

学位論文要旨

多価不飽和脂肪酸摂取による慢性腎不全抑制機構の解明

学位申請者 氏名 村松 弘樹

慢性腎不全とは各種の腎疾患によって長期にわたり腎機能が低下している病態の総称である。近年、日本では欧米諸国と比較して、人工透析を受ける患者数が年々増加傾向にあり、患者数増加に伴う医療費の高騰が社会問題につながっている。このような現状を踏まえ、慢性腎不全の進行を遅延させる手法の確立が重要となる。日常摂取する栄養素の一つである脂肪酸は、生体内におけるエネルギー源としてだけでなく、受容体やその他の結合タンパク質を介して様々な生体反応に関与している。脂肪酸の中でも多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は必須脂肪酸と呼ばれ、生体反応の機能維持に重要であることが知られている。 ω 6系 PUFA のアラキドン酸 (ARA) は腎臓の生理的機能の維持や発達に関与している。ARA から代謝され生成するプロスタグランジンは腎臓の血流や体内の水分量、 Na^+ 濃度の恒常性の調節をする働きがある。 ω 3系 PUFA のドコサヘキサエン酸 (DHA) から生成される代謝物は高い抗炎症性作用を持ち、メタボリックシンドロームに伴う腎障害進行抑制効果や、虚血性急性腎不全の発症抑制効果を持つことが知られている。そのため、ARA が生理的な腎臓の維持機能により、また、DHA の高い抗炎症作用により慢性腎不全進行を抑制するのではないかと考えた。しかし、慢性腎不全の進行に対する ARA や DHA の摂取の効果を検討した報告はない。そこで本研究では、5/6腎摘出型慢性腎不全モデルラットを用いて、ARA や DHA を含む食餌の摂取による慢性腎不全の進行に対する影響を検討した。

第1章 慢性腎不全ラットの腎機能に対する多価不飽和脂肪酸摂取による影響

第1章では、5/6腎摘出型慢性腎不全モデルラットを用いて、ARA や DHA の摂取による慢性腎不全の進行に対する影響を評価した。慢性腎不全ラットの腎機能評価を行ったところ、モデルの作製から12週間かけて尿中アルブミン排泄量の有意な増加が認められ、進行的に腎機能が低下した。さらに、ARA や DHA を含む食餌の摂取により、慢性腎不全ラットの尿中アルブミン排泄量の増加が顕著に軽減し、腎機能の低下および慢性腎不全の進行を抑制させることを本研究で初めて明らかにした。この尿中アルブミン排泄の抑制理由を調べるために、腎機能低下に関与する酸化ストレスを評価し、腎機能との関係性を評価したところ、腎不全処置4週間後の血漿中過酸化脂質の増加と、尿中アルブミン排泄量との間に有意な正の相関性を認められたため、腎不全処置後は直ちに血漿中に酸化ストレスが生じ、腎機能を低下させることが考えられた。さらに、血漿中過酸化脂質の増加に対してARA や DHA を含む食餌の摂取が抑制効果を示し、腎機能の低下を抑制させる可能性が考えられた。しかし、腎不全処置4週間後における腎臓中の酸化ストレスについては測定できておらず、慢性腎不全ラットの腎臓中の酸化ストレスと腎機能低下の直接的な関係は不明であった。そのため第2章では、腎不全処置4週間後の腎臓中酸化ストレスを測定し、腎機能との関係性を評価することとした。

