

2018年 1月 10日

<研究課題> **筋腎連関に着目した有酸素運動による高齢慢性腎臓病の腎保護作用の検討**

代表研究者 聖マリアンナ医科大学解剖学機能組織 教授 池森敦子

共同研究者 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科 教授 柴垣有吾

聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科 研究員 大畑敬一

【まとめ】

腎内血行動態の悪化を再現した（尿中 L-FABP 値が上昇する）中高齢期 CKD モデル（アルドステロン投与）マウスにおける有酸素性運動トレーニングは、尿中ヒト L-FABP 値を低下させ、腎組織障害を軽減させることが示された。これらの結果より、中高齢期 CKD モデルマウスにおける有酸素性運動トレーニングは腎保護的に作用する可能性が考えられる。**運動は、薬物療法と比較し、医療経済面、安全面ですぐれており、だれでも安価にできるため、この研究成果の社会的意義は大きいと考えられる**

1. 研究の目的

慢性腎臓病 (CKD) は、進行すると末期腎不全や心血管障害による死亡など重大な転帰をもたらす。最近では高齢化社会に伴い、透析導入患者数のもっとも多いのは、男女とも 75-80 歳の高齢者であり、高齢者の CKD 進行防止が重要な課題となっている。高齢者の CKD は、加齢および動脈硬化に起因するため、腎疾患治療薬として広く使用されている薬剤（アンジオテンシン II 拮抗薬、アルドステロン系活性抑制薬）が効かず（むしろ悪化する）、非高齢者 CKD とは異なる進行防止策が必要である。本研究では、**有酸素運動が腎組織障害の進行を抑制する事**を、マウスを使用した高齢期腎疾患モデルで明らかにする。

2. 研究方法と経過

2-1 高齢期 CKD モデルの作成

高齢期 CKD として、deoxycorticosterone acetate (DOCA)-食塩負荷モデルを予定していたが、著明な尿量を認め、運動に支障をきたす可能性があるため、同じ腎障害機序を有し、腎機能障害が軽度なアルドステロン負荷を作成し検討した。尿細管低酸素による腎内微小循環障害をモニターできる尿 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) を指標にする。野生型マウスの腎臓では L-FABP が発現していないため、**ヒト L-FABP 染色体遺伝子導入 (Tg) マウス**を使用した。

この Tg マウス（オス、6-8 週齢、n = 34）を、コントロール群（n = 12）、アルドステロン群（n = 9）、運動+アルドステロン群（n = 9）、運動群（n = 4）に分けて 8 週間観察した。なお、アルドステロン群および運動+アルドス

テロン群のマウスには、試験開始 4 週間目の時点でアルドステロン (A9477; Sigma-Aldrich, Japan) の充填した浸透圧ポンプ (Alzet 1004; Durect, U.S.A) を皮下に埋め込んでアルドステロンを 4 週間連続的に全身投与した (0.125 μ /kg/min)。加えて、試験開始 5 週目の時点からは 1% の食塩水を自由飲水させた。コントロール群と運動群のマウスには、飼育開始 4 週間目の時点でアルドステロンの溶媒であるポリエチレングリコールの充填した浸透圧ポンプを皮下に埋め込んだ。運動+アルドステロン群および運動群のマウスには、ケージの中に回転輪 (ENV-044; Med Associates, U.S.A) を入れて自発走による有酸素性運動トレーニングを 8 週間継続させ、運動トレーニング期間中における回転輪の回転数と走行距離を連続的に記録した (SOF-860; Med Associates, U.S.A)。飼育期間終了後には、麻酔下で開腹し、各臓器を摘出した。摘出した臓器（腎臓・腓腹筋）は、それぞれ重量を測定し、一部の腎臓は、組織評価に用いるため、ホルマリンまたはカルノアで固定し、その他は、液体窒素で凍結して -80°C で保存した。なお、ホルマリンまたはカルノアで固定された腎臓は、後日、脱水処理を行い、パラフィンで包埋した。

2-2 測定項目

収縮期血圧

非観血血圧測定装置 (BP-98A; Softron, Japan) を用いて 2 週間毎に収縮期血圧の測定を行った。なお、測定は、1 個体につき 3 回ずつ行い、その平均値をその個体の収縮期血圧とした。

血液生化学検査

採血は、麻酔下にて開腹し、腹部大静脈から行った。採取した血液は、一定の時間を置いた後に遠心分離 (4°C, 15000 rpm, 10 分) し、分離された上清を血液生化学検査に用いた。血清シスタチン C 濃度 (Mouse Cystatin C ELISA kit; BioVendor Laboratory Medicine, Czech) と血清エンドセリン-1 濃度 (Endothelin-1 ELISA kit; Enzo Life Sciences, U.S.A) は ELISA 法を用いて測定した。血清ナトリウム濃度および血清カリウム濃度は電極法を用いて測定した (SRL, Inc.,

Japan).

