

165. 慢性腎臓病と心血管病の連関機序の解明と治療法開発

柏原 直樹

Key words: 慢性腎臓病, アルブミン尿, 血管内皮機能, 一酸化窒素, 酸化ストレス

川崎医科大学 医学部
腎臓・高血圧内科学

緒言

慢性腎臓病 CKD は脳卒中, 心疾患等の心血管病, 認知機能障害の独立した, かつ強力なリスク因子である。とりわけアルブミン尿はごく微量段階から心血管病と強く連関している。血管障害の最早期病態は内皮(機能)障害と微小炎症である。それ故, アルブミン尿が内皮障害を反映していると想定されてきたが, 糸球体内皮が有窓性であるため, 透過性制御における役割は小さいと目されてきた。私共は研究技術上の隘路であった腎内微小循環動態, 透過性変化を生体において直接可視化し解析しうる *in vivo* imaging 技術を確立し, 糸球体内皮細胞の役割を解明しつつある。本研究では, CKD と心血管病の共通基盤病態を内皮(機能)障害に求め, ①アルブミン尿出現の分子機序, 内皮障害の役割を解明する, ②CKD の基盤病態と心血管病との連関機序について分子レベルと血行動態変化の両面から詳細な検討を加えて理解を深化させる, ③CKD 進展阻止と心血管病予防のための統合的治療法を構築すべく, 標的となる病態・標的分子を明確化する, 以上を本研究の目的とする。研究を通して国民健康福祉の増進に寄与したいと願っている。

方法

1. 生体臓器における微小血流変化, 透過性変化を解析する *in vivo* imaging 技術の確立

2-フォトンレーザー顕微鏡を用いると, 励起波長が短く光毒性が低いため, 深部まで低侵襲性に長時間観察可能である。時間・空間分解能が高く, 蛍光標識した小分子の生体内挙動が3次元的に動画で記録可能である。生体腎において微小血流, 濾過状態をリアルタイムで可視化解析するイメージング技術の開発に着手しておりこれを完成させる。FITC 標識デキストラン, アルブミン分子をプローブとして用いる。腎微小血流のみならず, 後述する膝ラ氏島血流の解析にも本技術を活用する。

血管壁における一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 及び, 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) 産生を評価する。Diaminorhodamine (DAR-4M: NO 指示薬), Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA: ROS 指示薬) と共焦点レーザー顕微鏡を用いて, 生成 NO (bioavailable NO) を ROS と同時に組織上で可視化検出する *in situ* 可視化法を確立している。本法により病態モデル腎糸球体における NO (赤色蛍光で検出可能), ROS (緑色蛍光で検出可能) 変化を組織上で同時に解析する。

2. 腎臓病の病態形成, 心血管病との連関機序としての内皮機能障害の役割の検討

腎臓病の病態形成, 心血管病との連関機序, 内皮障害の病因的役割を端的に証明するために, 遺伝子改変動物を利用した。内皮機能として NO 産生能が重要であり, ①eNOS (endothelial NO synthetase) 遺伝子 knock out mouse, ②NOX2 (NAD(P)H oxidase 主要要素) を内皮特異的に高発現する tie2-NOX2 transgenic mouse (Tg), 及び③tetrahydrobiopterin (BH4: eNOS 機能維持に必須補酵素) の産生律速酵素である GTPCH-1 を内皮特異的に高発現する tie2-GTPCH-1Tg である。これらに腎障害モデルを作製し腎臓病及び心血管病の増悪あるいは抑制を検討し, 内皮障害の病因的意義を明確化する。腎障害モデルとして糖尿病自然発症マウスである Akita マウスとの交配, 及び STZ 糖尿病モデルを作製する。

3. 臓器線維化における血管内皮機能障害の関与の検討

臓器線維化モデルとして腹膜障害モデルを作製し、腹膜透析 (Peritoneal Dialysis: PD) 時に生じる腹膜肥厚、線維化における内皮機能の関与を検討する。

