

# 尿毒症物質による認知機能障害の 病態解明に関する研究

渡邊公雄 中山昌明

福島県立医科大学腎臓高血圧内科

key words : 脳腎連関障害, 認知機能障害, 慢性腎臓病

## 要 旨

今回、我々は慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) における認知機能障害の機序を解明するために、腎毒性物質のアデニンを用いた CKD モデルラットを用いた検討を行った。CKD ラットの半数で海馬の組織障害を認め、さらに詳細な解析により、この機序として酸化ストレス亢進、抗酸化系の障害、レニン-アンジオテンシン-アルドステロンシステム (RAS) 活性化、神経伝達物質の変化が関与しているものと推測された。

## 1 目 的

近年の大規模臨床研究によれば、認知機能障害は CKD 患者の 16~38% で合併することが示されている<sup>1)</sup>。CKD に合併する認知機能障害は服薬や食事療法に対するアドヒアランス、医療スタッフの時間的拘束、入院リスクの上昇、医療費の増加などばかりでなく、患者生命予後に対するリスク因子ともなることが知られるようになった<sup>2)</sup>。この機序は、古典的リスク因子としての加齢、糖尿病、高血圧、脂質異常、心血管疾患、CKD 特有のリスク因子としての尿毒素、腎性貧血、2 次性副甲状腺機能亢進症、血液透析での血行動態の変化などが想定されている<sup>3,4)</sup>。CKD における脳の機能的および構造的障害はこれら様々な因子の連関によりもたらされるものと推測される。しかしながら、こ

の詳細な機序は現時点で明らかにされていない。そこで、今回我々は、腎毒性物質であるアデニンをラットに投与した腎障害モデルラットを用いて、これを明らかにすることを目的とした研究を行った。

## 2 方 法

使用動物は 5 週齢のオス、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。本研究は福島県立医科大学実験動物施設による承認を受けた研究 (承認番号: 27088 号) であり、すべての過程は NIH 実験動物適正使用ガイドラインに則り実施した。まず 29 匹の SD ラットをコントロール群: 14 匹と CKD 群: 15 匹に振り分け、CKD ラットは 0.5% アデニン含有飼料を 3 週間 (5~8 週齢にかけて) 投与することで CKD モデルラットとした。

12~20 週齢にかけて空間記憶および学習の評価としてモーリス水迷路試験を実施した。直径 150 cm、深さ 45 cm の円形のプールに 30 cm まで水を張り、ラットの避難場所となるプラットホームは水面下 3 cm に隠れるように配置した。コンピュータ管理システム (Smart version 3.0, Panlab) を用いて、全ラットの行動パターンを記録・解析した。プレイスナビゲーションテストを 4 セット (Phase 1~4, 各 Phase は 5 回のテスト結果の平均として評価) 実施した後に、プローブテストを行い、各ラットの行動パターン、所要時間、遊泳速度などを空間学習と空間記憶の指標として評価

した。プローブテストではプラットフォームを取り除いた状態でラットを遊泳させ、プラットフォーム領域での滞在時間や移動距離を空間記憶の指標として評価している。

ラットを行動実験終了後の24週齢時点で、sacrificeし、尿検体、血液、腎組織、脳組織の解析を実施した。一般的な検査に加えて、酸化ストレスマーカーとして、尿中8ヒドロキシ2'デオキシグアノシン(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-OHdG)、尿中イソプラスタン(isoprastane; IsoP)、腎および脳スーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase; SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(glutathione peroxidase; GPx)を、また、レニン-アンジオテンシン-アルドステロンシステム(renin-angiotensin-aldosterone system; RAS)の活性化の指標として尿中アンジオテンシノゲン(angiotensinogen; AGT)の解析も併せて実施した。脳組織はヘマトキシリンエオジン(HE)染色により、腎組織はPeriodic acid-Schiff(PAS)染色による評価を行った。

また、コントロール群14匹中の5匹とCKD群15匹中の6匹の脳組織の解析を行っており、CKD群6匹のうち3匹で海馬神経細胞の変性が認められた。海馬障害の有無に関する要因を解析するために、これらCKD群ラット6匹の各種マーカーおよび行動実験結果についても同様に別途解析を行った。

