

## 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 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590914

研究課題名（和文）糖尿病性微小血管障害の心腎連関の機序の解明：ナトリウム調節臓器としての腎臓の役割

研究課題名（英文）Mechanisms for crosstalk between kidney and heart on diabetic microangiopathy: roles of the kidney as an organ of Na homeostasis

研究代表者

武藤 重明（MUTO SHIGEAKI）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40190855

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症を発症したSpontaneously Diabetic Torii ratでは、1) 高血糖が引き金となり近位尿細管で過剰産生されたアンジオテンシンIIが同尿細管からのNa再吸収亢進を介して循環血漿量の増加/容量負荷を引き起こし、その結果左室心内膜下心筋細胞に限局してアンジオテンシンII過剰発現を誘導し、同部位の心筋細胞肥大を引き起こすこと、2) 肥大大心筋細胞は、慢性低酸素状態に陥り、早期には血管内皮増殖因子の過剰発現を介して毛細血管新生を促進することで代償するが、後期になると肥大大心筋細胞で過剰産生されたトロンプスポンジン-1が毛細血管新生を抑制することによって心筋線維化が出現することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：In Spontaneously Diabetic Torii rats developing diabetic nephropathy, 1) volume expansion/overload via the stimulatory effect of angiotensin II overproduced in proximal tubules on the tubules' Na reabsorption induced angiotensin II upregulation only in left ventricular subendocardial cardiomyocytes, thereby leading to the development of cardiomyocyte hypertrophy, and 2) the cardiomyocyte hypertrophy promoted coronary angiogenesis in the early adaptive phase, but suppressed coronary angiogenesis in the late maladaptive phase, respectively, via vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 produced from hypertrophied cardiomyocytes under chronic hypoxia, leading to the development of interstitial fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：糖尿病、心臓微小血管障害、腎臓微小血管障害、組織アンジオテンシン II、腎臓 Na 輸送、容量負荷、心腎連関

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 欧米の先進諸国のみならず、わが国においても増加の一途を辿っている2型糖尿病(DM)では、腎症および心血管病の合併が多く、

致死率が高いため早期かつ効果的な対策が求められている。『糖尿病性心筋症』は、1972年心不全を起こした4名のDM患者で冠動脈が正常であったというRublerらの報告(Am J

Cardiol 30:595, 1972)に端を發し、冠動脈疾患や高血圧とは独立して起こる心機能障害と考えられている。心エコーによる機能的解析では、左室肥大や左室拡張能障害が認められ、心不全に至ると左室収縮能障害を伴うことが特徴である。組織学的解析では、心筋細胞肥大、微小血管障害、間質の線維化などによって心筋のリモデリングが起こる(Circ 115: 3213, 2007; Am J Med 121:748, 2008)。

(2) 2型DM性腎症ではアルブミン尿の程度が強くなると心血管イベント発症率が増加するなど、DM性心筋症と腎症とは並存することが多いが、心筋症の発症・進展に腎症がどのようにかかわっているのか、一方腎症の発症・進展に心筋症がどのように関与しているのか現時点では明らかでない。レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化など腎臓と心血管系に共通に作用する液性因子や、高血糖に端を發したグリケーション、ポリオール代謝経路の亢進、protein kinase Cの活性化、単球/マクロファージの浸潤、それらによって放出されたサイトカイン、血液凝固の亢進、細胞外マトリックス産生亢進、酸化ストレスなど複数の因子が両臓器障害に関与することが報告されているが、不明な点が多い。その理由として、第一に腎症や心筋症の発症・進展機序を1病期に限定した報告が大部分で、同時に上述の複数の因子が変動するため、どの因子が腎症や心筋症のイニシエーターになっているのか同定できないこと、第二に2型DMモデル動物で腎症や心筋症の発症・進展機序を個々の臓器で検討した報告が大部分で、両臓器障害を同時に検討した報告は皆無であること、第三に、腎症に加え、心筋症の発症・進展にも上記微小血管障害は重要と考えられているが、毛細血管に対するアプローチが極めて難しいことなどが挙げられる。

(3) 腎臓は元来、Na再吸収量を調節し細胞外液量を一定に保持している臓器で、これにはレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系や心房性Na利尿ペプチド(ANP)など腎臓や心臓で産生・調節されるホルモンが密接に関与している。こうした腎臓におけるNa再吸収の調節機序が破綻すると、細胞外液量増加を介して心血管系や腎臓そのものに重大な悪影響を及ぼすことが予想されるが、直接証明には至っていない。事実、DM患者やそのモデル動物では血中ANPレベルの上昇(J Hum Hypertens 8:451, 1994)とレニン-アンジオテンシン系の抑制(JASN 10:2382, 1999)が報告され、細胞外液量増加が示唆されている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、DMに伴って出現する腎症と心筋症を微小血管障害という観点から取り上げ、腎臓におけるNa再吸収調節機序の破綻による細胞外液量増加が両臓器障害の共通因子となりうることを証明することである。

