

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462533

研究課題名(和文)腎移植実験による酸化ストレス脆弱性に起因する腎臓病の治療効果の検証

研究課題名(英文)A new therapy for blood purification of oxidative stress and uremic toxin verified by mouse kidney transplantation

研究代表者

阿部 倫明(Abe, Michiaki)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：40400246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの腎サイズは小豆大である。マウス腎移植実験は非常に難易度が高いが、遺伝子変異種の多いマウスで確立できることは、今後の腎臓研究に重要である。日本での実験遂行が困難だったため、共同研究中のDuke大学腎研究分野に大学院生が留学し移植実験を開始し現在も継続中である。本研究の最終目標は、尿毒症物質や酸化ストレスの血液浄による慢性腎臓病の新規治療法の開発である。幸い新規候補が見つかりコホート研究を開始した。

研究成果の概要(英文)：The project including a mouse kidney transplantation was extremely so difficult to accomplish in Japan that our graduate student studied abroad and carry forward the experiment in Duke University Medical Center, kidney research institute (Prof. Coffman TM) one and a half years ago. The donor mouse kidney, the size as same as adzuki bean, is quickly transplanted to a recipient mouse under an ophthalmologic microscope in 11-0 suture without injuring the renal artery, vein and ureter. This project has been going still now. The final aim of this project is development of a new therapeutic agent for chronic kidney disease by blood purification of uremic material and oxidation stress. As the new candidate drug was found, I started a cohort study of it.

研究分野：腎機能

キーワード：血液浄化 尿毒症性物質 腎移植実験 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の増悪と腎内や尿中の酸化ストレスの亢進は相関する。その際、全身の酸化ストレスも亢進しており腎臓病の悪化に寄与している。生体内で発生した酸化ストレスを含む尿毒症物質は、腎臓による血液浄化機能が担う“浄化排泄系”と肝臓や全細胞に備わっている抗酸化プログラムの応答の結果として獲得された抗酸化蛋白質や解毒酵素が担う“消去解毒系”という2つの機序により適切に除去されている。生体内の血液浄化器官である腎臓の機能障害が進行する時、腎内や尿中の酸化ストレスは亢進している [Hypertens Res. 2008;31:p1155, Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;36: p509.]。またその際、動脈硬化症や消耗性疾患などの全身疾患も合併しており、通常は血中の酸化ストレスや尿毒症物質も増加している。そのため、腎内や尿中の酸化ストレスの亢進が、腎臓病そのものから産生された酸化ストレスなのか、それとも血中の酸化ストレスの増加を反映しているのか、区別できない。さらに腎内酸化ストレスと全身の酸化ストレスの間には悪循環がある “腎内酸化ストレスは、腎臓が尿毒症物質を尿中排泄する過程で発生する [Am J Physiol Renal Physiol. 2006; 291:pF350]。腎内で発生した酸化ストレスが腎臓を損傷することにより、酸化ストレスや尿毒症物質の尿中排泄が低下し血中濃度が上昇する [Nephrol Dial Transplant. 2008;23:p3096]。酸化ストレスや尿毒症物質の上昇は全身の血管内皮障害や動脈硬化を悪化させる [Free Radical Res. 2010;44:p101]”。尿中アルブミン排泄は腎内酸化ストレスを反映するので、これを指標にした腎保護治療は脳心腎血管障害の予防に有効である。