4. 他臓器の微小血流変化と内皮機能障害との関与

高血圧や2型糖尿病ラ氏島には微小血管障害、血管内皮細胞数の減少に加えて β 細胞数の減少と繊維化が認められる。ラ氏島微小血管と腎糸球体血管は形態的かつ機能的にも共通点を有する。ラ氏島微小血管の血行動態・血管内皮機能を生体動物で可視化解析する技術を確認し、ラ氏島血流調節とインスリン分泌機構との機能的連関を解析した。

結 果

1. 生体臓器における微小血流変化、透過性変化を解析する *in vivo* imaging 技術の確立

2-フォトンレーザー顕微鏡と各種蛍光標識プローブを用いて、生体動物（ラット、マウス）において腎糸球体、間質血流を可視化解析する技術を確認した。さらにDAR-4M、DCFH-DAを用いて、組織におけるNOとROSを同時計測する技術も開発し得た。

STZ糖尿病モデル (STZ-DM) を用いて4週時には輸入細動脈拡張と一部の肥大糸球体 (図1) から大分子量デキストラン (40 kD) の濾過を認めた。この過剰濾過はアルブミン尿出現に先行することも明らかになった (図2)。

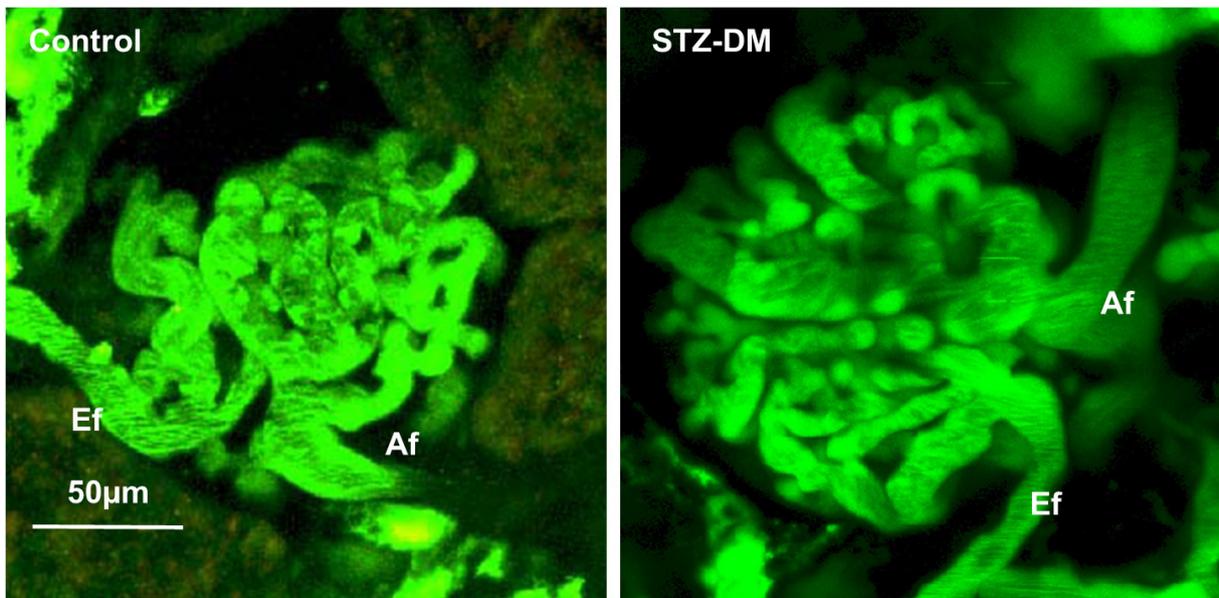


図1. 糖尿病における肥大糸球体.