(2) 本研究では、わが国を含め非肥満者の多いアジア地域で60%を超えるインスリン分泌不全によるヒト2型DMの病態を反映しているSpontaneously Diabetic Torii (SDT) ratをDMモデル動物として使用する。このモデルで、1) 心筋微小血管障害(毛細血管障害)や腎臓微小血管障害(糸球体障害)は出現するのか、2) アンジオテンシンII(AngII)受容体拮抗薬のオルメサルタン(Olm)またはインスリン(Ins)を投与し、このモデルの心筋症と腎症は改善するのか検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 雄性SDT ratの血糖値が250 mg/dLとなった時点をDM発症(0週)とし、SDT ratにvehicle投与群(SDT群)、SDT ratにOlm投与群(Olm群)、SDT ratにIns投与群(Ins群)に分け、同週齢の雄性Sprague-Dawley ratを対照(control群)とした。Olm群には0.01%Olm含有の粉末飼料を、一方SDT群、Ins群およびcontrol群にはOlm非含有の粉末飼料を自由摂食させた。Ins群は、尾静脈より微量の血液を採取し血糖値を測定後、ヒューマログN4単位/kg体重/日を皮下注射し、control群と同じレベルに血糖値を調節した。DM発症後0、8週、16週目の4群の動物で以下の実験を行った。

(2) ラット用尾動脈非観血的血圧測定装置(BP-98A、ソフトロン、東京)を用いて収縮期血圧を測定した。

(3) 心エコー(+パルスドップラー法)検査にて、左室収縮能と左室拡張能及び左室後壁厚、心室中隔厚、左室拡張末期径、左室収縮末期径を測定した。

(4) 4群のラットを個別に代謝ゲージ内で24時間飼育し、自由飲水・自由摂食条件下で、食餌摂取量や体重、尿量と、尿中クレアチニン、蛋白、Na濃度を測定した。

(5) 麻酔下で血液を下大静脈より採取し、血糖、血漿Ins、血漿レニン活性、血漿AngII、ANP、Naおよびクレアチニン濃度を測定した。上記の結果より、クレアチニンクリアランスと尿細管Na再吸収量を算出した。

(6) 摘出した心臓と右腎を、パラフィン切片用及び凍結切片用と、ホモジナイズ後 Western blot及び心臓/腎臓局所のAngII濃度測定用に分けた。パラフィン切片用と凍結切片用組織は、マイクロトームで4 $\mu$ mに薄切し下記の染色を行った。

① Hematoxylin-eosin染色にて、左室や右腎の形態的異常の有無を、Picro-sirius red染色にて左室各部位(心内膜下と心外膜下)の線維化の程度と心筋細胞の大きさ[いずれもコンピュータ画像解析ソフト(Image pro 6.2J;Media Cybernetics、USA)を用いて解析した]を評価した。

② 左室心筋組織を抗hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )抗体を用いて免疫組織化学染色(免疫染色)を行った。また、血管内皮細胞を抗rat endothelial cell antibody-1(RECA-1)(または抗von Willebrand factor[vWF]抗体)を用いて免疫染色した。抗RECA-1/抗vWF抗体陽性で1個の核を持つ細胞(血管内皮細胞)によって囲まれた直径8 $\mu$ m未満の管腔構造を毛細血管とし、単位面積当たりの毛細血管数を算出した。これがSDT群で増加した場合には、抗proliferating cell antigen (PCNA)抗体と抗RECA-1を用いて二重染色し、単位面積当たり増殖が亢進した毛細血管数を算出した。一方、単位面積当たりの毛細血管数がSDT群で減少した場合には、TUNEL法と抗RECA-1による二重染色にてアポトーシス陽性毛細血管数を算出した。

③左室心筋組織で産生されたAngII、血管内皮増殖因子(VEGF)、トロンボスポンジン-1(TSP-1)、ANPが心筋細胞由来であることを証明するため、抗心筋ミオシン抗体と各抗体を用いて二重染色を行った。

④右腎組織を、近位尿細管で等張性のNa再吸収に関与している管腔側膜のNa/H exchange isoform 3(NHE3)と、管腔側膜および基底側膜の水チャネルaquaporin 1(AQP1)の抗体を用いて免疫染色した。

⑤右腎組織で過剰産生されたAngIIが近位尿細管細胞由来であることを評価するため、抗AQP1抗体と抗AngII抗体による二重染色を行った。

(7) 心臓および腎臓局所のAngIIの定量をRIA法にて行った。

(8) 左室心筋組織のホモジネートを用いて Western blotを行い、VEGF、VEGF受容体2のリン酸化(pVEGFR2)、TSP-1、上皮増殖因子受容体(EGFR)とそのリン酸化(pEGFR)、Na/H exchange isoform 1(NHE1)、transforming growth factor- $\beta$  1(TGF- $\beta$  1)の発現を比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 食餌摂取量は、0週の時点でSDT群がcontrol群より有意に多かった。また、2群ともに食餌摂取量は8、16週と経時的に多くなったが、その程度はSDT群で著しく大きかった。