2. 研究の目的

(1)マウス腎移植実験を行い、高い抗酸化作用

の有する健常腎を移植された慢性腎臓病モデルマウスが、全身由来の酸化ストレスを除去されることで、その対側の腎臓の障害が改善するかどうかを検証する。

(2)慢性腎臓病と血液浄化された慢性腎臓病とで、血漿と尿で尿毒症物質や酸化ストレスのメタボローム解析を行い薬物的血液浄化による新規治療戦略を検証する。

3. 研究の方法

(1)マウスのクロスオーバー腎移植実験の確立；

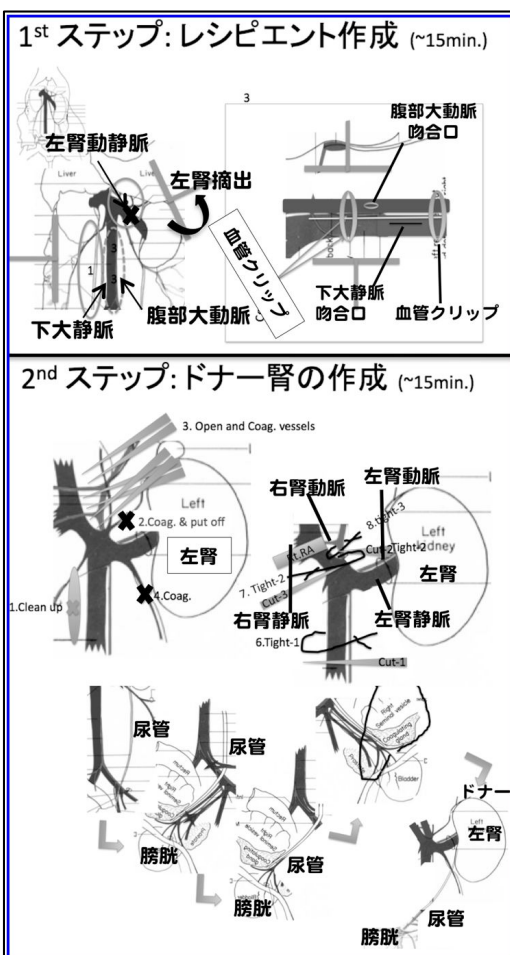
現在、マウス腎移植実験を実行できる施設は世界で2カ所 (Ohio 州立大学外科と Duke 大学腎臓学講座)であり、日本には未だない。マウス腎移植実験の全行程は、イソフルレン吸入麻酔を使用し微小手術用実体顕微鏡下で、非常に細かい血管処理と血管吻合を繰り返す。

- レシピエント操作 37 恒温下、マウスを腹部正中切開する。左腎動静脈・尿管を凝固切断し左腎を摘出する。下大静脈・腹部大動脈を慎重に露出し、右腎動脈起始部より下のレベルで大動脈・下大静脈を約 1.2cm の間隔を開けてニカ所クリップで血流遮断する。大動脈と下大静脈に約 2.5mm 長の吻合口を作製し内腔はヘパリン液で満たす。

- ドナー腎の作成 マウスを腹部正中切開する。左腎臓と左右の腎動静脈を慎重に露出する。右腎動脈起始部より下のレベルで腹部大動脈と下大静脈を 7-0 ナイロンで結紮し離断する。左腎動脈起始部と右腎動脈起始部の間で腹部大動脈を、左腎静脈流入部と右静脈流入部の間で下大静脈を、それぞれ 7-0 ナイロンで結紮し、その直下を切断する。次に、尿管を傷つけないように注意して、左尿管全体と尿管-膀胱接合部を露出する。右側の尿管-膀胱接合部付近で右尿管血管束を一塊にして結紮・離断し、左腎～膀胱からなる