ラット STZ 糖尿病モデルにおける糸球体構築変化を示す。糖尿病では輸入細動脈 (Af) が拡張し、輸出細動脈 (Ef) は収縮傾向を示す。

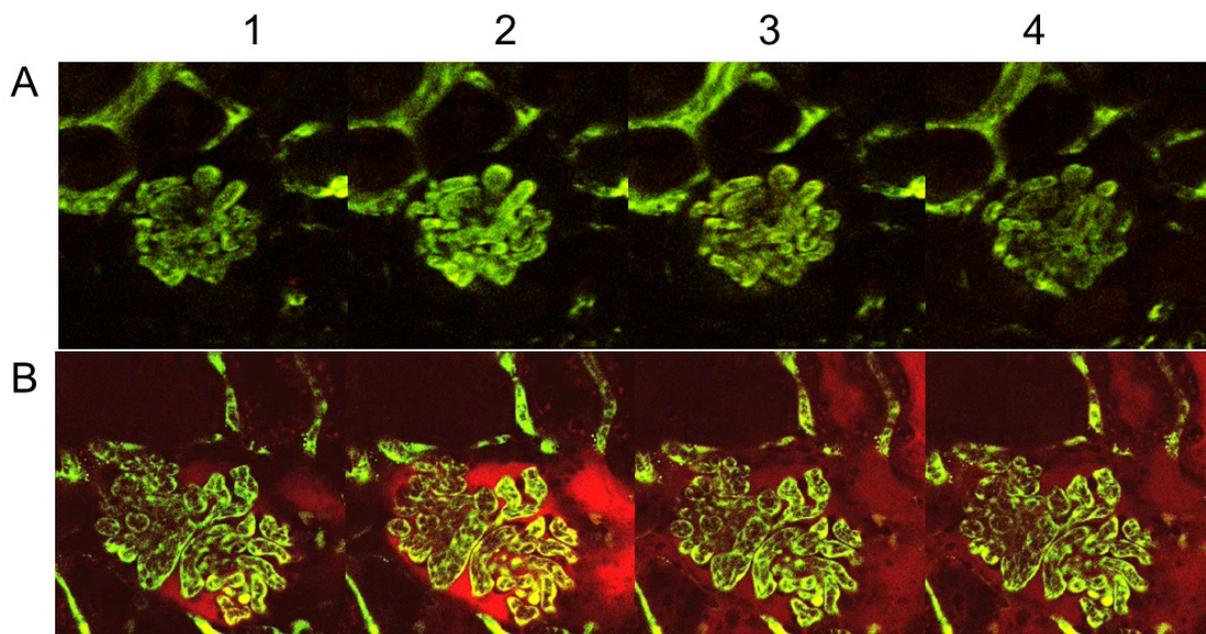


図2. 糖尿病腎糸球体における大分子量物質の過剰濾過。

正常ラット腎では赤色の texas red 標識 dextran (分子量 40 Kd) の糸球体毛細血管外への漏出は確認できないが、一方、STZ 糖尿病糸球体ではボウマン嚢腔内への著しい漏出が認められた。

rhodamine 標識 lectin を先行投与し、糸球体 Glycocalyx を可視化することで、Glycocalyx 減少部位 (内皮細胞障害部位) からアルブミンが漏出することが確認できた。同様に DAR-4M を同時灌流し bioavailable NO の減少部位との関連を評価した。以上により、Glycocalyx 破綻、NO 減少によって示される糸球体内皮細胞障害がアルブミン尿出現に深く関与することが示された。

