

## 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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590199

 研究課題名（和文）腎尿細管液の酸性化とアルブミン尿による腎障害機序の解明と  
新規腎臓病治療戦略の開発

 研究課題名（英文）Luminal alkalization attenuates proteinuria-induced oxidative  
damage in proximal tubular cells.

研究代表者

阿部 倫明（Abe Michiaki）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号：40400246

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病では、蛋白尿に伴う近位尿細管細胞酸化ストレス障害より間質線維化が生じると考えられている。腎内に生理的に生じる酸性環境は、生理的状态では問題ないが、慢性腎臓病下では、蛋白尿に伴う近位尿細管細胞の酸化ストレスを、Pyk2 を介した NAD(P)H oxidase 活性化を通じて増強すると考えられた。重炭酸イオンによる尿細管管腔内アルカリ化は、酸化ストレスの抑制を介して CKD の進展を抑制する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Renal interstitial fibrosis on chronic kidney disease, CKD is derived from reactive oxygen species owing in proximal tubular cells stimulated by proteinuria. Acid circumstance in physiological tubular lumen is not harmful in the kidney, however, the condition increases ROS generated by NAD(P)H oxidase via activation of Pyk2 in CKD with proteinuria. Intraluminal alkalization with bicarbonate is possible to prevent progression of CKD by inhibition of intrarenal ROS generation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：腎生理学、慢性腎臓病、尿細管、酸・塩基平衡、酸化ストレス、蛋白尿、尿アルカリ化

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は、成人の約 8 人に 1 人が罹患し、その進行に伴い心血管病死が増加、末期腎不全に至れば透析療法をはじめとした腎代替療法が必要となることから昨今、注目を浴びている。本疾患の進行を抑制することで、これら合併症を防ぐことが重要であるが、従来の治療法のみではいまだ達成できておらず、新規の慢性腎臓病治療法を開発することが急務となっている。

慢性腎臓病の原因は多岐に渡るが、尿細管間質傷害を共通の進行機序として進行する。尿細管間質傷害を起こす重要な原因として、蛋白尿とくに脂肪酸結合アルブミンが近位尿細管で再吸収を受ける際に生じる酸化ストレスが重要であることがわかってきた。

ここで、私が着目したのが、腎臓は体液の恒常性を保つために複雑な構造を持ち、その結果、自らを犠牲にするかのごとくに腎内が劣悪な環境に生理的にさらされている点で

ある。特に、体液の酸塩基平衡の維持においては、酸血症を認めない生理的な状態においても腎近位尿細管が、重炭酸イオンを再吸収する結果、尿細管管腔内は pH6.4 前後の著明な酸性環境に曝され、尿細管細胞内も酸性化されている。さらに、近位尿細管細胞内に存在する pH センサー分子、proline rich tyrosine kinase2 (Pyk2) は、活性酸素種産生のメディエーターとして注目を受けている。これらの事実より、この腎内酸性環境が脂肪酸結合アルブミンによる活性酸素 ( $O_2\cdot^-$ ) 産生を増悪させるのではないかと、そしてこの酸性環境をアルカリ化することで酸化ストレスの蓄積が抑制できるのではないかとという仮説を考えた。本研究では in vitro および in vivo の蛋白過剰負荷モデル系を用いて酸性環境が酸化ストレス蓄積に及ぼす影響について検討を行った。

## 2. 研究の目的

尿中アルブミン排泄は、慢性腎臓病の有無を推定するための有用な指標である。近年、アルブミン尿が全身血管の内皮障害を反映することが示されてきた。しかしながら、逆に『アルブミン尿、すなわち大量のアルブミンが尿細管を灌流している状態が、腎障害を進行させる』という病因になっている可能性は無いのだろうか？アルブミン尿が腎臓病の単なる結果にすぎないのか、悪化因子であるのかは、未だ不明である。このアルブミン尿による腎障害機序が明確にするために、申請者は、アルブミン尿による尿細管障害の発生機序に、(糸球体を濾過された)原尿の pH が尿細管腔を通過していく間に劇的に低下する腎臓特異的な生理現象の関与に着眼した。糸球体濾過時、原尿の pH は血清と同じ (pH 7.4 付近) であるが、尿細管を通過していく間に、酸性老廃物が排出され、尿排出時の pH は通常 5.5-7.0 にまで低下する。アシドーシスの病態下では、尿 pH は 5.5 以下にまで低下する。このような酸性化された尿細管液が、腎内に存在しても大丈夫なのかどうか、その生理的・病態的意義は未だよく分かっていない。そこで、申請者は、尿細管内において、尿の酸性化がアルブミン尿による酸化ストレス産生を増加させ、腎障害を進行させることを仮説にその機序を明らかにし、新規の腎臓病治療戦略を開発することを目的とする。