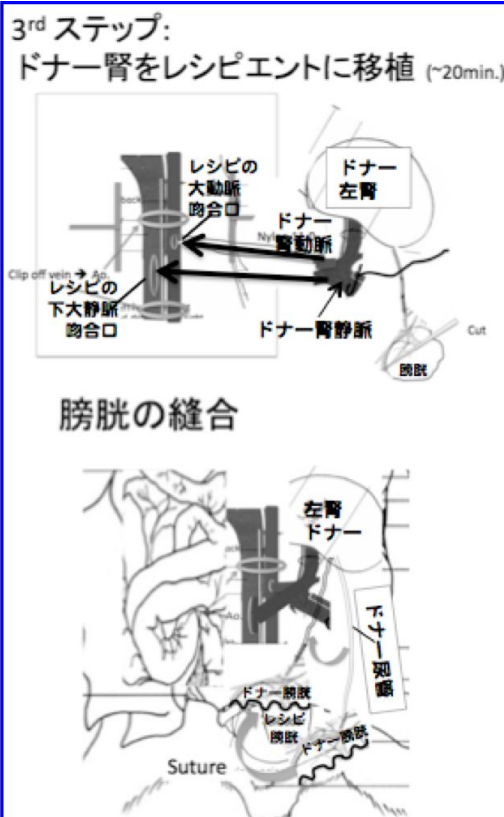
ドナー腎を作製する。冷却処理を行わず、この直後に一期的に腎移植を施行する。

- 腎臓移植(図右) レシピエントの腹部大動脈吻合口とドナー腎の大動脈 flap 縫合口の間と、下大静脈吻合口とドナー腎の下大静脈 flap 縫合口との間を、それぞれ 11-0 ナイロンで側端吻合する。血流を再開させ、腎臓表面のピンク色への回復と尿管の尿流を確認する。ドナー腎の膀胱とレシピエントの膀胱をそれぞれ左上 1/3 を切断し、膀胱端-膀胱端を一層に 10-0 ナイロンで端々吻合する。



(2)慢性腎臓病における薬物的血液浄化治療の検証；

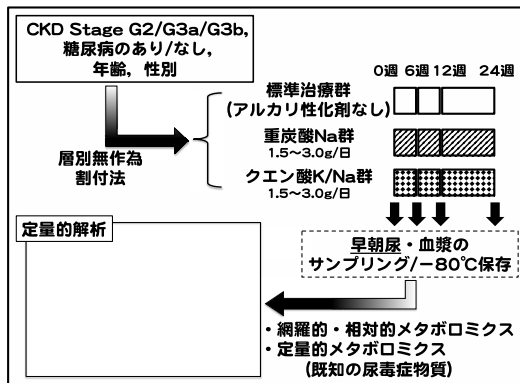
我々は経口アルカリ性化剤の内服投与が腎内酸化ストレスを減弱させ、腎障害が予防できる可能性を動物実験で実証した[J Am Soc Nephrol. 2011;22:pp635]。本邦で安全性



の確立されている経口アルカリ性化剤には重炭酸 Na とクエン酸 K/Na がある。実際に慢性腎臓病患者に対する経口アルカリ性化剤の薬物的血液浄化効果について、各々の経口アルカリ性化剤群と標準治療群を比較する『慢性腎臓病における経口アルカリ性化剤による腎保護効果の検討の研究/臨床研究登録 UMIN-ID;000010059』を立ち上げた。そして、患者に説明後同意の得られた匿名化サンプル(尿と血漿)についてメタボローム解析を開始した。

『慢性腎臓病における経口アルカリ性化剤による腎保護効果の検討』の研究	
研究デザイン	コホート研究, 並行群間ランダム化比較試験
対象	酸性尿のある CKD 患者 (stageG2,G3a,G3b), 年齢 20 歳以上・81 歳未満
割付け方法	年齢・性別・糖尿病有無・eGFR による層別無作為化法

群分け、 目標登 録数	標準治療群, 重曹群, ウラリ ット群の3群、各群 50 名, 計 150 名
サンプ ル準備	投与前(0 週),6 週,12 週,24 週の 4 点、早朝尿と血漿
サンプ ル採取, 保管	採取直後に連結可能匿名化、二重 に鍵付きの-80 冷凍庫で保管



4 . 研究成果

(1)マウス腎移植実験による慢性腎臓病の腎機能障害進行機序の解明；

マウスの腎サイズは小豆大であり、特殊な腎移植実験行程を使う。マウス腎移植実験は非常に難易度が高く日本での実験遂行が困難と判断されたため、移植実験の習得のために共同研究中の Duke 大学腎研究分野(Thomas M Coffman 教授)に当教室の大学院生(奥田拓史)が留学した。遺伝子改変モデルマウスは腎動静脈の走行変異が多すぎるため、安定してドナー腎として使用できなかった。そのため、レシピエントに腎炎モデルマウス、ドナー腎には普通の正常マウスを使用する protocol に変更した。研究が遅れており現在継続中である。

(2)慢性腎臓病における薬物的血液浄化治療の検証；

経口アルカリ性化剤による血液浄化効果については順調に研究が進んでいる。少ないサンプル数による本研究の最終目標で経口

アルカリ性化剤介入前・後の早朝尿と血漿のメタボローム解析で有意な増減を認める尿毒症物質や代謝物が認められた。(特許申請を検討中のためデータは出さない)

