

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

小田 剛

専攻分野：内科学

コース：腎臓・高血圧内科

指導教授：木村 健二郎

主論文の題目：

高脂肪食および高血糖を負荷した高血圧・高脂血症自然発症ラット腎臓における酸化ストレス消去系酵素の変動

共著者：

白井 小百合、柴垣 有吾、大沼 繁子、小池 淳樹、松本 直樹
木村 健二郎、熊井 俊夫

緒言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) 成因の危険因子として糖尿病、高血圧、メタボリックシンドローム、肥満などが知られている。腎障害のメカニズムとしては、酸化ストレスの亢進による血圧変化、内皮機能異常が示されている。酸化ストレスとは、細胞内で各種の代謝活動の過程で生じる反応性に富んだ活性酸素分子種 (reactive oxygen species : ROS) が細胞の抗酸化作用を超えて障害性に働くことを言う。我々は、メタボリックシンドロームのモデルとして高血圧・高脂血症自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Hyperlipidemic Rats : SHHR) を用い、高脂肪食とスクロース水負荷 (HFDS) により、腎内の酸化ストレス消去系酵素と腎組織障害がどのように変化するかを検討した。

方法

SHHR対照群、SHHR+HFDS群、SD対照群、SD+HFDS群の各群9匹のラットを用いた。対照群には通常食および通常水を与えた。HFDS負荷群には高脂肪食および自由飲水による30%スクロース水の負荷を4ヶ月齢より4ヶ月間行った。ラット体重、腎臓重量、内臓脂肪量、血中dROM、血糖値、および血漿コレステロール値を計測した。また、腎組織から細胞質分画を抽出し蛋白定量をBladford法により行った。定量後、glutathione peroxidase 1 (GPx) 抗体、catalase抗体、superoxide dismutase 1 (SOD1)

抗体、SOD2抗体および α -tubulin抗体を用いてウェスタンブロッティング法を施行した。

4群それぞれの組織標本を作製した。組織固定は、10%中性緩衝ホルマリンで行い、パラフィンに包埋した。薄切切片はhematoxylin eosin (HE)、Periodic acid-Schiff (PAS)、Periodic Acid-Methenamine Silver (PAM)、およびMasson trichrome (Masson)で染色を行った。電子顕微鏡観察のために、腎組織を2%グルタルアルデヒドおよびオスミウム酸で固定し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は透過型電子顕微鏡で観察した。

数値は平均値 \pm SEで表わした。ANOVA法で4群間の分散を確認後、Scheffe法にて各2群間の差を検定した。危険率 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

本研究により以下が明らかとなった。

1) SHHR+HFDS 群の腎臓重量は、SHHR 対照群に比し有意 ($p < 0.01$) に軽かった。SHHR+HFDS 群の内臓脂肪量、血中 dROM は SHHR 対照群に比して有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。

2) SHHR+HFDS 群は SHHR 対照群に比して腎臓 GPx タンパク発現が有意 ($p < 0.05$) に低値であった。

3) 組織学的には、全ての群で動脈中膜の肥厚を認めたが内膜の肥厚は認めなかった。また SHHR+HFDS 群の近位尿細管上皮細胞内に一様に分布するリポフスチン様物質と近位尿細管様像を呈したボーマン嚢上皮が観察された。

考察

SHHR 群では、HFDS 処置により内臓脂肪が増加した結果、体重が増加したと考えられる。原因として血中コレステロール値の上昇が関与している可能性がある。また血中 dROM 濃度の有意上昇から、HFDS 処置が全身的に酸化ストレスを上昇させたと考えられる。

SHHR+HFDS 群では腎重量が減少し、組織学的には一様に分布するリポフスチン様物質と近位尿細管様のボーマン嚢上皮像が観察された。しかし線維化は認められなかった。よって腎重量の減少と組織学的な変化が関係する可能性はあるが、その理由は不明である。

ROS に対する生体内の代表的な消去系酵素として SOD、GPx、および catalase を検討した。SOD1、SOD2 および catalase では有意差は認められなかったが、GPx では SHHR+HFDS 群におけるタンパク発現が有意 ($p < 0.05$) に低下していた。酸化ストレスが細胞質だけでなくミトコンドリア電子伝達系の活性化によっても惹起され、GPx がミトコンドリア由

来のヒドロペルオキシド消去に関わっていることから、SHHR+HFDS 群では腎臓中のミトコンドリアでヒドロペルオキシド消去能が低下した可能性がある。

酸化ストレスに伴うグルタチオン量の減少による腎機能障害の報告があり、近位尿細管上皮細胞における高濃度のグルタチオンの存在とそのリポフスチンの生成への関与の報告がある。よって酸化ストレスの増加によりグルタチオンが消費されてリポフスチン生成が亢進している可能性がある。

結論

CKD の背景にあるメタボリックシンドローム（高血圧、高血糖、脂質代謝異常）のモデルとして SHHR ラットを用いて、腎臓における酸化ストレス消去系の変化を検討した。SHHR に HFDS を負荷することにより、酸化ストレス消去系の 1 つである GPx が低下し、腎近位尿細管上皮細胞内にリポフスチン様物質が見られた。