2. 腎臓病の病態形成、心血管病との関連機序としての内皮機能障害の役割の解明

糖尿病糸球体では ROS 産生亢進と NO 産生低下を認めた。この ROS/NO 不均衡には、NADPH oxidase の活性亢進に加えて、eNOS 機能異常 (uncoupling) が関与することも判明した。Uncoupled NOS からは NO ではなく ROS がより多く産生されることが示された。さらにこの eNOS uncoupling には eNOS 補酵素である BH4 の低下が関与しており、BH4 産生酵素である GTP-CH1 活性化低下が一因であることも判明した。tie2-GTPCH-1Tg と Akita 糖尿病モデルとを交配させたところ、アルブミン尿の出現、内皮機能障害が抑制され、内皮機能障害が糖尿病性腎症の発症、病態形成に深く関与することが明らかになった。GTP-CH1 はプロテアソーム依存性に分解制御されている。AMP-activated protein kinase (AMPK) は proteasome 抑制活性を有しており、GTP-CH1 の分解抑制を介して内皮機能調節に関与することも明らかになった。

3. 臓器線維化における血管内皮機能障害の関与の検討

臓器線維化モデルとして、腹膜線維化モデルを用いた。マウス腹膜を機械的に擦過損傷することで経時的に腹膜肥厚、炎症細胞浸潤、腹膜線維化が出現した¹⁾。eNOS 遺伝子欠損動物に本モデルを作製したところ、腹膜肥厚、線維化、慢性炎症が遷延することが示された。血管内皮機能障害が腹膜線維化に関与することが判明した。

4. 他臓器の微小血流変化と内皮機能障害との関与

2-フォトンレーザー顕微鏡と各種蛍光標識プローブを用いて、生体動物 (ラット、マウス) においてラウ氏島の微小血流を可視化解析する技術を開発した²⁾。ラウ氏島微小血管の構築は腎糸球体に類似しており、細小動脈から分枝により直接灌流されている。血管内皮細胞が有窓性であることも共通している。アンジオテンシン II が用量依存性にラウ氏島輸入細動脈を収縮させ、興味深いことに β 細胞からのインスリン分泌を低下させることも示された。高血圧患者における糖尿病新規発症メカニズムの一因をなすものと考えられた。

考 察

慢性腎臓病 CKD は脳卒中, 心血管疾患, 認知機能障害の独立した, かつ強力なリスク因子である. とりわけアルブミン尿はごく微量段階から心血管病と強く関連している. 血管障害の最早期病態は内皮 (機能) 障害と微小炎症であり, アルブミン尿が内皮障害に基づき, 出現することが判明した^{3,4)}. 糸球体内皮が有窓性であるため, 透過性制御における役割は小さいと目されてきた. 一連の研究により研究技術上の隘路であった微小循環動態, 透過性変化を生体において直接可視化し解析しうる *in vivo* imaging 技術を確立し, 糸球体内皮細胞の役割が明かとなった. 本研究助成の支援を得て, CKD 発症, 進展阻止と心血管病予防のための統合的治療法の構築に資する成果を得ることができた.

研究をさらに進捗させることで, 国民の健康寿命延伸に貢献したいと願っている.

共同研究者

本研究の共同研究者は, 川崎医科大学腎臓・高血圧内科の佐藤 稔, 桑原篤憲, 庵谷千恵子および角谷裕之である. 研究助成をいただいたことに重ねて深謝申し上げます.

文 献

- 1) Kadoya, H., Satoh, M., Nagasu, H., Sasaki, T. & Kashihara, N. : Deficiency of endothelial nitric oxide signaling pathway exacerbates peritoneal fibrosis in mice. *Clin. Exp. Nephrol.*, **19** : 567-575, 2015.
- 2) Ihoriya, C., Satoh, M., Kuwabara, A., Sasaki, T. & Kashihara, N. : Angiotensin II regulates islet microcirculation and insulin secretion in mice. *Microcirculation*, **21** : 112-123, 2014.
- 3) 柏原直樹, 佐藤 稔 : 腎性老化 - Renal senescence. 腎と骨代謝, **28** : 7-16, 2015.
- 4) 柏原直樹, 桑原篤憲, 佐藤 稔 : 慢性腎臓病 (CKD) と心血管疾患の関連-血管内皮障害. カレントセラピー, **32** : 1060-1066, 2014.