尿生化学検査

採尿は、メタボリックケージを用いて行った。採取した尿を用いて尿中ナトリウム、カリウム、クレアチニン、アルブミン、L-FABP 濃度をそれぞれ測定した。尿中ナトリウム濃度および尿中カリウム濃度は、電極法を用いて測定し (SRL, Inc., Japan), 尿中クレアチニン濃度は、Jaffe 法を用いて測定した (Creatinine Assay Kit; BioAssay Systems, U.S.A)。尿中アルブミン濃度 (Albuwell M; Exocell, Inc., U.S.A) および human L-FABP 濃度 (Human L-FABP ELISA kit; CMIC Co., Ltd., Japan) は、ELISA 法を用いて測定した。なお、随時尿の尿比重による誤差をなくすために尿中ナトリウム、カリウム、アルブミンおよびヒト L-FABP 濃度は、いずれも尿中クレアチニン濃度を用いて補正した。

腎組織評価 (一般形態学および免疫組織化学的評価)

パラフィン包埋した腎臓を 3 μ m 毎に薄切し、組織切片スライドを作成した。その後、一般形態学的评价として、尿細管間質障害を PAS (periodic acid-Schiff) 染色で評価した。加えて、マクロファージに対する抗体 (F4/80; BMA Biomedicals, Switzerland), タイプ I および タイプ III コラーゲンに対する抗体 (Cedarlane Laboratories Ltd., Canada), α SMA (α -smooth muscle actin) に対する抗体 (Abcam plc, United Kingdom) をそれぞれ使用し、the ImmPRESS™ Polymerized Receptor Enzyme Staining System (Vector Laboratories, Inc., U.S.A) によって免疫組織化学的評価を行った。なお、各染色領域の定量化は、盲目的に標本を選択し、各標本の皮質から皮髄境界部を対物レンズ 10 倍で 7-10 視野取り込み、画像解析ソフト (WinROOF; MITANI Corporation, Japan) を用いて行った。

統計処理

各群間の比較は、一元配置の分散分析を用いて行い、その後の多重比較検定には、Tukey 法を用いた。さらに、尿中 human L-FABP 値と腎組織評価の関連性の検討には、Spearman の順位相関係数 (r_s) を用いた。なお、全ての統計処理は、SPSS 21.0 (SPSS, IBM, Japan) を用いて行い、統計学的有意水準は 5%未満とした。統計処理各測定データ値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。

3. 研究の成果

3-1 体重・組織重量・尿量・走行距離

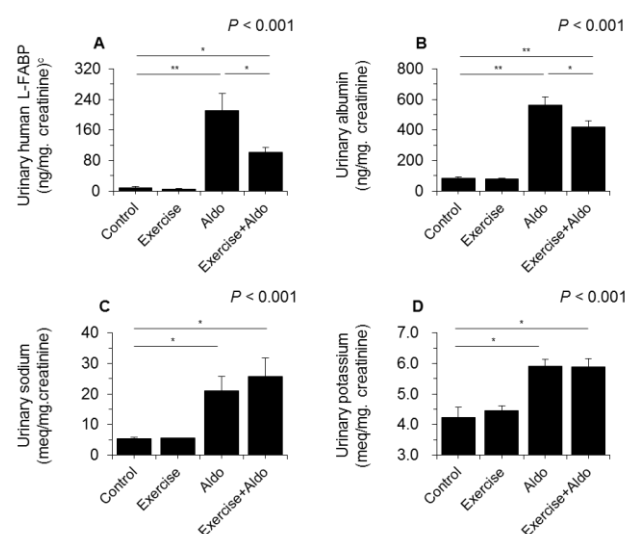
体重は、コントロール群に比べて運動群と運動+アルドステロン群で有意に低値を示し、アルドステロン群に比べて運動+アルドステロン群で有意に低値を示した。腎重量は、コントロール群に比べてアルドステロン群と運動+アルドステロン群で有意に高値を示した。尿量は、コントロール群に比べて運動+アルドステロン群で有意に高値を示した。8 週間の有酸素性運動トレーニング期間中の総走行距離および一日平均走行距離は、運動群に比べて運動+アルドステロン群でいずれも短い傾向にあった。さらに、一日平均走行距離を経時変化で見ると、飼育開始 4 週間目における浸透圧ポンプの埋め込み処置後から両群共に一日平均走行距離が漸減し、1%食塩水の負荷後 (飼育開始 5 週目時点) から有意な差が認められた。