### 3 結果

コントロールおよびCKDの各群の背景として、尿量、尿蛋白量、BUN、血清クレアチニン、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、コレステロール値、で有意な群間差を認めており、CKDによる変化としてこれらは矛盾のないものであった(表1)。特異的マーカーに関しては、CKD群で尿中8-OHdG、尿中IsoP、尿中AGTが高値であり、CKDにおける酸化ストレスの増強やRAS活性化を示唆する所見であった(表2)。組織学的にCKDラット腎では、尿細管間質領域を主体とした2次性の糸球体障害を伴う障害が認められた。行動実験では2群間で学習進度に差は見られなかつ

表1 コントロール群、CKD各群の背景(バイタルサイン、一般検査所見)

パラメータ	コントロール (n=14)	アデニン (n=15)	P値
体重 (g)	584.0 ± 57.9	554.0 ± 31.8	0.234
収縮期血圧 (mmHg)	112.2 ± 20.3	112.6 ± 15.1	0.849
拡張期血圧 (mmHg)	84.4 ± 15.5	77.2 ± 17.5	0.338
尿量 (mL/day)	11.2 ± 2.5	35.9 ± 8.5	<0.001
尿蛋白量 (mg/day)	16.1 ± 10.9	53.3 ± 25.7	<0.001
BUN (mg/dL)	20.9 ± 2.7	55.4 ± 15.5	<0.001
血清クレアチニン (mg/dL)	0.35 ± 0.03	0.68 ± 0.17	<0.001
血清ナトリウム (mEq/L)	143.2 ± 1.8	144.3 ± 1.7	0.077
血清カリウム (mEq/L)	4.3 ± 0.5	5.3 ± 1.9	0.057
血清クロール (mEq/L)	104.7 ± 2.3	108.0 ± 4.3	0.029
ヘモグロビン値 (g/dL)	14.0 ± 0.5	12.5 ± 1.3	<0.001
ヘマトクリット値 (%)	43.9 ± 1.6	39.4 ± 2.9	<0.001
総コレステロール (mg/dL)	71.3 ± 10.9	105.0 ± 21.9	<0.001
トリグリセリド (mg/dL)	76.0 ± 36.8	82.9 ± 36.2	0.505

各所見は平均値±標準偏差で表記。群間比較はMann Whitney U testにより検討した。

表2 酸化ストレス、抗酸化システム、RASに関する特異的マーカーの所見

パラメータ	コントロール (n=14)	アデニン (n=15)	P値
尿中8-OHdG (ng/day)	57.7 ± 15.9	87.6 ± 38.7	0.029
尿中アンジオテンシノゲン (ng/day)	60.6 ± 60.7	117.1 ± 95.1	0.051
尿中イソプラスタン (ng/day)	21.9 ± 4.4	61.2 ± 13.9	<0.001
腎SOD (units SOD/mg)	49.0 ± 25.3	61.3 ± 19.3	0.134
脳SOD (units SOD/mg)	56.6 ± 19.8	55.2 ± 26.5	0.601
腎GPx (mU/mg)	83.4 ± 42.9	75.8 ± 20.1	0.880
脳GPx (mU/mg)	99.7 ± 27.6	99.7 ± 26.9	0.897

各所見は平均値±標準偏差で表記。群間比較はMann Whitney U testにより検討した。

RAS: renin-angiotensin-aldosterone system, SOD: superoxide dismutase, GPx: glutathione peroxidase.

