

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 5 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460347

研究課題名(和文) 脳心腎連関におけるエリスロポイエチンのADMAを介する臓器保護機序の解明

研究課題名(英文) Reno-cardiovascular protective effect of erythropoietin through ADMA.

研究代表者

中田 徹男 (NAKATA, TETSUO)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30237292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Erythropoietin (EPO)はSTZ糖尿病モデルラットの内皮機能を改善し、機序として大動脈のマクロファージの浸潤、接着分子であるMCP-1の発現増大などの炎症の抑制が示された。血管組織中のNADPH oxidase m-RNA発現およびMDAの増加も抑制し、血圧、血糖値、HbA1Cに影響を与えることなくadvanced glycation end product (AGE) 受容体の発現を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO) improved endothelium-dependent vascular relaxation response of the aortic ring in STZ-induced type 1 diabetes model rat, and EPO has been shown to inhibit inflammation, such as infiltration of the macrophage, the increased expression of MCP-1, an adhesion molecule. EPO also suppressed increase of oxidative stress index such as the amount of MDA and NADPH oxidase m-RNA expression in the vascular tissue. Furthermore, EPO inhibited the expression of the advanced glycation end product (AGE) receptor without affecting blood pressure, blood glucose level, and HbA1C in STZ-induced diabetic rats. Taken together these results, the mechanisms of vascular protection have been suggested anti-inflammatory action, may be through the antioxidant.

研究分野：循環器 高血圧 腎臓病

キーワード：Erythropoietin AGE receptor type1 diabetes DOCA-salt alpha-linolenic acid

1. 研究開始当初の背景

患者数が増加の一途を辿る慢性腎臓病 (CKD) が心血管イベント (CVD) の予測因子となることは種々報告されている。近年、血管内皮障害因子としての ADMA は CKD 患者血中に高濃度に存在し、その上昇が CVD 発症、CKD 進展や生命予後の重要な規定因子であることが報告されてきており、CVD や CKD の有用なマーカーとして注目されてきている。一方で、CKD 治療薬として確立されたものは未だ無いのが現状である。

2. 研究の目的

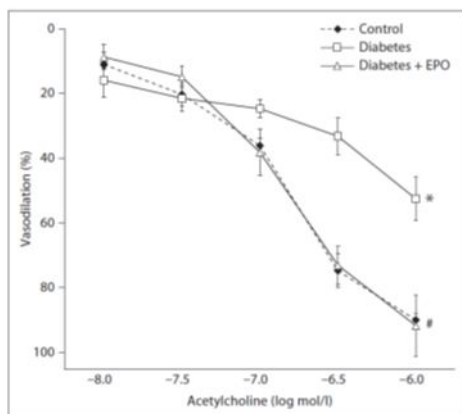
腎性貧血治療薬であるエリスロポイエチン (rHuEPO) は少量投与で腎・血管保護作用を示し、その機序の一部に ADMA が関与する可能性を報告した。有効な CKD 治療薬がない現在、rHuEPO の CKD 治療の臨床適応に向けた詳細な保護作用機序の検討が望まれる。

3. 研究の方法

易脳卒中・腎不全発症 DOCA 高血圧モデルラット (4週以内に7割が穿通枝出血) 及び 1型糖尿病モデルラットを用い、血中および組織中 ADMA 濃度と脳・心・腎障害の関係を明らかにするため rHuEPO の臓器保護機序について、脳・腎・心組織の TGF- β 1 動態を測定しその関連を検討した。腎障害の病態モデルとして STZ 誘発 1型糖尿病モデルラットおよび DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットを用いる。尿中蛋白排泄量及び CCr を腎機能の指標とした。毎週、Tail-cuff 法にて収縮期血圧を測定した。腎臓組織の酸化ストレスは臓器ホミジネイト中の MDA 濃度を、また組織 NADPH 活性を測定した。

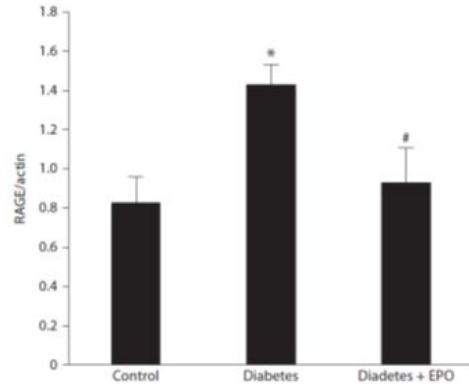
4. 研究成果

STZ (streptozotocin) 誘発 1型糖尿病モデルラットの大動脈リング標本の内皮依存性血管弛緩反応を改善し、その機序として大動脈のマクロファージの浸潤、接着分子である MCP-1 の発現増大などの炎症を EPO が抑制することが示された。