3-2 収縮期血圧の経時的変化

飼育開始 4 週間目における浸透圧ポンプの埋め込み処置後からアルドステロン群と運動+アルドステロン群で収縮期血圧の上昇が確認された。一方で、8 週間の飼育後における収縮期血圧は、コントロール群、運動群、運動+アルドステロン群に比べてアルドステロン群のみで有意に高値を示した。

3-3 血液生化学データ

血清シスタチン C 濃度は、コントロール群に比べて運動+アルドステロン群で有意に低値を示した。血清エンドセリン-1 濃度は、4 群間に有意な差はなかった。その一方で、血清ナトリウム濃度は、コントロール群に比べてアルドステロン群と運動+アルドステロン群で有意に高値を示し、血清カリウム濃度は、コントロール群に比べてアルドステロン群に



において有意に低値を示した。

3-4 尿生化学データ

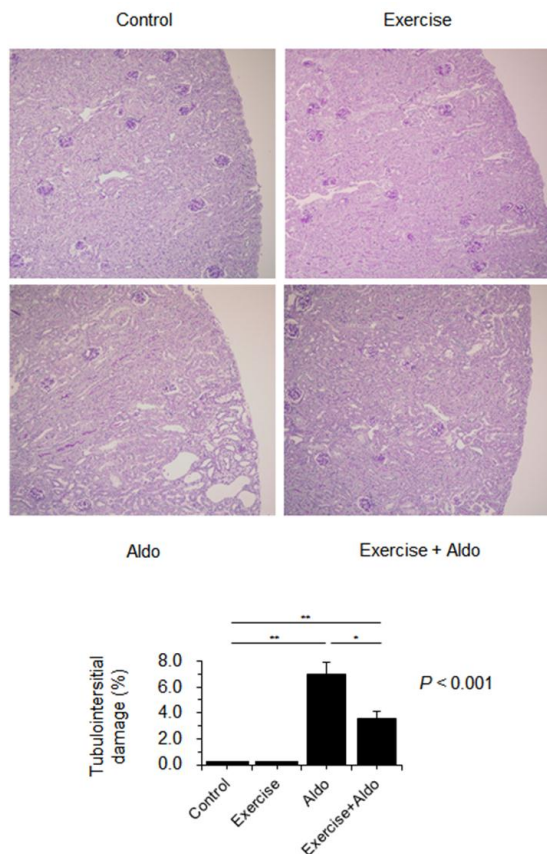
尿中ヒト L-FABP 値および尿中アルブミン

値は、コントロール群に比べてアルドステロン群と運動+アルドステロン群で有意に高値を示し、アルドステロン群に比べて運動+アルドステロン群で有意に低値を示した。

さらに、尿中ナトリウム値と尿中カリウム値は、コントロール群に比べてアルドステロン群と運動+アルドステロン群で有意に高値を示した。

3-5 腎組織評価（一般形態学および免疫組織化学的評価）

尿細管間質障害の程度 {PAS 染色 (図 1), マクロファージの浸潤程度} および尿細管間質線維化の程度 (タイプ I コラーゲン, タイプ III コラーゲン, α SMA) は、全て、コントロール群に比べてアルドステロン群と運動+アルドステロン群で有意に強く、さらに、アルドステ



ロン群に比べて運動+アルドステロン群で有意に軽減していた。

図 1 PAS 染色による尿細管間質障害の評価

3-6 尿中ヒト L-FABP 値と腎組織障害および収縮血圧の関連性

8 週間の飼育後における尿中ヒト L-FABP 値は、尿細管間質障害の程度 (PAS 染色), マクロファージの浸潤程度 (F4/80), 尿細管間質線維化の程度 (タイプ I コラーゲン, タイプ III コラーゲン, α SMA) および収縮期血圧といずれも有意な正の相関関係を示した。

3-7 結果の考察

本検討では、腎内血行動態の悪化を再現した (尿中ヒト L-FABP 値が上昇する) 中高齢期 CKD モデル (アルドステロン投与) マウスでの有酸素性運動トレーニングが尿中 human L-FABP 値および腎組織障害に及ぼす影響を検討した。その結果、尿中 human L-FABP 値は、アルドステロン群に比べて運動+アルドステロン群において有意に低値を示し、様々な腎組織障害 (尿細管間質障害, マクロファージ浸潤, 尿細管間質線維化) の程度もまたアルドステロン群に比べて運動+アルドステロン群で有意に軽減していた。これらの結果より、中高齢期 CKD モデルマウスにおける有酸素性運動トレーニングは、腎保護的に作用する可能性が示された。

先行研究において、有酸素性運動トレーニングは、高血圧, 糖尿病および心不全などに伴って生じる腎組織障害を軽減することが明らかにされている。加えて、高齢 (23 ヶ月齢) のラットにおける有酸素性運動トレーニングもまた、腎内の酸化ストレスや炎症の程度を軽減することで腎保護的に作用することが報告されている。さらに、本検討において、有酸素性運動トレーニングは、アルドステロンの投与によって生じる様々な腎組織障害 (尿細管間質障害, マクロファージ浸潤, 尿細管間質線維化) の程度を軽減することが示された。したがって、これら一連の結果から、有酸素性運動トレーニングは腎障害の原疾患 (原因) に関わらず、腎保護的に作用する可能性が考えられる。

私たちは、ヒト (中高齢者) における有酸素性運動トレーニングは、尿中 L-FABP 値を低下させること (腎内血行動態を改善させる可能性) を明らかにしている。加えて、本検討において、中高齢期 CKD モデルマウスにおける有酸素性運動トレーニングは、アルドステロン投与によって生じる尿中ヒト L-FABP 値の上昇を軽減すること (腎内血行動態の悪化を抑制する可能性) が示された。さらに、8 週間飼育後の尿中ヒト L-FABP 値は、様々な腎組織障害の程度といずれも正の関連性を示した。したがって、有酸素性運動トレーニングによって改善する腎内血行動態は、一部、有酸素性運動トレーニングの腎保護効果に寄与している可能性が考えられる。

有酸素性運動トレーニングの腎保護効果についての詳細な分子機序を検討した先行研究によると、高血圧性腎症モデルラットにおける有酸素性運動トレーニングは、高血圧によって引き起こされる活性酸素や腫瘍壊死因子の産

生を抑制することに加え、アンジオテンシン変換酵素やアンジオテンシンⅡ受容体の発現を抑制することが明らかにされている。さらに、有酸素性運動トレーニングは、高血圧に伴う腎臓内のグルタチオンペルオキシダーゼや一酸化窒素合成酵素の発現低下を抑制することも示されている。これらの結果から、高血圧性腎症モデルラットにおける有酸素性運動トレーニングは、酸化ストレス、炎症およびレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の軽減に加えて、腎臓内における抗酸化能の亢進や一酸化窒素合成酵素の発現亢進などを介して腎保護的に作用している可能性が考えられる。一方で、本検討では、血管内皮由来のペプチドで、強力な血管収縮作用を有するエンドセリン-1の血清濃度がアルドステロン群に比べて、運動+アルドステロン群において低値を示す傾向にあった。この結果は、運動+アルドステロン群における血圧上昇の抑制および腎組織障害の軽減に一部関与している可能性が考えられる。しかしながら、本検討においては、その他の有酸素性運動トレーニングがもたらす腎保護効果についての詳細な分子機序の検討が十分に行えていない。したがって、今後は、上記に示すような分子機序(酸化ストレスの関与など)の解明が必要である。

4. 今後の課題

①本検討では、有酸素性運動トレーニングが

アルドステロン投与によって生じる尿中ヒトL-FABP値の上昇を抑制する(腎内血行動態の悪化を抑制する)詳細な分子機序の検討が行えていない。さらに、有酸素性運動トレーニングがもたらす腎保護効果についての詳細な分子機序の検討も十分に行えていない。このことから、本検討で得られた中高齢期CKDモデルマウスにおける有酸素性運動トレーニングの腎保護効果に関する分子機序は不明である。

②本検討においては、マウスにおける有酸素性運動トレーニングとして回転輪による自発走を用いた。しかしながら、運動+アルドステロン群においては、アルドステロンの充填した浸透圧ポンプを皮下に埋め込む処置を実施した後(飼育開始4週目以降)から徐々に走行距離が減少することが確認された。このことから、アルドステロンの投与中は、有酸素性運動トレーニングが十分に実施できていない可能性が考えられる。したがって、今後は、トレッドミルなどを用いた有酸素性運動トレーニングの腎保護効果を検討し、その分子機序の解明が必要である。

5. 研究成果の公表方法

英語論文発表、国内・国外での学会発表

以上