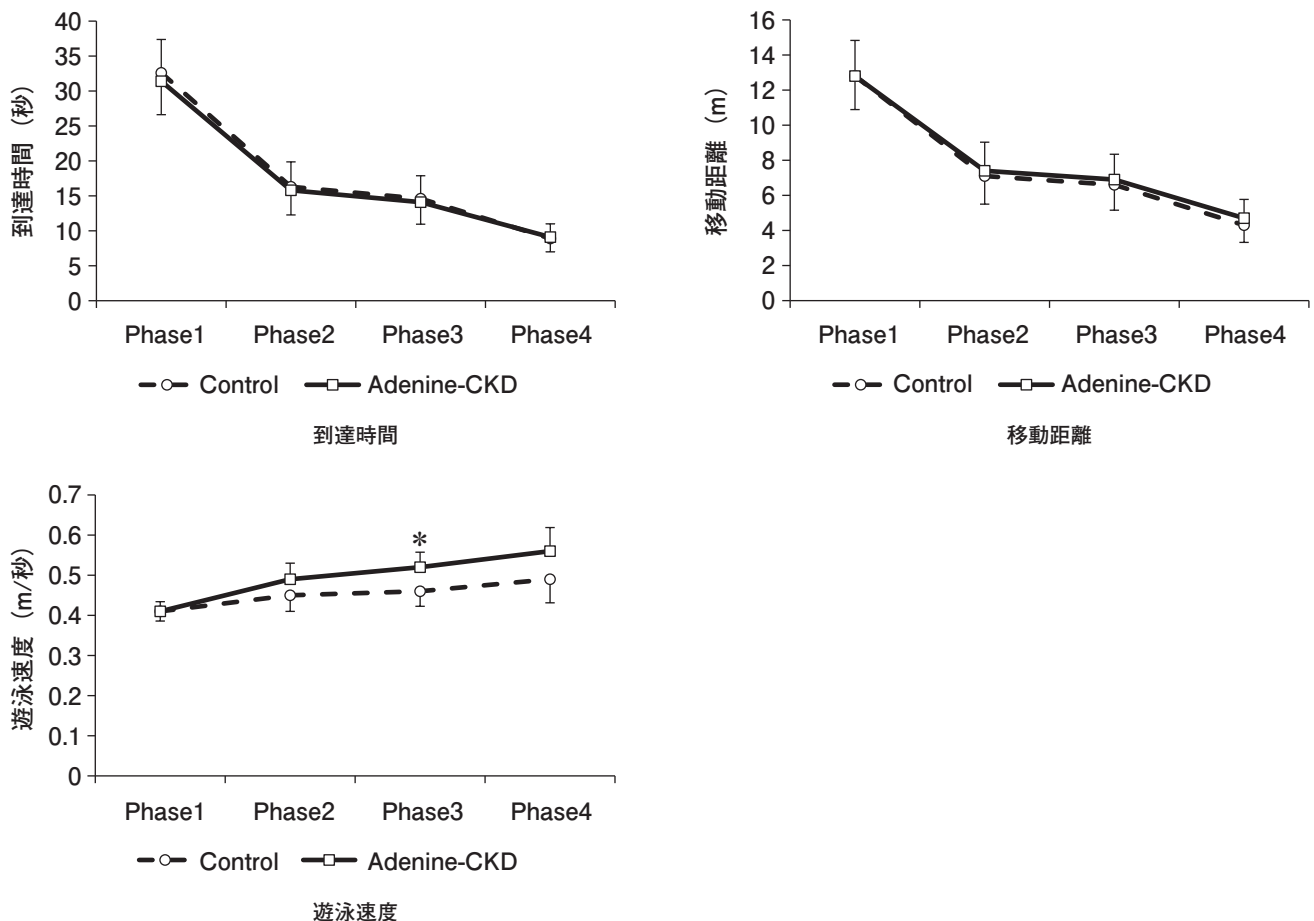


図1 行動実験の結果 (モリス水迷路試験) : コントロール群とCKD群の比較

プレイスナビゲーションテスト: 2群間で学習進度に明らかな差は認められなかった。遊泳速度はCKD群で速い傾向であった。プローブテストではプラットフォームを含む領域での滞在時間と移動距離に2群間で明らかな差を認めなかった。各データは平均値±標準誤差で表記した。\*  $p < 0.05$ 。

たが、CKD群では遊泳速度が速い傾向であった(図1)。また、脳組織を解析したCKDラット6匹のうち3匹で海馬神経細胞の変性所見が認められた(図2)。この変化はコントロール群では見られなかった。さらに、脳組織障害を伴うCKDラットでは、血圧高値、脈圧高値、尿中8-OHdGおよびAGTの高い傾向、腎SODおよびGPxの低い傾向などが認められ、さらにこれらのラットでは行動実験の成績も不良の傾向であった(表3, 4, 図3)。