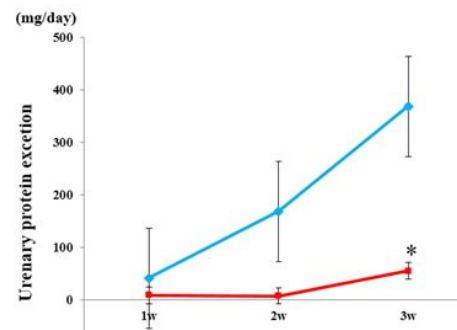
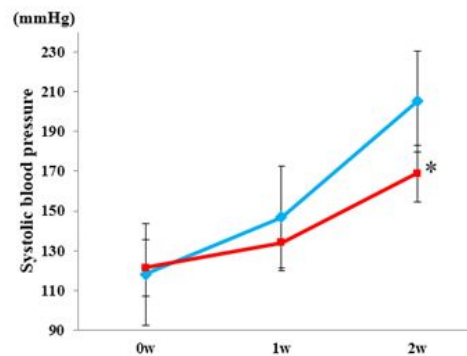


rHuEPO は血管組織中の NADPH oxidase m-RNA 発現および酸化ストレス指標の MDA の増加も抑制した。また、血圧、血糖値、HbA1C に影響を与えることなく STZ 糖尿病モデルラ

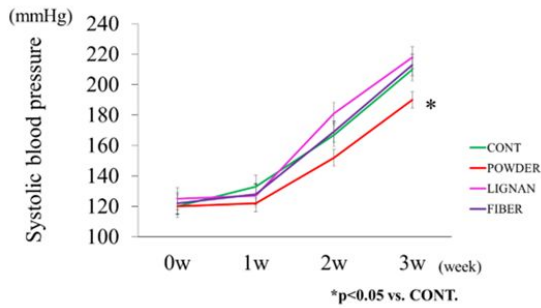
ットの advanced glycation end product (AGE) 受容体の発現を抑制したことより、抗酸化、抗炎症を介して血管保護に関わる可能性が示唆された。そこで、AGE 受容体に親和



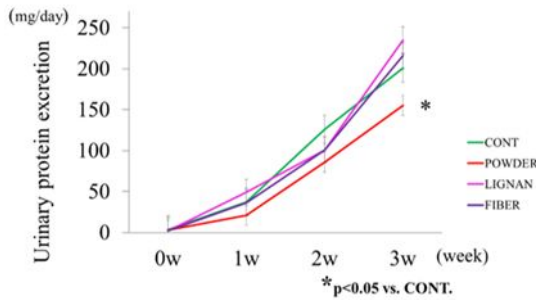
性があると報告されている 3系脂肪酸の血管保護効果と AGE、AGE 受容体の関係について、脳卒中易発症性高血圧モデルラット (DOCA-salt) (次頁に生存曲線を示す) を用い、リノレン酸及び抗酸化作用をもつリグナン含有自然食品の効果について検討を行ったところ、リノレン酸は DOCA-salt ラットの昇圧を抑制し、腎障害、脳卒中の発症を有意に抑制することが示された。さらにこの自然食品中の有効成分を検討するため、リノレン酸、リグナン、食物繊維をそれぞれ個別に投与する群を作成し検討を行った結果、リノレン酸が降圧、腎血管保護の主体を占めることが明らかとなった。



そこで、リノレン酸投与 DOCA-salt ラットの血管 AGE 並びに AGE 受容体について検討したが、リノレン酸投与群で抑制傾向を認められたものの、統計学的に各群間に有意な差は認められなかった。また、リノレン酸と EPO の併用による降圧、尿蛋白排泄量、臓器保護



