

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01865

研究課題名(和文)慢性腎不全の進行に伴う認知機能低下機構の解明 - 神経新生抑制の関与

研究課題名(英文) Mechanisms of decline of cognitive functions by chronic renal failure involving neurogenesis

研究代表者

片倉 賢紀 (KATAKURA, MASANORI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：40383179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎不全により認知機能の低下するリスクが高まる機構として、慢性腎不全による認知機能低下に脳内の神経新生の低下が関与するのではないかと仮説を立て検証した。慢性腎不全モデルラットでは、認知機能が低下し、抑うつ症状が認められた。脳の組織学的解析の結果、記憶や学習に関係のある海馬でミクログリアが活性化され、神経新生が抑制されていた。尿毒症物質を定量したが、血漿や腎臓では増加が認められたが、脳ではほとんど検出されなかった。今後さらなる原因物質の探索が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全による透析患者は、年々増加し、支出される医療費の増加が社会問題となっている。また、慢性腎不全による死亡は死亡原因の第7位であり、国民病となっている。慢性腎不全の主要な原因疾患は糖尿病であるが、加齢によっても進行する。透析は社会活動が制限され、腎機能の低下による認知機能低下するため健康寿命を短縮している要因である。本研究は、慢性腎不全患者の健康寿命を延伸するための一助となる可能性のある研究である。

研究成果の概要(英文)：As a mechanism that increases the risk of cognitive decline due to chronic renal failure, we hypothesized that decrease of neurogenesis in the brain of hippocampus might be involved in cognitive decline due to chronic renal failure. In the rat model of chronic renal failure, cognitive function were decreased and depressive symptoms were observed. As a result of histological analysis, microglia, involved in inflammation, were activated and neurogenesis was suppressed in the hippocampus, related to memory and learning. Uremic toxins were increased in plasma and kidney, but hardly detected in brain. It is necessary to find other uremic toxins which accumulate in the brain.

研究分野：栄養生理学

キーワード：加齢・老化 慢性腎不全 炎症 抑うつ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎臓は、今の医療技術では再生が難しく、一度悪くなるともとは戻せない。移植できる数も限られているので、透析を行うこととなる。日本では人工透析を受ける患者数は 2011 年に 30 万人に達し、その後も増加の一途をたどっている (わが国の慢性透析療法の現状、日本透析医学会、2014)。この増加率は、高齢化のスピードと同等であり、2025 年までは増加し続けると予想されている。しかし、人工透析を定期的に行ったとしても腎臓の機能を代替できるわけではなく、高血圧、貧血、骨折などの問題が残る。また、腎機能の低下により認知機能障害のリスクが増加することは多くの疫学調査により報告されており (Ruebner et al., *Am J Kidney Dis.* 2016; Buchman et al., *Neurology* 2009)、我々は、この点に注目している。腎機能の低下による認知機能低下の機構として 1) 透析等による日常運動量の低下に伴う極度の筋力低下 (サルコペニア)、2) 尿毒症物質による脳の障害があげられる。本研究で筆者らはその他の機構として、神経新生の抑制の関与について検証した。

### 2. 研究の目的

慢性腎不全は認知機能低下の危険因子の一つであることが明らかになりつつあり、詳細は明らかでないが、脳血管障害の関与が示唆されている。申請者らは、これまで、神経新生の促進が認知機能の改善に関与することを明らかにしてきた。この結果をふまえて、腎不全により神経新生が抑制され、脳の構造的な変化が生じることが、認知機能の低下の原因ではないかと考えた。本研究では、腎機能の低下による認知機能の低下の機序を行動学的、組織学的、免疫学および分子生物学的に検討する。さらに、脳の変化の原因となる生体内物質 (尿毒素) を同定することを目指す。本研究により詳細な機構が明らかになれば、慢性腎不全患者の認知機能低下を抑制し、健康寿命の延伸および平均寿命との差を短縮するための予防・診断・治療法を提案できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 慢性腎不全モデルラットの作成