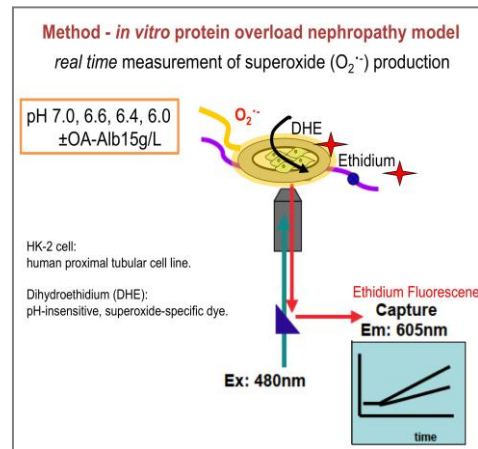
## 3. 研究の方法

### in vitro 実験

(1) ヒト尿細管由来培養細胞株 (HK-2 細胞) に脂肪酸結合アルブミン、特に慢性腎臓病患者尿中で最多であるオレイン酸結合アルブミン OA-Alb を投与し、その際に生じる活性酸素  $O_2\cdot^-$  産生を、 $O_2\cdot^-$  感受性蛍光色素 Dihydroethidium を用いて蛍光顕微鏡下で

real time に測定した。

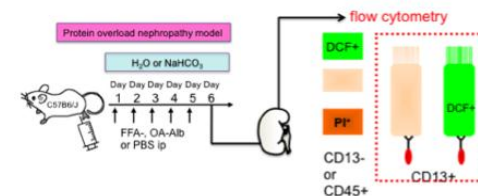
(2) Pyk2 の siRNA で HK-2 細胞の Pyk2 発現をノックダウンし、OA-Alb を投与し、その際に生じる活性酸素  $O_2\cdot^-$  産生を、real time に測定した。



### in vivo 実験

(3) 蛋白尿による尿細管間質傷害モデルであるマウス蛋白過剰負荷モデル (マウス腹腔内に脂肪酸結合アルブミンを投与、近位尿細管細胞に蛋白が負荷され尿細管間質傷害が生じる) の作成。マウス蛋白過剰負荷モデルで OA-Alb 投与 6 週目に、Flow cytometry にて、CD13 陽性 CD45 陰性の近位尿細管細胞にどれくらいの細胞内活性酸素種 (DCF 染色) が蓄積するかを観察した。