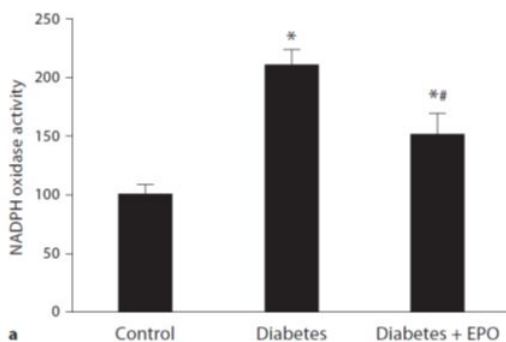
リグナンの降圧効果の検討



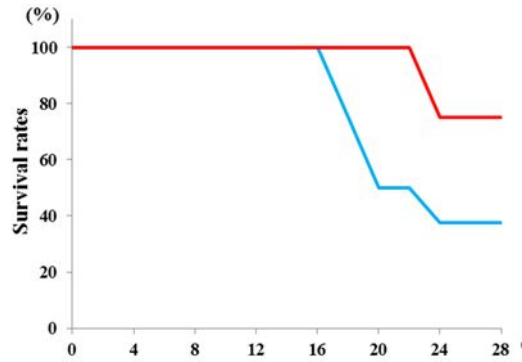
リグナンの腎保護効果

効果については更なる相乗効果は認められなかった。よって、STZ 誘発糖尿病モデルにおける EPO の血管保護効果は AGE 受容体抑制を一部は介する、抗酸化作用に基づくものと考えられる。一方で、DOCA-salt 高血圧モデルラットにおける 3 系脂肪酸の リノレン酸の降圧、臓器保護効果に対する AGE、AGE 受容体を介する機序は少ないものと考えられた。

DOCA-salt 高血圧モデルラットは 1 週目より有意な血圧の上昇を認め、3 週目以降収縮期血圧は 200mmHg を超え、高率に脳室穿破を伴う脳出血を発症した。

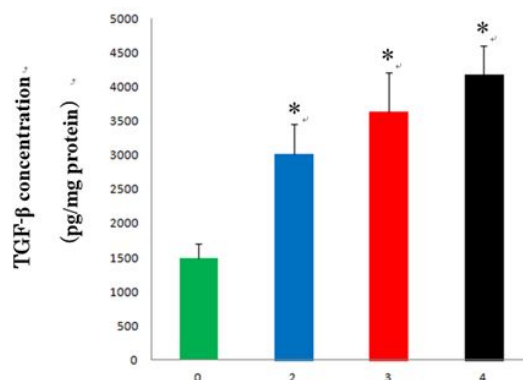
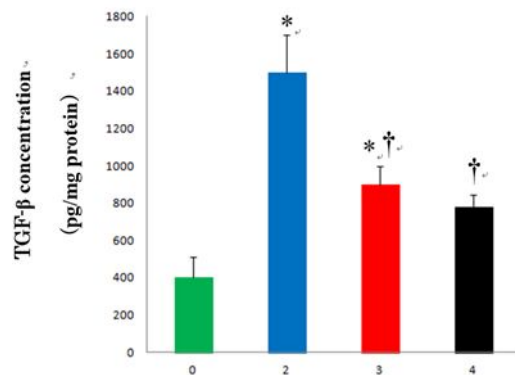
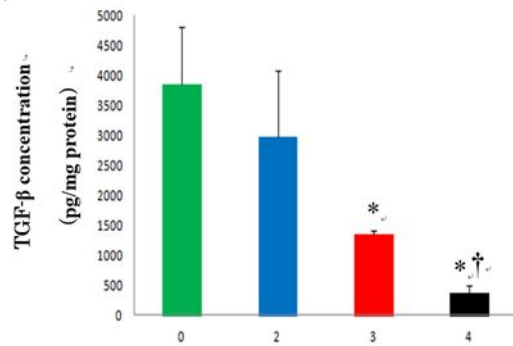


尿中蛋白排泄量も 1 週目より増加し、3 週目以降は 100mg/kg/rat を超え、クレアチニンクリアランスの有意な低下を伴い腎不全状態を呈した。組織中の TGF- β 1 濃度は DOCA 食塩負荷 1 週目より腎臓組織で上昇し、2 週目以降は 1 週目に比べて低下した。



生存率曲線 (days)

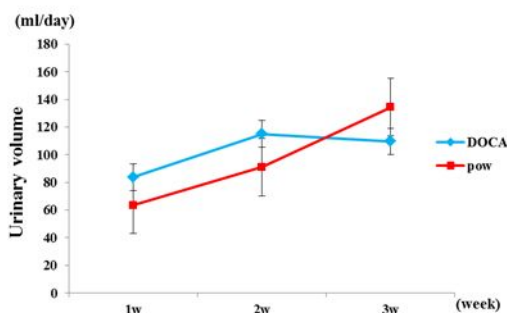
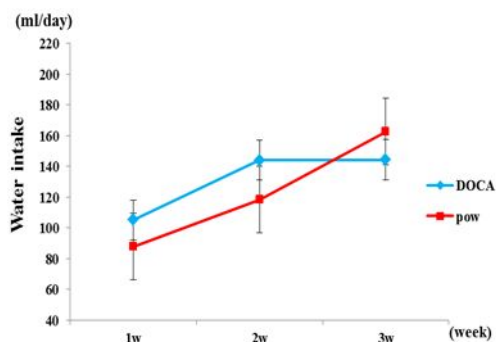
脳微小血管の TGF- β 1 も同様に 1 週目にピークを認め、以降漸次低下した。大動脈組織の TGF- β 1 は 2 週目以降漸増した。



