

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461261

研究課題名(和文) 脳内酸化ストレス応答における腎交感神経系と尿細管L-FABPの影響

研究課題名(英文) Effects of renal sympathetic nervous and L-FABP on oxidative stress response in the brain

研究代表者

金口 泰彦 (KANAGUCHI, Yasuhiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30569728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳心腎連関機序としての交感神経系、酸化ストレスの関与を明らかにするために、脳虚血モデルとして中大脳動脈の虚血再灌流(IR)モデルを作成し、腎交感神経遮断(RD)、酸化ストレス除去系としてL-FABPの過剰発現を行い各々の病態における役割を検討した。IRモデルの安定的な作成には難渋したが、RDの前処置ではむしろ生命予後は増悪傾向、また脳梗塞巣も拡大傾向にあり、急性期には交感神経活性がホメオスタシスの保持には必須である可能性が示唆された。現在は安定的なIRモデルの確立を目指すとともに、慢性期における脳心腎病態でのこれらの関与を明らかにするため、RD施行のタイミング等検討を継続している。

研究成果の概要(英文)：To investigate the roles of sympathetic nerve system (SNS) and oxidative stress in cerebro-cardio-renal syndrome (CRS), we developed cerebral ischemia/ reperfusion (IR) model and evaluated the impacts of renal sympathetic nerve denervation (RD) or an endogenous inhibitor for oxidative stress, L-FABP overexpression on this model. Unexpectedly, pretreatment of RD rather tended to enhance the mortality and infarction area after IR, suggesting that SNS could play an important role in maintaining the blood flow as well as the homeostasis in the acute phase of IR. We are now investigating the detail involvements of SNS activation in acute/ chronic phase of IR by modulating the timing of RD in the IR model.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：酸化ストレス 中大脳動脈虚血再灌流 腎交感神経 L-FABP

### 1. 研究開始当初の背景

高血圧は日本・世界において最も頻度の高い疾患の一つであるが、様々な薬剤の研究・開発にもかかわらず、依然治療抵抗性高血圧の頻度が少なくない。また血管合併症である脳血管障害、心疾患、腎疾患は ADL、QOL を著しく損なう重大な問題である。降圧治療に対する抵抗性の原因は様々であるが、腎交感神経活動の亢進が重要な要因の一つと考えられている。

交感神経および迷走神経は、血圧や各臓器への血流量を精巧に調節していることが知られている。中枢神経中枢である延髄吻側腹外側領域 (rostral ventrolateral medulla: RVLM) のニューロン (神経細胞) の電気活動亢進は、脊髄の中間外側核の電気活動を亢進させる。すると様々な高さの中核外側核から遠心性に出て行く末梢神経活動が亢進し、心臓・腎・細動脈などに作用して血管収縮、血圧上昇、循環血漿量の増加をもたらすと考えられている。また RVLM が腎交感神経系を介した脳内酸化ストレスの調節 (一酸化窒素と活性酸素のバランス) を行い、脳腎連関の一つの機序であることも知られている。

一方 L-FABP は、肝臓、腸および腎臓の近位尿細管細胞質に存在する分子量約 14Kd の脂肪酸結合蛋白である。腎臓において L-FABP は、アルブミンと結合した遊離脂肪酸が尿細管細胞に取り込まれた際に、遊離脂肪酸と結合し細胞内小器官へ転送することで酸化を促進する。それだけではなく、酸化ストレスにより生じる過酸化脂質と強く結合し、細胞外へ排出することにより、腎保護的に働くと考えられている。

我々は L-FABP の腎での抗酸化作用に以前より注目し、様々な腎疾患での保護作用を報告してきた。次に腎外血管病変での作用を検討するため、脳内酸化ストレスとして脳梗塞 (中大脳動脈虚血再灌流) モデルを作製した。結果、脳梗塞巣の 2 次元的な拡がり (ペナンブラ) は Tg マウスにおいて抑制され、脳梗塞のような腎外血管病変による酸化ストレスに対しても、近位尿細管細胞 L-FABP を介した抗酸化能の関与が考えられた (投稿中)。

### 2. 研究の目的

腎近位尿細管における、L-FABP による抗酸化作用を介した腎、さらに脳の臓器保護作用の機序に、交感神経を介した脳と腎における情報伝達が関与するという仮説を立てた。新たな脳腎連関の機序を見出し、創薬ターゲットを検索する礎とすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

野生型マウス、L-FABP Tg マウス対し、以下の処置を行い、モデルを作成する。

#### 手技 1 : 腎交感神経アブレーション処置

- ・顕微鏡下で腎動静脈周囲を剥離する。
- ・腎交感神経を手動的に切断し、フェノールを塗布する。(図 1)