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 9 件)

1. Terminology and Diagnostic Criteria Committee, Japan Society of Ultrasonics in Medicine [Chairperson; Matsuo H, Vice Chairperson; Abe M, Members; Iwashima Y, Odashiro K, Sato H, Takase K, Hirai T, Matsumura M, Miki T]. Standard method for ultrasound evaluation of renal arterial lesions. J Med Ultrason(2001). 43:145-162, 2016. 査読あり.
doi:10.1007/s10396-015-0651-3.
2. Nagasaki M, Yasuda J, Katsuoka F, Nariai N, Kojima K, Kawai Y, Yamaguchi-Kabata Y, Yokozawa J, Danjoh I, Saito S, Sato Y, Mimori T, Tsuda K, Saito R, Pan X, Nishikawa S1, Ito S, Kuroki Y, Tanabe O, Fuse N, Kuriyama S, Kiyomoto H, Hozawa A, Minegishi N, Douglas Engel J, Kinoshita K, Kure S, Yaegashi N, Tsuboi A, Nagami F, Kawame H, Tomita H, Tsuji I, Nakaya J, Sugawara J, Suzuki K, Kikuya M, Abe M, Nakaya N, Osumi N, Yamashita R, Ogishima S, Takai T, Tominaga T, Taki Y, Suzuki Y, Yamamoto M. Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. Nat Commun. 2015 Aug 21;6:8018. 査読あり.
doi:10.1038/ncomms9018.
3. Abe M*, Joh K, Ieiri N, Hotta O, Utsunomiya Y, Sato H, Kisu K, Sakumo N, Kiyomoto H, Sato T, Taguma Y and Ito S. Prominent hyperplasia of renin-producing juxtaglomerular apparatus after chronic and complete blockade of the renin angiotensin system in adult IgA nephropathy. CEN Case Rep. 4;228-232 (2015). (* corresponding author) 査読あり.
doi:10.1007/s13730-015-0177-y.
4. 阿部倫明. Pro2Pro 内科：腎臓 片側腎動脈狭窄症患者における PTRa と薬物療法の選択 日本医事新報 4752;p53-55,2015. 査読無
5. 阿部倫明. Pro2Pro 内科：腎臓 腎交感神経除神経術の課題と将来性, 日本医事新

- 報 4758, p62. 2015. 査読無
6. Cowley AW Jr, Abe M, Mori T, O'Connor PM, Ohsaki Y, Zheleznova NN. Reactive oxygen species as important determinants of medullary flow, sodium excretion and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 308, F179-F197, 2015. 査読あり.
doi: 10.1152/ajprenal.00455.2014.
 7. 阿部倫明. 血圧調節機序(圧-利尿曲線を含む), 特集: 高血圧をめぐる最新の話(監修 伊藤貞嘉)69:2230-2239, 2014, 最新医学. 査読無
 8. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S, Yamamoto M. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 24; 1599-1616 (2013). 査読あり.
doi:10.1681/ASN.2013010030.
 9. Okuda H, Abe M, Kiyomoto H. A rare case among hypertensive patients: how do we handle reninomas? *Intern Med.* 52(17);1853, (2013). 査読あり.
doi:10.2169/internalmedicine.52.0973

〔図書〕(計2件)

1. 阿部倫明, 伊藤貞嘉. 二次性高血圧. 専門医のための循環器病学 [監修; 小川聡, 井上博, 筒井裕], 444-466, 2014, 医学書院.
2. 清元秀泰, 阿部倫明. 第1部 ひと・命・心, 第3章 3.11 から学んだ医療現場の脆弱性と想定外対応能力. 東日本大震災を分析する2 震災と人間・まち・記録 [編集; 平川新, 今村 文彦, 東北大学災害科学国際研究所], 40-54, 2013, 明石書店.

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部倫明 (ABE, MICHIAKI)
東北大学・大学病院・准教授
研究者番号: 40400246

(2)研究協力者

奥田拓史 (OKUDA, HIROSHI)
東北メディカル・メガバンク機構・大学院生 (留学中) Duke 大学 腎臓研究分野