(上段：腎臓、中段：脳微小血管、下段：大動脈組織中 TGF- β 1 濃度の変化)

これらより、腎または脳の TGF- β 1 が trigger

となって動脈硬化性病変が全身で進行する可能性が示唆された。



飲水量・尿量の経緯

【結論】

Erythropoietin (EPO)はSTZ糖尿病モデルラットの内皮機能を改善し、機序として大動脈のマクロファージの浸潤、接着分子であるMCP-1の発現増大などの炎症の抑制が示された。血管組織中のNADPH oxidase m-RNA発現およびMDAの増加も抑制し、血圧、血糖値、HbA1Cに影響を与えることなく advanced glycation end product (AGE) 受容体の発現を抑制した。一方で DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットにおけるリノレン酸は降圧、腎保護効果を示したが、RAS-AGE系とは別の経路による機序が考えられた。更なる詳細な検討が望まれる。

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 2 件)

1. Makoto Ohigashi, Nobuyoshi Imai, Hiroe Toba, Miyuki Kobara, and Tetsuo Nakata. Pitavastatin Exhibits Protective Effects on Podocytes Accompanied by BMP-7 Up-Regulation and Rho Suppression Pharmacology ;97:265-276(2016) (査読有)
2. Miyuki Kobara, Akiko Furumori-Yukiya, Miho Kitamura, Mihoko Matsumura, Makoto Ohigashi, Hiroe Toba, and Tetsuo Nakata: Short-term caloric restriction suppresses cardiac oxidative stress and hypertrophy

caused by chronic pressure overload . J. Card. Fail., 21, 656-666 (2015) (査読有)

3.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Hiroe Toba, Jiahong Wang, Kazuki Noda, Wei Tian, Miyuki Kobara, and Tetsuo Nakata: Telmisartan inhibited vascular inflammation and endothelial dysfunction via activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hypertensive 5/6 nephrectomized rat. 23rd European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (Milan, Italy), 2013. 6
2. Miyuki Kobara, Tatsuya Shiraishi, Kazuki Noda, Makoto Ohigashi, Hiroe Toba and Tetsuo Nakata: Eicosapentaenoic acid mediates mitochondrial fatty acid composition and fusion protein OPA-1 in associated with preservation of oxidative phosphorylation after myocardial infarction. ESC Congress 2013 (Amsterdam, Netherlands), 2013. 8.
3. 大林美香、大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男: DOCA-salt では高血圧と腎障害の悪化と共に大脳白質におけるアストロサイト変性、神経細胞の脱落を生じ、高頻度に脳出血を発症する。第 124 回日本薬理学会近畿部会(京都), 2013. 11
4. 武末篤太、大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男: DOCA-salt 高血圧モデルラットでは、血圧上昇と腎障害の悪化とともに脳、腎における TGF- β 発現に影響を及ぼす。第 23 回日本循環薬理学会(福岡), 2013. 12.
5. 大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男: DOCA-salt では高血圧と腎障害の悪化とともに、大脳白質におけるアストロサイト変性、神経細胞の脱落を生じ、高頻度に脳出血を発症する。第 36 回日本高血圧学会総会(大阪), 2013. 10.
6. Makoto Ohigashi, Miyuki Kobara, Tamotsu Takahashi, Hiroe Toba, Takehiko Wada, and Tetsuo Nakata: Pitavastatin suppresses hyperglycemia-induced podocyte injury via bone morphogenetic protein-7 preservation. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (東京), 2014. 3.
7. 瀬尾文菜、加藤麻里、大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男: rebamipide は食塩負荷腎障害モデルラットにおいて腎保護作用を示す。第 37 回日本高血圧学会総会(横浜), 2014. 10.
8. 大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男:

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pitavastatin の podocyte 保護効果と BMP-7 の関与及びその機序について. 第 24 回日本循環薬理学会 (山形), 2014. 12

9. 大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男: 高尿酸血症モデルラットにおける尿酸と臓器障害の関連について. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋), 2015. 3.
10. 福山光理、大東 誠、鳥羽裕恵、小原 幸、中田徹男: STZ 誘発 1 型糖尿病モデルラットにおける生体内微量元素元素の体内分布について. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜), 2016. 3.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/rinsyou/rinsyou-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田徹男 (NAKATA TETSUO)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 30237292

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()