第2章 慢性腎不全の腎臓中酸化ストレスと線維化に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

前述したように第2章では、ARAとDHAの摂取による慢性腎不全モデル作製4週間後の腎臓中酸化ストレスに対する影響を評価した。腎不全処置4週間後の腎臓中では、酸化ストレスが増大し、腎機能低下に寄与することが示された。また、DHAを含む食餌の摂取が腎臓中の酸化ストレス増大を抑制させることがわかった。さらに、腎不全処置4週間後の腎臓中酸化ストレスの増大には尿毒症物質の1種であるインドキシル硫酸(IS)の蓄積が関与していることがわかった。腎機能が低下すると、腎臓にISが蓄積し、NADPHオキシダーゼが活性化されることで、活性酸素が過剰生成し、酸化ストレスを生じることが報告されている。本研究では、腎不全4週間後の腎臓中にIS量の顕著な増加を確認し、酸化ストレスの増大に関与することを明らかにした。また、腎臓中のIS量増加による酸化ストレスの誘導は、炎症や腎線維化の発生につながる。腎不全処置4週間後の慢性腎不全ラットの腎臓では、炎症促進に関与するM1マクロファージの活性化により炎症性サイトカインを増加させ、腎線維化を促した可能性が考えられた。さらに、この腎線維化の増加が尿中アルブミン排泄を増加させ、腎機能の低下につながったことが考えられた。また、DHAを含む食餌を摂取した慢性腎不全ラットでは、腎臓中のIS蓄積及び、酸化ストレスの増大や線維化の誘導を抑制させ、腎機能低下を抑制させたことを明らかにした。

第3章 慢性腎不全の腎足細胞や近位尿細管再吸収能に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

第2章では、ARAを含む食餌の摂取による尿中アルブミン排泄の抑制作用については不明なままであった。そこで本章では、尿中アルブミン排泄の発生に関与し、糸球体濾過障壁の構成因子の1つである足細胞や近位尿細管のアルブミン再吸収能への影響に対してARAやDHAを含む食餌の摂取がどう影響するか評価した。足細胞は、足突起とスリット膜によって構成され、腎障害時には足突起の消失やスリット膜の損傷が起き、尿中アルブミン排泄が発生することが報告されている。本研究では、走査型電子顕微鏡観察により、腎不全処置16週間後の慢性腎不全ラットにおいて足突起が消失し、足細胞損傷が生じていることを発見した。この足細胞損傷については腎臓中足細胞関連因子の遺伝子発現低下により生じたことが考えられた。対して、ARAを含む食餌の摂取によりこの損傷の抑制効果を示したことを発見した。この抑制効果については、ARAを含む食餌の摂取が慢性腎不全ラットの腎臓中のスリット膜や足突起に関連する遺伝子発現量の低下を抑制させたことが関与することがわかった。近位尿細管におけるアルブミン再吸収能には近位尿細管管腔内に発現するmegalinが関与する。糸球体から漏出したアルブミンをmegalinが近位尿細管へ再吸収させることで、尿中アルブミンの発生を抑えることが報告されている。本研究では、腎不全処置16週間後の慢性腎不全ラットの腎臓において、megalin発現が顕著に減少し、アルブミン再吸収能の低下に関与した可能性が考えられた。対して、ARAを含む食餌の摂取が、腎臓中のmegalin発現の減少を抑制し、またはその発現を促進させた。さらに、近位尿細管細胞へのARA添加がアルブミン再吸収能の向上に作用することを示した。

総括

本論文では、DHAの摂取により、腎臓中の酸化ストレスや線維化などの腎障害が抑制され、ARAの摂取は腎臓の生理的機能である糸球体濾過能やアルブミン再吸収能の低下を抑制することで尿中アルブミン排泄の増加を軽減し、慢性腎不全の進行を抑えることが明らかとなった。これらのことから、慢性腎不全の新しい予防方法としてARAとDHAを含む食事の摂取が有用であることを提供したと考えられた。

Thesis summary

Mechanism of Preventing Chronic Renal Failure Progression by Intake of Polyunsaturated Fatty Acid