3 種混合麻酔下で、左腎の上下 1/3 ずつを切除し、止血後、残存腎を腹腔内に戻し、縫合した。1 週間の回復期間後、右腎を全摘した。摘出直後から 4 週ごとに、ラットを代謝ケージに収容し、24 時間尿を採取した。血漿と尿中のクレアチニンを定量し、クレアチニンクリアランスを算出した。また、尿中アルブミン量も定量した。

#### (2) 行動実験

認知機能として新奇物体認識試験を行った。うつ様症状の指標としてスクロース嗜好試験を行った。リック解析式選択嗜好実験装置を使用し、スクロース溶液に対する嗜好性を試験する。装置に左右のうち一方のボトルには水のみを、もう一方にはスクロース溶液を入れた。ボトルの先端を舐める行動回数、継続時間を自動計測した。

#### (3) 海馬神経新生の計測

海馬の新生細胞を可視化するために、摘出した脳をホルマリンで固定後にスクロースで置換後、40  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。切片を Ki67 を免疫染色した。また、脳内での炎症を評価するためにミクログリアを標識するために Iba-1 染色を行った。

#### (4) 尿毒症物質の同定

血漿と脳ホモジネートを、アセトニトリルで除タンパクし、高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) を用いて、代表的な尿毒症物質であるインドキシル硫酸を定量した。また、血漿中の多価不飽和脂肪酸酸化代謝物を網羅的に定量した。

### 4. 研究成果

(1) 慢性腎不全処置の結果、糸球体ろ過量 (GFR) の指標である、クレアチニンクリアランス値は、腎不全処置 4 週後に腎臓を摘出していない sham 群と比較して、約半分に低下した。その後、ほぼ一定であった。一方、尿中のアルブミン排泄量は、腎不全処置 4 週後に sham 群と比較して約 14 倍 ( $84.8 \pm 16.1 \text{ mg}/24\text{hr}$ ,  $1262.8 \pm 507.6 \text{ mg}/24\text{hr}$ )、12 週後では約 17 倍多かった ( $239.3 \pm 71.6 \text{ mg}/24\text{hr}$ ,  $4128.5 \pm 1061.23 \text{ mg}/24\text{hr}$ )。この結果から、この慢性腎不全モデルは、進行性慢性腎不全モデルであることを確認した。

(2) 認知機能を測定するために、新規物体認識試験を行った。その結果、腎不全群で sham 群と比較して有意に新規物体探索時間が減少した。このことから、慢性腎不全によりラットの認知機能が低下することが明らかとなった。次に行ったスクロース嗜好試験では、腎不全群で sham 群と比較して有意にスクロース嗜好性が低下した。このことから、腎不全処置により、抑うつ傾向が認められた。

(3) 脳の免疫組織学的解析の結果、神経新生の指標となる海馬歯状回の Ki67 陽性細胞数が慢性腎不全群で有意に低下していた。また、ミクログリアの指標である Iba-1 陽性細胞数が慢性腎

不全群で増加していた。以上の結果から慢性腎不全により脳内でのミクログリアの活性化が神経新生を抑制し、認知機能を低下させたと考えられた。

(4) 次に、代表的な尿毒症物質であるインドキシル硫酸を定量した。血漿中のインドキシル硫酸濃度は、腎不全処置4週後に約4倍に増加していた。腎臓中のインドキシル硫酸量は約50倍に増加していた。しかし、大脳皮質のインドキシル硫酸量は検出限界に近い値であった。以上の結果から、インドキシル硫酸は、脳内に移行しにくいことが明らかとなった。今後、脳内に移行する尿毒症物質のさらなる探索が必要である。

(5) 以上の結果から、慢性腎不全により、脳内でミクログリアが活性化することにより神経新生が抑制され、認知機能の低下や抑うつ症状が現れることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Masanori Katakura   | 4. 巻<br>2019(7)     |
| 2. 論文標題<br>Elucidation of cognitive decline mechanism associated with the progression of chronic renal failure - involvement of neurogenesis inhibition | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Impact  | 6. 最初と最後の頁<br>41-43 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br><a href="https://doi.org/10.21820/23987073.2019.7.41">https://doi.org/10.21820/23987073.2019.7.41</a>                        | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Rina Murata, Haruka Matsuzawa, Masanori Katakura   |
| 2. 発表標題<br>Effects of chronic renal failure on cognitive function and neurogenesis in rats          |
| 3. 学会等名<br>9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) congress (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sae Koizumi, Kenji Sugibayashi, Hisami Koito, Masanori Katakura |
| 2. 発表標題<br>ラット網膜に対する慢性腎不全の影響   |
| 3. 学会等名<br>第41回日日本神経科学大会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡邊 健太、白井 翔哉、小糸 寿美、杉林 堅次、片倉 賢紀           |
| 2. 発表標題<br>脳の発生過程及び神経幹細胞の分化過程での多価不飽和脂肪酸受容体GPR40の役割 |
| 3. 学会等名<br>第27回日日本脂質栄養学会大会                         |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石田杏奈、片倉賢紀、杉林堅次       |
| 2. 発表標題<br>慢性腎不全モデルラットの肝臓に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>2017年度生命科学系学会合同年次大会  |
| 4. 発表年<br>2017年                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>植田瑞美、山崎雅之、並河徹、橋本道男、杉林堅次、紫藤治、片倉賢紀  |
| 2. 発表標題<br>Association of red blood cell n-3 polyunsaturated fatty acids levels and the single nucleotide polymorphisms in fatty acid desaturase and elongase on with the psychological state of Japanese elders |
| 3. 学会等名<br>9th Mind-Body Interface International Symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>植田瑞美、山崎雅之、並河徹、松崎健太郎、住吉愛里、橋本道男、紫藤治、片倉賢紀 |
| 2. 発表標題<br>多価不飽和脂肪酸合成酵素の遺伝子多型と精神疾患との関連            |
| 3. 学会等名<br>日本脂質栄養学会第28回大会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                   |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>渡邊健太、小糸寿美、杉林堅次、片倉賢紀        |
| 2. 発表標題<br>脳の発生発達過程での脂肪酸輸送体FATP発現量の変化 |
| 3. 学会等名<br>日本脂質栄養学会第28回大会             |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡邊 健太、小糸 寿美、杉林 堅次、片倉 賢紀         |
| 2. 発表標題<br>神経幹細胞の分化に対するGPR40とFATPの役割       |
| 3. 学会等名<br>第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会の合同大会 |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>植田瑞美、山崎雅之、並河徹、松崎健太郎、住吉愛里、橋本道男、紫藤治、片倉賢紀 |
| 2. 発表標題<br>精神状態に対する伸長鎖酵素 (ELOVL5) の効果             |
| 3. 学会等名<br>第97回日本生理学大会                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>加藤岳、杉林堅次、片倉賢紀                |
| 2. 発表標題<br>慢性腎不全の進行に伴う血漿中多価不飽和脂肪酸代謝物の変動 |
| 3. 学会等名<br>第97回日本生理学大会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村松弘樹、杉林堅次、片倉賢紀                         |
| 2. 発表標題<br>5/6腎不全ラットの腎機能におけるドコサヘキサエン酸とアラキドン酸摂取の影響 |
| 3. 学会等名<br>第97回日本生理学大会                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>加藤岳、片倉賢紀                                |
| 2. 発表標題<br>慢性腎不全の進行に伴う血漿多価不飽和脂肪酸代謝物量の変動            |
| 3. 学会等名<br>レドックス・ライフィノベーション第170委員会 20周年記念 若手シンポジウム |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 城西大学薬学部薬科学科栄養生理学講座HP<br><a href="https://www.josai.ac.jp/~mkatakur/index.html">https://www.josai.ac.jp/~mkatakur/index.html</a> |
|---|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 紫藤 治<br>(SHIDO OSAMU)<br>(40175386)         | 島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授<br><br>(15201) |    |
| 研究分担者 | 松崎 健太郎<br>(MATSUZAKI KENTARO)<br>(90457185) | 島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師<br><br>(15201) |    |
| 連携研究者 | 杉本 直俊<br>(SUGIMOTO NAOTOSHI)<br>(80272954)  | 金沢大学・医学系・准教授<br><br>(13301)         |    |