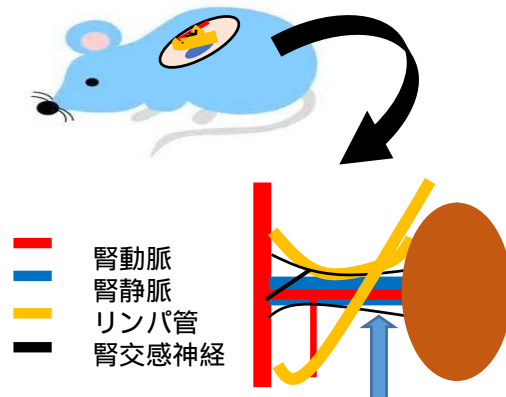


図 1 腎交感神経アブレーション処置

#### 手技 2 : 中大脳動脈虚血・再灌流処置

- ・中大脳動脈を 60 分間クリッピングし虚血状態とする。
- ・クリッピングを解除し再灌流を行った後、閉創する。
- ・24 時間後にサクリファイスを行う。(図 2)

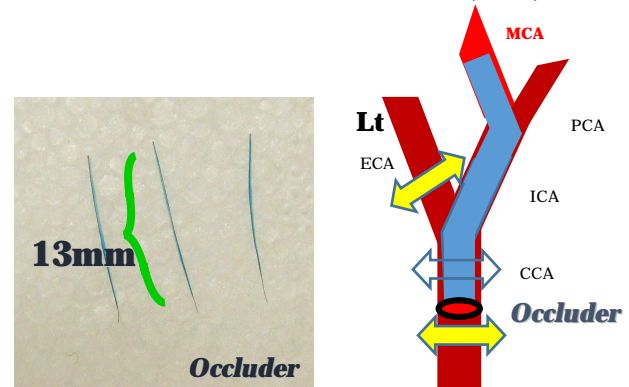


図 2 中大脳動脈虚血・再灌流処置

#### その他 1 : 心行動態測定、血清・尿生化学的検査による交感神経活動評価

- ・適宜心行動態測定 (血圧・脈拍)、各種マーカー (尿蛋白・尿中電解質・尿中血中酸化ストレスマーカー (L-FABP, アルビノネリン, 8-OHdG, 血清過酸化脂質等)) を測定し、経時的变化も含め評価する。

#### その他 2 : 脳組織・腎組織の免疫組織化学的評価

- ・得られた標本より脳では TTC 染色により梗塞範囲を定量的に評価する。
- ・腎では PAS/HE 染色にて尿細管間質のほか糸球体障害も評価する。同時に pimonidazole 染色による腎虚血の程度を評価する。

### 4. 研究成果

#### 手技 1 について

平成 26 年度に香川大学薬理学教室にて、腎

交感神経アブレーション手技の指導を受けた。腎交感神経アブレーションの可否は、腎組織ノルビニ濃度の測定により確認を行った。WT・L-FABP Tg マウス両者において、腎交感神経アブレーションにより腎組織ノルビニ濃度の著明な減少を確認した(図 3)。以降も安定的な手技成功率を確保することができた。今回習得した手技は、平成 27 年度基盤 C 研究代表者小林敬「睡眠時無呼吸時の低酸素状況における腎脂質応答の検証」においても用いており、今後様々な検証において非常に有用であると考えられる。

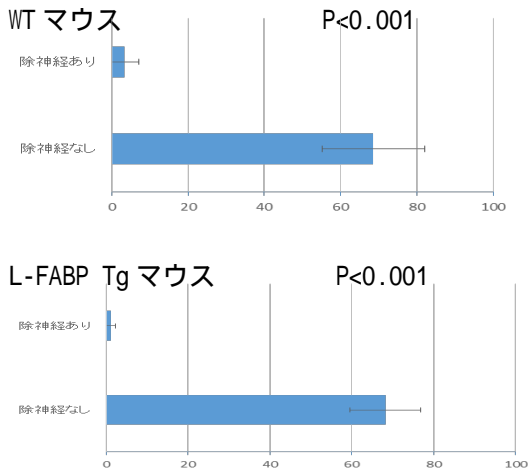


図 3 腎組織ノルビニ濃度 (ng/g wet tissue)

