系を見直し、感度を 100 倍程度改善することに成功した。本年度に得られた。

(5) 実験 3 - 3 では、猫を用いて安全性を確認したうえで、東京大学附属動物医療センターにて臨床試験を実施した。安全性試験では、5-ALA を高用量にした際に一部の猫で肝酵素の上昇が認められた。しかし投与を終了すると数か月で肝酵素値は基準値まで減少した。以上より、5-ALA の使用では可逆性の肝酵素上昇が有害事象として注意する必要があることを明らかにした。続いて臨床試験では慢性腎臓病に罹患した猫に 5-ALA を 2 か月投薬し、血液検査、尿検査を行い、その薬効について評価した。血液検査、尿検査では 2 か月で腎臓病の進行を認めなかった。一部の症例では高かった尿蛋白の低下が認められた。投薬前と投薬後の 8-OHdG を比較すると、投薬前には健康猫より高かった血中 8-OHdG 濃度が、投薬後では減少していることが明らかになった。この結果は、抗酸化物質、特に 5-ALA が慢性腎臓病における酸化ストレスを軽減し、病気の進行の抑制に役立つ可能性があることを示している。

(6) まとめると、本研究の結果は、猫の慢性腎臓病の進行過程において、酸化障害が糸球体の基底膜の構造や近位尿細管のミトコンドリア機能を犯すことを端的に明らかにした。抗酸化物質の一つである 5-ALA を合成する代謝酵素の不全はこれを増悪し、慢性腎臓病を進行させる一因になりえることが明らかになった。さらには、5-ALA を経口投薬することによって、酸化ストレス状態が改善し、慢性腎臓病の進行を抑制する可能性も示された。すなわち酸化ストレスによる腎臓組織内の病変の一部は可逆的であり、慢性腎臓病と評価される状況であっても抗酸化物質の投与によって一定の治療効果があることが期待される。本研究で得られた成果はいずれも本研究の目的である酸化ストレスがもたらす腎臓近位尿細管の微細構造障害メカニズムの解明とその治療を進展させるのに繋がり、今後の慢性腎臓病の治療薬開発に役立つと考えられる。

<引用文献>

下記を参照。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 KOBAYASHI Yui, NAKAMURA Tatsuro, YONEZAWA Tomohiro, KOBAYASHI Koji, MURATA Takahisa	4. 巻 83
2. 論文標題 The profile of urinary lipid metabolites in cats with bacterial cystitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1977 ~ 1981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kaji Kenjiro, Yonezawa Tomohiro, Momoi Yasuyuki, Maeda Shingo	4. 巻 12
2. 論文標題 Detection of Canine Urothelial Carcinoma Cells in Urine Using 5-Aminolevulinic Acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 485 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani12040485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 HIROSE Yui, UCHIDA Mona, TSUBOI Masaya, NAKAGAWA Takayuki, YAGA Leo, MAEDA Shingo, MOMOI Yasuyuki, KURIKI Yugo, KAMIYA Mako, URANO Yasuteru, YONEZAWA Tomohiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Rapid visualization of mammary gland tumor lesions of dogs using the enzyme-activated fluorogenic probe; -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 593 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishi R, Uchida M, Nakahara M, Maeda S, Hayashi A, Iwatani N, Tanaka T, Yonezawa T	4. 巻 11
2. 論文標題 Adverse effect of repeated treatment with 5-aminolevulinic acid in healthy cats and those with chronic kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ALA-Porphyrin Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TAKENOUCHI Shinya, KOBAYASHI Yui, SHINOZAKI Tatsuya, KOBAYASHI Koji, NAKAMURA Tatsuro, YONEZAWA Tomohiro, MURATA Takahisa	4. 巻 84
2. 論文標題 The urinary lipid profile in cats with idiopathic cystitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 689 ~ 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishi Reo, Harada Airi, Hori Koji, Maeda Shingo, Momoi Yasuyuki, Yonezawa Tomohiro	4. 巻 25
2. 論文標題 8-Hydroxy-2 -deoxyguanosine and malondialdehyde in plasma and their association with disease severity in 20 cats with chronic kidney disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Feline Medicine and Surgery	6. 最初と最後の頁 942 ~ 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1098612X231173519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shiori, Hori Koji, Tanabe Gaku, Maeda Shingo, Momoi Yasuyuki, Yonezawa Tomohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of diazoxide on a cat with insulinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/20551169231220290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤志織, 田辺岳, 前田真吾, 桃井康行, 米澤智洋
2. 発表標題 持続的な低血糖の管理にジアゾキッドを用いたインスリノーマ疑いの猫の1例
3. 学会等名 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 今尾賢人, 山本貴恵, 中川泰輔, 川口悠爾, 橋本裕子, 茂木朋貴, 前田真吾, 米澤 智洋
2. 発表標題 不完全型重複腎盂尿管と診断された猫の一例
3. 学会等名 第15回 獣医腎泌尿器学会学術集会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 堀甲二, 西玲央, 原田愛理, 前田真吾, 桃井康行, 米澤智洋
2. 発表標題 慢性腎臓病の猫の尿中および血漿中8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン濃度
3. 学会等名 日本獣医臨床病理学会2022年次大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 米澤智洋
2. 発表標題 ネコの膀胱炎バイオマーカー
3. 学会等名 第 41回 日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 米澤智洋
2. 発表標題 排尿障害の診断アプローチと内科治療
3. 学会等名 第20回日本獣医内科学アカデミー学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 米澤智洋
2. 発表標題 IRIS CKDガイドライン2023をもとに考える腎臓病の食事管理
3. 学会等名 日本臨床獣医学フォーラム第4回名古屋地区大会
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柏原 直樹 (Kashihara Naoki) (10233701)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	桃井 康行 (Momoi Yasuyuki) (40303515)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	
研究分担者	中島 修 (Nakajima Osamu) (80312841)	山形大学・医学部・教授 (11501)	
研究分担者	前田 真吾 (Maeda Shingo) (80755546)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------