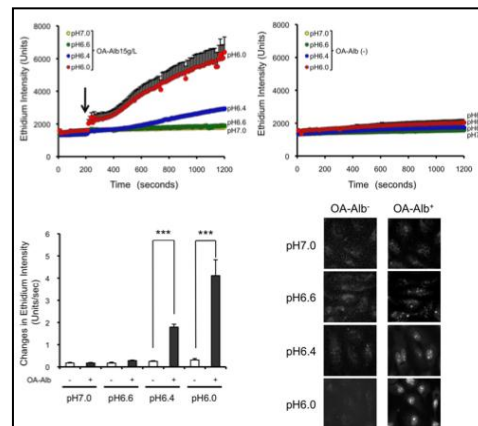
(4) 免疫組織染色にて DNA の酸化傷害を示す 8-OHdG を検出した。



## 4. 研究成果

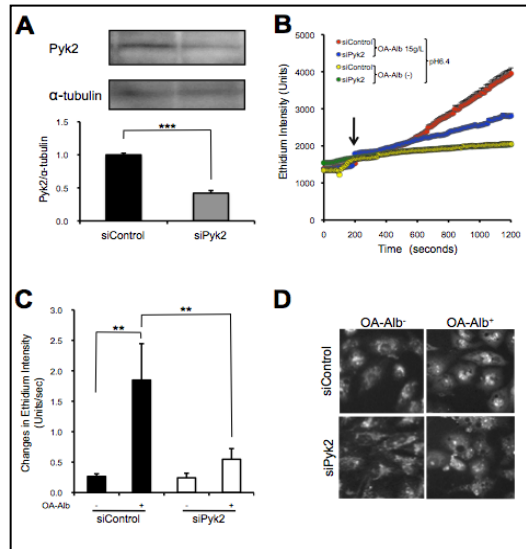
### in vitro 実験

(1) OA-Alb 刺激にて HK-2 細胞内に  $O_2\cdot^-$  産生が増加し、本産生は pH 依存性を示し酸性環境下で著明に上昇した。



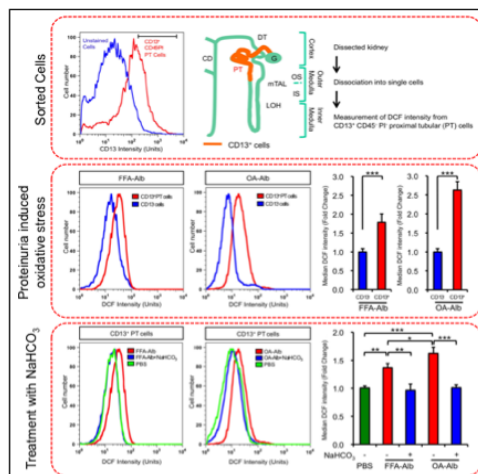
蛋白尿による酸化ストレス蓄積への酸性環境の影響 (in vitro 蛋白過剰負荷モデル) OA-Alb 刺激による HK-2 細胞内の酸化ストレス (活性酸素感受性蛍光色素 Dihydroethidium を用いて検出) は酸性環境で著明に増加した。

(2) この  $O_2^{\cdot-}$  産生は Pyk2 の siRNA ノックダウンにて有意に抑制された。



in vivo 実験

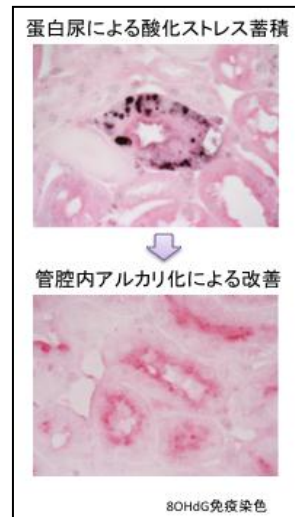
(3) 酸性環境が OA-Alb による  $O_2^{\cdot-}$  産生を Pyk2 の活性化を通じて相加的に増強することを証明した。さらに、マウス蛋白過剰負荷モデル (マウス腹腔内に脂肪酸結合アルブミンを投与、近位尿細管細胞に蛋白が負荷され尿細管間質傷害が生じる実験モデル。蛋白尿による尿細管間質傷害モデルとして頻用される。) において、OA-Alb 投与により著明な尿細管間質傷害が生じ、近位尿細管細胞 (CD13 陽性) に細胞内活性酸素種の蓄積が Flow cytometry にて観察された。



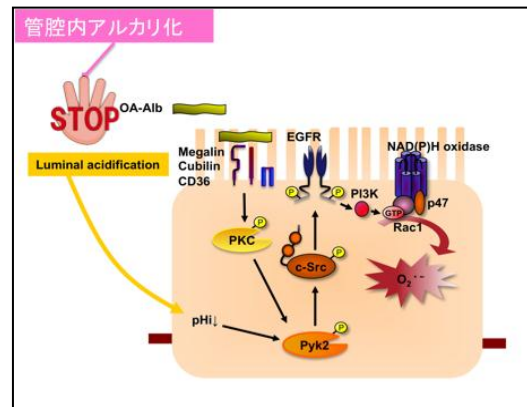
フローサイトメトリーを用いた近位尿細管細胞内酸化ストレス測定 (in vivo 蛋白過剰負荷モデル)

マウスに脂肪酸結合アルブミンを負荷し、腎を単離、フローサイトメトリーにて CD13 陽性細胞を分離した。CD13 陽性細胞 (近位尿細管細胞) に活性酸素感受性蛍光色素 DCFDA を用いて酸化ストレスが蓄積していることを検出し、尿アルカリ化にて、その蓄積が改善することがわかった。