(2) 体重は、0週ではcontrol群とSDT群に有意差なく、その後control群は経時的に増加したのに対し、SDT群は減少した。

(3) 8・16週のSDT群の血糖値は、control群と比べ著明高値を示した。

(4) 心エコー検査で、8・16週のSDT群で左室拡張能障害と左室後壁厚の増加および16週のSDT群で左室収縮能障害を認めた。

(5) 尿蛋白やクレアチニンクリアランス、尿細管Na再吸収量、血漿ANP濃度は、いずれも8・16週のSDT群でcontrol群に比べ有意に増加した。

(6) 8週SDT群では左室心内膜下の心筋細胞面積、毛細血管密度と心筋細胞当たりの毛細血管数、PCNA陽性毛細血管数、HIF-1 $\alpha$ やVEGFの発現がcontrol群に比べ増加した。一方、16週SDT群では心筋細胞面積とHIF-1 $\alpha$ やVEGF発現増加に加え、左室心内膜下の毛細血管密度と心筋細胞当たりの毛細血管数の減少、TUNEL陽性毛細血管数及び血管新生抑制因子のTSP-1発現とANP発現の増加を認めた。16週SDT群では、VEGF、TSP-1、ANPはいずれも抗心筋ミオシン抗体と共発現を認め、心筋細胞由来であることが証明された。

(7) 左室心内膜下の心筋線維化率は16週SDT群でcontrol群に比べ有意に増加したが、8週では3群間で不変であった。同様に、線維化関連蛋白のTGF- $\beta$  1の発現は16週のSDT群でcontrol群に比べ増加したが、8週では3群間で不変であった。

(8) 8・16週のSDT群では、左室心筋細胞肥大と関連してpEGFRとNHE1の発現が増加した。

(9) SDT群では、左室心内膜下の心筋細胞面

積、間質線維化率、AngII や ANP 発現は、心外膜下に比べ有意に増加した。

(10) 8・16週 SDT 群では、血清 AngII 濃度や血漿レニン活性の低下と、左室心筋および右腎皮質 AngII 濃度の増加を認めた。SDT 群の左室心筋内 AngII は、心筋ミオシンと共発現を認め、心筋細胞からの産生が考えられた。SDT 群の右腎皮質 AngII は、近位尿細管マーカーの AQP1 と共発現を認め、近位尿細管細胞からの産生が明らかになった。

(11) pVEGFR2 の発現は、8 週 SDT 群で有意に増加したが、16 週では 3 群間で不変であった。

(12) 8・16 週 SDT 群の腎皮質では、AQP1 や NHE3 の発現増加と、AQP1 や NHE3 の近位尿細管管腔側膜への集積の増加を認めた。

(13) SDT 群で観察された血糖値以外の上記異常所見は Olm 群で、また SDT 群で観察された全ての異常所見は Ins 群で改善した。

以上より、糖尿病性腎症を発症した SDT rat では、高血糖が引き金となり近位尿細管で過剰産生された AngII が同尿細管からの Na 再吸収亢進を介して循環血漿量の増加/容量負荷を引き起こすこと、その結果左室心内膜下に限局して過剰産生された AngII がまず心筋細胞肥大と、それに伴う相対的慢性低酸素状態を介して VEGF を過剰発現し毛細血管数を増やすことで代償するが、その後肥大心筋細胞で産生された TSP-1 が VEGF の血管新生促進作用を凌駕することで毛細血管をアポトーシスに誘導し心筋線維化が出現することが考えられた。本研究では、心・腎局所の AngII 過剰産生と連動して 2 つの病期 (8・16 週) で種々の異常所見が観察され、高血糖に端を発した心・腎局所の AngII 過剰産生が DM 心筋症の発症/進展に関与したことが示唆されるが、直接証明には至っておらず、今後の課題である。また、慢性の高血糖状態がどのような機序で心・腎局所の AngII 過剰産生を引き起こしたのか、Olm が心・腎局所 AngII の過剰産生をどのような機序で抑制したのか、他の 2 型 DM モデルでも SDT rat と同様の機序で心筋障害が出現するのか、今後検討したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Masuda T, Muto S, Fujisawa G, Iwazu Y, Kimura M, Kobayashi T, Nonaka-Sarukawa M, Sasaki N, Watanabe Y, Shinohara M, Murakami T, Shimada K, Kobayashi E, Kusano E: Heart angiotensin II-induced

cardiomyocyte hypertrophy suppresses coronary angiogenesis and progresses diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 査読有, 302, 2012:H1871-H1883

[学会発表] (計 3 件)

- ① Masuda T, Muto S, Kusano E: Crosstalk between kidney and heart angiotensin II contributes to diabetic cardiomyopathy through volume expansion and overload. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov. 10-13, 2011, Philadelphia, PA, USA
- ② 増田貴博、武藤重明、草野英二: 心・腎局所アンジオテンシンIIと糖尿病性心筋障害」。第40回日本腎臓学会東部学術総会、2010年9月25日、宇都宮
- ③ 増田貴博、武藤重明、篠原雅巳、草野英二: 糖尿病性腎症の体液貯留における腎臓局所Angiotensin IIの関与: Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ratを用いた検討。第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月16日-6月18日、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 重明 (MUTO SHIGEAKI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40190855

(2) 研究分担者

増田 貴博 (MASUDA TAKAHIRO)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10424037