Hiroki Muramatsu

Chronic renal failure (CRF) is general term that kidney diseases of renal function decreasing as long as by various kind of kidney diseases. The number of patients undergoing dialysis in Japan has increased compared to those in Western countries, the health expenditures have increased. Consequently, this increase has become a social problem. Therefore, it is important to establish a method to delay the progression of CRF. Fatty acids are nutrients that are consumed daily, which act not only as an energy source but also help to carry out various biological reactions through receptors and other binding proteins. The intake of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) is necessary because they are difficult to biosynthesize in sufficient amounts *in vivo*. Arachidonic acids (ARA), omega-6 (ω -6) PUFAs, are involved in the development and maintenance of normal renal functions. Prostaglandin (PG), ARA metabolites, adjust the blood flow to the kidneys, the amount of body water, and the balance of minerals concentration. Docosahexaenoic acid (DHA) is omega-3 (ω -3) PUFAs that has anti-inflammatory effects, protect against ischemic acute renal failure, streptozocin-induced type 1 diabetes, and type 2 diabetic nephropathy in rodents. However, their effects on the progression of CRF remain unknown. The current study aimed to assess the influence of ARA-and DHA-containing diets intake in 5/6 nephrectomized rats.

Part 1: Influence of Polyunsaturated Fatty Acid Intake on Kidney Functions of Rats with Chronic Renal Failure

In part 1: we assessed the effects on CRF progression of feeding ARA-or/and DHA-containing diets on rats with 5/6 nephrectomized. It is the first time to find that urinary albumin excretion was significantly increased with nephrectomy, but it was attenuated by feeding with an ARA and DHA-containing diet. It has been known that an increase in oxidative stress reduces renal functions. We found that lipid peroxide level was increased in the plasma at 4 weeks after nephrectomy and it involved decreasing renal functions. Moreover, intake of ARA and DHA containing diet suppressed lipid peroxide level in the plasma at 4 weeks after nephrectomy, there suggest that ARA and DHA could suppress oxidative stress in the early time of renal failure and inhibit the progression of renal failure. However, the oxidative stress level in the kidney was not assessed at the early stage of renal failure. Therefore, in the part 2, we measured the oxidative stress in the kidney at 4 weeks after nephrectomy and assessed relation of oxidative stress and renal functions.

Part 2: Suppressing Effects of Docosahexaenoic Acid-Containing Diets on Oxidative Stress and Fibrosis in 5/6 Nephrectomy Rats

The current study aimed to investigate the effects of ARA-or/and DHA-containing diets on oxidative stress in 5/6 nephrectomy rats. Oxidative stress levels in the kidney were found to be significantly increased at 4 weeks after nephrectomy, this oxidative stress levels in the kidney to be associated with decreased renal function. On the other hands, increasing of oxidative stress in the kidney at 4 weeks after nephrectomy was attenuated by intake of DHA containing diet. Moreover, we found that this increasing of oxidative stress is involved with indoxyl sulfate (IS), an uremic toxin. It has been reported that IS accumulation is involved with kidney inflammation and fibrosis. In this study, we found that kidney fibrosis was significantly increased at 4 weeks after nephrectomy, increasing of oxidative stress levels via IS accumulation in the kidney to be associated with kidney fibrosis. However, intake of DHA containing diet has suppress effects on kidney injury via oxidative stress and kidney fibrosis at 4 weeks after nephrectomy. We suggested that these suppress effect is prevented decreasing of renal function on CRF progression.

Part 3: Maintaining Effects of Arachidonic Acid-Containing Diets on Podocyte and Albumin Uptake via Megalin of 5/6 Nephrectomy Rats

In part 2, intake of ARA containing diet suppress effect on urinary albumin excretion has been unclear. The current study aimed to investigate the effects of ARA-or/and DHA-containing diets on podocyte on glomeruli and albumin reabsorption via megalin on proximal renal tubule in 5/6 nephrectomy rats. In this part, we found that occurred foot process effacement by using SEM. We suggested that this podocyte injury was occurred due to downregulate of podocyte related proteins gene expression in 5/6 nephrectomy rats. Moreover, we found that these injuries were suppressed effect by intake of ARA containing diet. It has been known that albumin is slightly filtrate from glomeruli even if normal renal function, megalin uptake filtrated albumin to proximal renal tubule and prevent urinary albumin excretion. Megalin expression in proximal renal tubule was significantly decreased in 5/6 nephrectomized rats. This decreasing has been involved with decrease albumin uptake at proximal renal tubule. However, intake of ARA containing diet has suppress megalin expression decreasing in 5/6 nephrectomized rats.

Summary: In this study, we found the first time that intake of DHA could suppress oxidative stress and fibrosis in the kidney, intake of ARA could suppress podocyte injury and decreasing of megalin expression. Consequently, we suggested that intake of DHA and ARA containing diet could suppress of urinary albumin excretion and prevent CRF progression.

論文審査の結果の要旨

慢性腎不全は、長期にわたり腎機能が低下している病態の総称である。現在の医療技術では一度機能が低下した腎臓を元の状態に回復させることは難しい。近年、日本では人工透析を受ける患者数が年々増加傾向にあり、医療費が1兆円を超えるなどの社会問題となっている。このような現状を踏まえ慢性腎不全の進行を遅延させる手法の確立が重要となっている。村松弘樹氏は、日常摂取する栄養素の一つである脂肪酸、中でも必須脂肪酸の多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) は生体機能に重要であり、特に ω 6系PUFAのアラキドン酸 (Arachidonic acid, ARA) が腎臓の生理的機能の維持や発達に関与することや、さらに、 ω 3系PUFAのドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) が抗炎症や腎保護作用を持ち、メタボリックシンドロームに伴う腎障害進行や虚血性急性腎不全の発症の抑制効果を持つことに着目し、ARAやDHAを含む食事の摂取が、慢性腎不全の進行を遅らせる新しい方法として開発可能になると考えた。未だ慢性腎不全の進行に対するARAやDHAの摂取の効果を詳細に検討した報告がないことから、本論文では、5/6腎臓摘出型慢性腎不全モデルラットを用いて、ARAとDHA摂取による慢性腎不全の進行に対する影響を解析する課題に取り組んだ。その成果は、「多価不飽和脂肪酸摂取による慢性腎不全抑制機構の解明」としてまとめられている。以下にその内容を要約する。

第1章 慢性腎不全ラットの腎機能に対する多価不飽和脂肪酸摂取による影響

試験に先立ち、ラットの腎臓を5/6摘出(以下施術)すると、腎機能の指標であるクレアチニンクレアランス値の低下や尿中アルブミン排泄量の増加が12週間かけて進行的に起こることを示し、本ラットが慢性腎不全の病態メカニズムを解明するモデルとして有用であることを確認している。このモデルにおいてARAとDHAの併用摂取は、尿中アルブミン量増加を有意に軽減し、慢性腎不全の進行を抑制させることが見出された。このことから、ARAやDHAを含む食事の摂取が慢性腎不全の進行遅延に有用だと推察された。そこで、酸化ストレスが腎機能を低下させることが知られているため、本モデルにおける腎臓中の酸化ストレスと腎機能、そしてARA、DHA摂取の関係を評価したところ、施術16週間後に腎臓中の過酸化物質の変化が認められなかったが、ARAとDHAの併用摂取にて減少したことを確認している。しかし、施術16週間後における腎臓中の過酸化物質と腎機能の間に相関関係が認められていない。そこで、施術4週間後の血漿中の過酸化脂質 (Lipid hydroperoxide, LPO) と腎機能の関連を検討したところ、その増加と腎機能との間に有意な相関性が認められ、さらに、ARAとDHAの摂取によって血漿中のLPO量が有意に低下することを明らかにしている。

これらの結果から、ARAとDHA摂取は腎機能低下に関与する酸化ストレスを抑制し、慢性腎不全の進行を抑制する可能性を見出している。

第2章 慢性腎不全の腎臓中酸化ストレスと線維化に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

第1章において施術16週間後では腎臓中の活性酸素種 (ROS) 量と腎機能との関連が確認できなかったが、腎不全初期である施術4週間後のROS量を測定することにより、ROS量の増加が腎機能低下につながることを示し、さらに、DHA摂取がROS量を減少させる結果を得て、酸化ストレスを介した腎不全メカニズムを評価している。DHA摂取によるROS量抑制メカニズムを探るため、施術4週間