(4) 免疫組織染色にて蛋白尿の多い時には近位尿細管細胞に強い DNA 酸化傷害 (8-OHdG) 蓄積を認めた。この障害は重曹内服によって改善した。



(5) この酸化ストレス傷害は、炭酸水素ナトリウム飲水による尿細管管腔内のアルカリ化にて著明に改善し、尿アルカリ化による腎内酸性環境の改善という新規治療法の可能性を示すことができた。



管腔内アルカリ化による酸化ストレス改善に基づく新規慢性腎臓病治療法

## 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6件)

- ① 阿部倫明、総論：血管エコーサマリー記載の注意点；・右腎動脈狭窄症（動脈硬化性）、・右腎動脈狭窄症（線維筋性異形成）、Vascular Lab.、査読無、10巻、2013年、75-82
- ② 阿部倫明、血液浄化法の選択について、どう説明するか、Midicina、査読無、49巻、2011年、1938-1943
- ③ Souma T, Abe M, et al.、Luminal alkalinization attenuates proteinuria-induced oxidative damage in proximal tubular cells.、J Am Soc Nephrol.、査読有、22(4)巻、2011年、635-648、DOI:10.1681/ASN.2009111130
- ④ 阿部倫明、佐藤寿伸、庵谷尚正、田熊淑男、【特集】ワンランク上の泌尿器科エマージェンシー、腎梗塞、「臨床泌尿器科」、査読無、65(1)巻、2011年、39-47
- ⑤ 阿部倫明、伊藤貞嘉、【特集】データブック アテローム血栓症の大規模臨床試験、Part3、動脈硬化性腎動脈狭窄症と腎機能障害の患者におけるステント留置療法、血栓と循環、査読無、19(1)巻、2011年、313-316
- ⑥ Abe M, Toyohara T et al.、The HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin stimulates insulin secretion through organic anion transporter polyperptides.、Drug Metabolism and Pharmacokinetics、査読有、25巻、2010年、274-282

[学会発表] (計7件)

- ① 阿部倫明、話し合う腎臓：糸球体/尿細管クロストーク：蛋白尿がつなが糸球体と尿細管障害、日本腎臓学会学術総会（招待講演）、2012年6月1日～2012年6月3日、横浜
- ② 阿部倫明、「機能診断」としての血管エコーを活かす：腎動脈エコーによる慢性腎臓病の診断と評価、日本超音波医学会（招待講演）、2012年5月25日～2012年5月27日、東京
- ③ 阿部倫明、他3名、両側腎動脈狭窄症と水腎症・大動脈周囲炎が合併した急性腎不全の1例、第41回日本腎臓学会東部会、2011年9月6日、東京
- ④ 阿部倫明、他8名、長期/大量のRAS系阻害薬投与後にJG細胞の増生が認められたIgA腎症の1例、第54回日本腎臓学会総会、2011年6月17日、横浜
- ⑤ 阿部倫明、他5名、腎動脈狭窄症による

末期腎不全に対する腎動脈拡張術の可能性、第56回日本透析医学会総会、2011年6月18日、横浜

- ⑥ 相馬友和、阿部倫明、尿細管管腔内アルカリ化は蛋白尿による近位尿細管細胞酸化ストレスをPyk2経路を介して改善させる、日本心臓血管作動物質学会、2011年2月4日～2011年2月5日、香川
- ⑦ Souma T, Abe M, et al.、Luminal Alkalinization Attenuates Ssuperoxide Production Induced by Fatty acid-bound Albumin in Renal Proximal Tubular Cells Through Pyk2-dependent Pathways.、American Society of Nephrology, Renal Week 2010.、2010年11月19日、デンバー  
アメリカ

[図書] (計1件)

- ① 阿部倫明、田熊淑男、診断と治療社、「腎動脈狭窄症の診断；『腎動脈ステント留置術ハンドブック. [監修]横井』」、2011、26-35 ページ

[産業財産権]  
なし

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.nm-gcoe.med.tohoku.ac.jp/report/20110308/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 倫明 (ABE MICHIAKI)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授  
研究者番号：40400246

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし