

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590968

研究課題名（和文） 腎糸球体血行動態調節機構の性差：腎臓の老化機序を含めた生理的・病態生理的意義

研究課題名（英文） The gender difference in the mechanisms that control glomerular hemodynamics.

研究代表者

有馬秀二 (ARIMA SHUJI)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60323010

研究成果の概要（和文）：

腎疾患の病態・進展に重要な糸球体血行動態調節機構に性差が存在するか否かを検討したが、糸球体血行動態の主な調節因子である輸出入細動脈の血管反応性・血管内皮機能に有意な性差を認める事はなかった。各種性ホルモンの有意な血管作用も認められず、生理的・病態生理的な成果は得られなかった。

本研究では、腎濾過機能の調節に重要な髄質血流の性差を検討する実験系や腎細動脈の血管平滑筋細胞と内皮細胞の培養系確立を目指した実験系に関して、若干ながら進行が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We found neither gender difference in the control mechanisms of glomerular hemodynamics nor in the vascular reactivity of renal arterioles. In addition, at least under our experimental conditions any sexual hormone did not exert significant vascular actions on renal arterioles. .

In the present study, we could not establish but somewhat develop an experimental system to study the possible gender differences in renal medullary blood flow. We also tried to develop a culture system of vascular smooth muscle cells and endothelial cells of renal arterioles to study the detail cellular mechanisms underlying the physiological and/or pathophysiological glomerular hemodynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：輸出入細動脈、性差、血管内皮機能、性ホルモン、

1. 研究開始当初の背景

腎疾患の進展に男女差があることは広く認識されており、多くの腎疾患で男性の腎予後は女性に比して不良である (Neugarten J et al. *J Am Soc Nephrol* 11:319, 2000)。さらに、腎疾患の治療に頻用される ACE 阻害薬や ARB の腎保護効果にも男女差のあることが報告されている (Ruggenenti P et al. *J Am Soc Nephrol* 11:88, 2000 / Miller JA et al. *J Am Soc Nephrol* 17:2554, 2006)。したがって、腎疾患の病態生理・治療を考えるうえで性差は重要な問題である。これまでも腎疾患の病態生理における性差に関して種々の検討がなされてきたが、その多くが性ホルモンの腎臓への影響に特化しており「エストロゲンなどの女性ホルモンが腎疾患の進展を抑制するのに対して、アンドロゲンなどの男性ホルモンが増悪因子として働く」可能性を提唱してきた。しかしながら、(性ホルモンなど外因性の影響を除いた) 腎臓固有の構造・機能そのものに性差が存在するか否かに関する詳細は、少なくとも病態との関与の点ではほとんど不明であった。

また、近年の高齢化社会を迎えるにあたり腎臓の老化が問題となっているが、これにも性差が存在し、ヒトを含めて雄性では顕著に出現しやすいと報告されている (Baylis C. *Experimental Gerontology* 40:271, 2005)。腎臓の加齢性変化としては腎萎縮・糸球体硬化などが特徴的であるが、その一因となる加齢性の細小動脈硬化・閉塞は腎皮質、特に表層部で生じやすく、その結果、萎縮・糸球体硬化も皮質表層部において優先的に生じる (Griffiths GL et al. *Br J Radiol* 49:111, 1976)。一方、傍髄質部では一部の輸入細動脈が閉塞せずに輸出細動脈との短絡路を形成して髄質血流が保たれるため、髄質には加齢性変化が生じにくいと考えられている (Takazakura E et al. *Kidney Int* 2:224, 1972)。しかしながら、加齢性変化の過程において皮質表層部と傍髄質部の輸入細動脈が異なる反応を起こす機序に関しては全く不明であった。

2. 研究の目的

腎疾患の病態・進行には糸球体高血圧および糸球体過剰濾過などの糸球体血行動態異常が重要な役割を演じている。そこで我々は、「糸球体血行動態調節機構には性差が存在し、その結果、雄性では腎疾患の病態下で容

易に糸球体血行動態異常が生じて腎疾患が進行しやすい」という可能性を考えた。本研究はこの可能性を検討することを目的とした。具体的には、我々がこれまでにオスの実験動物を用いて証明してきた糸球体血行動態調節機構の中で、特に重要な機構がメスでも同様に否かを検討し、差異があるならばそれを引き起こす機序および生理的・病態生理的意義についても検討することを目的とした。また、各種性ホルモン (エストロゲン、アンドロゲンやその代謝産物などを含めて) の糸球体血行動態への作用も検討することにした。

また、加齢性変化の過程において皮質表層部と傍髄質部の輸入細動脈が異なる反応を起こす機序を明らかにする目的で、それぞれの部位の輸入細動脈の血管反応性の加齢性変化および性差、その生理的・分子生物学的機序、さらには性ホルモンの影響を詳細に検討することで、血行動態の面から腎臓の老化の性差に関する知見を得ることを目的とした。

糸球体血行動態調節機構の細胞内調節機序を詳細に検討するために分子生物学的実験手法の導入を試みることにした。具体的には、ラットやウサギから輸出入細動脈を単離し、既報 (Chaudhari A et al. *Am J Physiol* 256:F266, 1989 / Dubey RK et al. *Circ Res* 71:1143, 1992) の方法を用いて内皮細胞と血管平滑筋細胞の培養細胞を確立しようと努めている。この培養実験系を確立することで、生理実験で得られた結果に分子生物学的実証を付け加えることや、分子レベルで得られている情報を我々の生理実験系に feedback することが可能となり、分子に基づいた糸球体血行動態調節機構の解析を可能にし、独創的な研究分野を確立したいと考えている。

3. 研究の方法

まず糸球体単離灌流実験が容易なウサギを用いて糸球体血行動態調節機構に性差が存在するか否かを検討することにした (ウサギは性周期がないため細動脈の摘出に関して性ホルモン周期を考慮する必要がないことが利点と考えた)。生殖可能年齢 (1 年齢前後) のメスウサギから輸入・輸出細動脈を単離・灌流し、我々がこれまでに同年齢のオスウサギで得ている糸球体血行動態調節機構と比較し、性差の有無を確認する事にした。

特に、①Ang II に対する感受性がオスと同様に輸入細動脈よりも輸出細動脈で高いのか？②血管内皮由来の NO や PG による血管反応制御機構がオスと同様か？③輸入・輸出細動脈収縮機序における L 型・T 型 Ca チャネルの関与がオスと同様か？④腎血流の自動調節に重要な筋原反応や尿細管糸球体フィードバックやその制御機構がオスと同様なのか？、などに重点をおいて検討することにした。明らかな性差を認めた機構については、病態との関与を明らかにする目的で、疾患モデル（高血圧モデル、腎不全モデルなど）動物を用いて実験を行うことにした。病態生理的に意義があると考えられる性差・加齢性変化が認められた場合には、それらの機序を特異的に抑制または改善する方法を検索することで、腎疾患の治療に有用な研究を行うことにした。特異的な方法を検索できない場合には、tempol などを用いて酸化ストレスを抑制することや性ホルモンの投与により病態に関与する異常が改善するか否かを検討することにした。

腎臓の老化機序における性差に関する検討では、1 年齢前後と 4 年齢以後の雌雄ウサギから皮質表層部と傍髄質部の輸入細動脈を摘出し、血管反応性の加齢性変化・性差を詳細に検討する。特に、血管平滑筋の Ca^{2+} mobilization 機構と内皮機能が皮質表層部と傍髄質部でどのように異なるかに重点をおいて検討する。

腎細動脈の内皮細胞と血管平滑筋細胞の培養方法はすでに報告されているが、いずれもメッシュを用いた sieving 法にて細動脈を単離しており、純度に若干の問題がある（小葉間動脈の混入など）。一方、我々はウサギや種々のモデルラットから輸入・輸出細動脈のみを顕微鏡下に直接単離することが可能であるので、純度に関して問題はない。単離した細動脈を既報の条件を用いて primary culture を行い、正常および各種病態下での血管内皮の細胞内伝達機構の性差・血管平滑筋の細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達機構・ Ca^{2+} チャネルの性差に重点を置いて継代 5 代以内で実験を行うこととした。

4. 研究成果

輸入細動脈と輸出細動脈のいずれにおいても血管反応性・血管内皮機能に有意な性差を認めなかった。この理由として実際に血管反応性に性差が無いためなのか、それとも酸化ストレスなどを含めた血管環境の違いを実験系に取り入れる必要があったのかは不明であり、解明が必要と考えている。各種性ホルモン（エストロゲン、アンドロゲンなど）の糸球体血行動態への作用も検討したが、少なくとも我々の急性期実験系では有意な成

果を得られなかった。メスウサギには性周期が無いため性ホルモンの血管作用を検討するのに細動脈摘出時期を考慮しなかったが、実際には細動脈摘出時期によって性ホルモンへの反応性が変わる可能性があると考えている。

また、この 3 年間では加齢性変化を検討する研究を遂行できなかったが、腎臓の濾過機能調節に重要な髄質血流の性差を検討する目的で、Descending Vasa Recta の単離・灌流実験系の開発を目指して研究を進めてきた。現段階では成功率は十分でないが、少しずつ改良を加えながら実験系の確立を目指して進めている。

糸球体血行動態調節機構の分子生物学的機序を明らかにする目的で、輸出入細動脈の血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の培養系確立を目指しているが、本研究の中では確立するには至らなかったため、今後の継続課題である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Ooshima K, Ozaki S, Tabuch M, Higashino H, Honda E, Park AM, Arima S and Munakata H: Decreased expression of catechol-O-methyltransferase in the renal cortex of malignant spontaneously hypertensive rats. *Tohoku J Exp Med.* 219:331-336, 2009
（査読あり）

② Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, Papaharalambus C, Lassegue B, Griendling KK: Poldip 2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 105:249-259, 2009
（査読あり）

〔学会発表〕（計 2 件）

① 中谷嘉寿、谷山佳弘、高見勝弘、有馬秀二 : Malignant Hypertension モデル mSHR-sp ラットにおける腎での臓器障害と酸化ストレス・小胞体ストレスとの関与、機序の検討。第 33 回日本高血圧学会総会（2010 年 10 月 16 日 福岡）

② 中谷嘉寿、谷山佳弘、岸本和也、嶋津秀紀、金籐秀明、松久宗英、Griendling KK、木下浩二、船内正憲、有馬秀二 : Poldip2 の糖尿病性腎症 (DN) における病態生理学的意義に関する検討。第 53 回日本腎臓学会総会（2010 年 6 月 16 日 神戸）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 秀二 (ARIMA SHUJI)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：60323010

(2) 研究分担者

谷山 佳弘 (TANIYAMA YOSHIHIRO)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：70441079