次に、腎交感神経アブレーション手技の術後の侵襲について検討を行った。

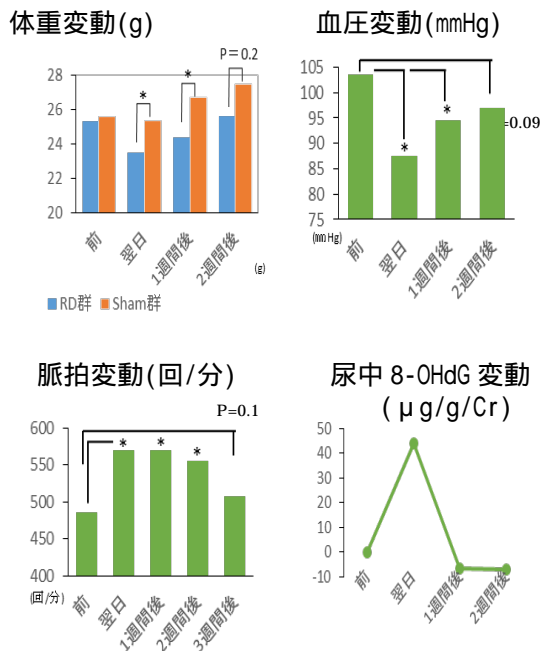


図 4 腎交感神経アブレーションによる侵襲マーカー変動

体重変動については sham ope 群と比較して、術後 2 週間で有意差を認めなくなった。また

血圧・脈拍については、前値と比較しそれぞれ 2 週間後、3 週間後に有意差を認めなくなった。尿中 8-OHdG については処置翌日には著明な上昇を認めたが、術後 1 週間後には前値と同程度まで減少した。

➡これらの所見よりアブレーションの術後 1 か月には、処置の術後侵襲から回復していることが推察され、本実験において術後 1 か月で中大脳動脈虚血再灌流処置を行う方針とした。

#### 手技 2 について

自施設での中大脳動脈虚血・再灌流による脳梗塞の安定的な作成が難しく、平成 27 年度より外部施設へ依頼することとした。腎交感神経アブレーション・sham ope・中大脳動脈虚血再灌流処置前の検体採取については自施設で行い、術後の侵襲が排除された 1 か月後に外部施設へマウスを移送した。その後中大脳動脈虚血再灌流処置を外部施設で行い、24 時間後のサクリファイス時には、本実験の研究協力者が外部施設を訪問し、処置後の検体回収を行う方針とした。

平成 27 年度後半～平成 28 年度前半において、WT マウス：腎交感神経アブレーション群、WT マウス：sham ope 群、L-FABP マウス：腎交感神経アブレーション群、L-FABP マウス：sham ope 群に対しモデルを作成し、検体回収・測定を行った。

表 1 WT マウスの総脳梗塞巣 (mm<sup>3</sup>)

個体番号	アブレーション群	sham ope 群
1	24.9	B
2	15.2	1.4
3	B	1.0
4	A	1.2
5	B	0.0
6	25.3	0.0
7	B	B
8	B	5.8
9	68.9	2.2
10	14.2	0.0
11	57.2	3.4
12	10.0	5.5

A：虚血中に死亡した個体

B：虚血再灌流後 24 時間以内に死亡した個体

総数 12 例ずつを作成し、群では 3 例のみ梗塞が認められなかった。また虚血中、虚血再灌流後 24 時間以内に死亡した個体も 5 例と多かった。

一方 群においては 群と比較し梗塞の作成率が低かった。そのため想定したマウス数よりも多くモデルを作成し、WT マウス( 群)は最終的に総数 67 例を作成した。問題点としては 67 例中 41 例では梗塞巣が認めら

れず、脳梗塞巣の安定的作成が難しい状況であった。L-FABP マウスにおいても同様の傾向が認められた。しかしながら、脳梗塞を起こした群においては、生命予後、脳梗塞巣、いずれにおいてもアブレーション群で増悪傾向にあり、急性期においては交感神経機能の亢進は臓器血流や生体のホメオスターシスの保持には必須であることが示唆された。現在は脳梗塞モデルの安定的な作成（他施設との共同研究）を目指しつつ、交感神経の異常な亢進が急性期後の慢性病変やペナンプラ形成、リモデリングへの関与を明らかにするため、干渉時期の検討を進めている。

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

金口 泰彦 (KANAGUCHI, Yasuhiko)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号：30569728

##### (2)研究分担者

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)

順天堂大学 医学部 教授

研究者番号：70372935

菅谷 健 (SUGAYA, Takeshi)

順天堂大学 医学部 非常勤講師

研究者番号：40381561

小林 敬 (KOBAYASHI, Takashi)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号：70459056

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)

順天堂大学 医学部 名誉教授

研究者番号：60130077

##### (4)研究協力者

高橋 敬子 (TAKAHASHI, Keiko)

順天堂大学腎臓内科 非常勤助手