後の腎臓中の抗酸化酵素の catalase や glutathione peroxidase mRNA 発現量を検討した結果、Sham 群と比較して、いずれの処置群も mRNA 発現量が顕著に減少し、PUFA 摂取による回復は認められていない。一方、ROS を増大させる要因の 1 つである尿毒症物質のインドキシル硫酸 (IS) の腎臓中の蓄積は施術 4 週間後に ROS の増加と相関性を示し、また、DHA の摂取がその蓄積を抑制することを明らかにしている。IS による ROS の誘導が炎症や線維化につながるが、腎臓中の炎症促進に関与する M1 マクロファージの活性化に伴い増加する TNF- α は DHA の摂取により抑制効果を示す結果を得たが、M2 マクロファージの活性化に伴う TGF- β 1 の発現は DHA 摂取の影響を示していない。しかし、ROS によって活性化された extracellular signal-regulated kinase が α -smooth muscle actin の発現を促す系において DHA 摂取が発現を抑制する結果を得ている。

これらの結果から、第 2 章では DHA の摂取が腎臓組織における IS の蓄積を抑制し、酸化ストレスや腎線維化を介した慢性腎不全の進行を抑制したことを明らかにしている。

第 3 章 慢性腎不全における腎足細胞や近位尿細管再吸収能に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

第 2 章では、施術 4 週間後の酸化ストレスや線維化に対して、ARA 摂取の抑制効果を確認できなかったことから、ARA 摂取の尿中アルブミン排泄の原因とされる糸球体濾過に重要な足細胞への効果や、近位尿細管におけるアルブミン再吸収能に対する影響について、DHA 摂取と共に評価している。足細胞の評価では走査型電子顕微鏡観察の結果より、施術 16 週間後、足細胞の足突起の消失やスリット膜の損傷を引き起こしていたが、ARA もしくは ARA+DHA 摂取が足突起の消失、及びスリット膜の構造に重要なタンパクである nephrin、podocin、cd2ap、 α -actinin-4、synaptopodin、及び podocalyxin の mRNA 発現低下を抑制することを確認している。さらに、近位尿細管において、アルブミン再吸収能に関与する megalin の mRNA においても発現低下を抑制したことを示している。Megalin を介したアルブミンの再吸収能においては、腎尿細管細胞株を用いた transwell による *in vitro* 系で検討しており、Well 上層への ARA 添加は IS によるアルブミン取り込み量の減少を回復させるだけでなく、顕著に増加させた結果を得ている。

これらの結果から、ARA は足細胞の構造を維持するだけでなく、megalin 発現を増加させ尿中アルブミン排泄を軽減することを示している。

以上、DHA の摂取は腎臓中の腎障害を促進させる酸化ストレスや腎臓組織の線維化などの抑制、そして、ARA の摂取は腎臓の生理的機能である糸球体濾過やアルブミン再吸収能の低下を抑制することで尿中アルブミン排泄の増加を抑制し、慢性腎不全の悪化を抑えることを明らかにした。

現在の医療では、慢性腎不全に対する治療法はなく改善させることが難しく、また人工透析や厳格な食事制限を含め患者の負担も大きく、症状の悪化をできる限り遅らせることがとても重要である。本研究の結果は、厳格な食事制限の下でも比較的簡易にできる ARA や DHA を含む食事の摂取が慢性腎不全進行を遅らせる新しい方法としての可能性を提供したものとして高く評価できる。

これらの実験は、論理的に計画され、また実施されており、研究倫理における問題も指摘されない。その研究成果は、投稿論文として公表されており、本論文は本研究科課程による博士 (薬科学) の学位を与えるに十分値するものである。従って、論文審査結果を合格と判断する。