#### 4 考察

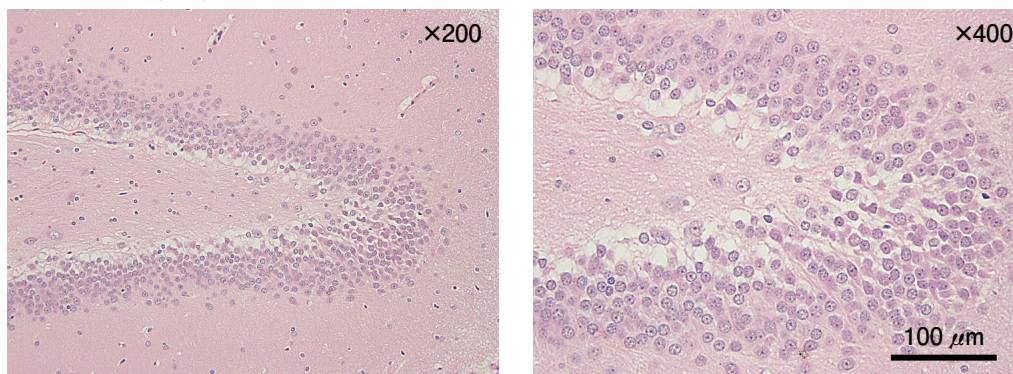
本研究では、全体として行動実験における学習進度にコントロール群とCKD群で有意な差を認めなかった。しかし、海馬神経細胞の障害がみられたCKDラットでは行動実験の成績が不良であるとともに、遊泳速度が速いこと、酸化ストレス亢進、抗酸化システムの障害、RAS活性化などの所見が得られた。

まず、海馬障害CKDラットの活動性亢進に関しては、脳内の神経伝達物質の関与が推測された。抑制性の神経伝達物質であるγアミノ酪酸(gamma-aminobutyric acid; GABA)やノルエピネフリン、さらには学習と記憶に関連するとされるアセチルコリンは、腎不全でその脳内含量が3割程度減少することが知られている<sup>5)</sup>。本研究における海馬障害CKDラットの活動性亢進は、これら神経伝達物質の関与が考慮された。また、高血圧症はCKDにおける認知症発症の古典的リスク因子のひとつであるが、本研究の海馬障害CKDラットでも血圧および脈圧の上昇とRAS活性化を示唆する尿中AGTの上昇が確認された。

臨床研究と動物実験において、RAS遮断薬が脳梗塞の再発や認知症発症に対して予防的効果を認めることが報告されており<sup>6,7)</sup>、逆説的ではあるが、CKDにおけるRAS活性化が認知機能障害へ影響する機序が一部存在する可能性が本研究結果より示唆された。さら



コントロール (0/5)



CKD (3/6)

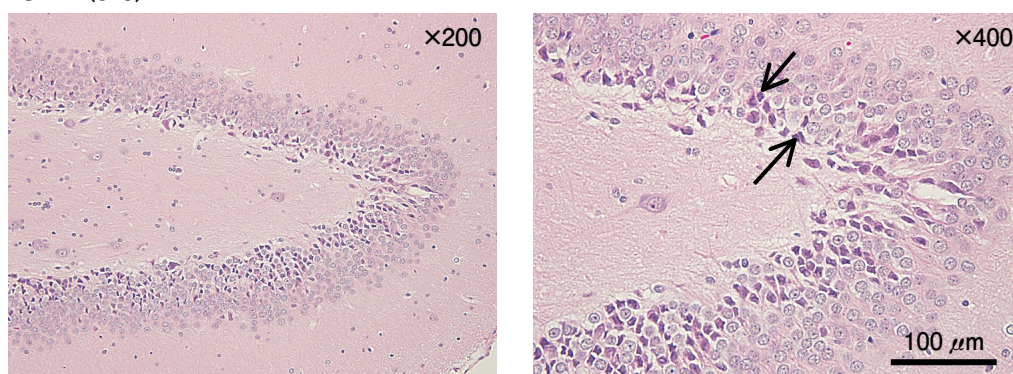


図2 脳組織：海馬領域の解析 (HE 染色)

海馬神経細胞の核濃縮の所見は、CKD ラット 6 匹中 3 匹に認められ (図, 下段), この変化はコントロール群ラット (図, 上段) では認めなかった。

表3 海馬障害 (神経細胞の核濃縮所見) の有無によるパラメータの比較 (バイタルサイン, 一般検査所見)

パラメータ	海馬障害 (+) (n=3)	海馬障害 (-) (n=3)
体重 (g)	558 ± 24.7	525 ± 35.3
収縮期血圧 (mmHg)	109.3 ± 3.2	98.0 ± 24.0
拡張期血圧 (mmHg)	60.3 ± 6.7	68.3 ± 24.4
脈圧 (mmHg)	49.0 ± 9.9	29.8 ± 0.4
尿蛋白量 (mg/day)	50.3 ± 13.8	37.2 ± 0.3
BUN (mg/dL)	62.1 ± 13.6	62.2 ± 13.3
血清クレアチニン (mg/dL)	0.64 ± 0.08	0.76 ± 0.26
血清ナトリウム (mEq/L)	144 ± 1.4	145 ± 1.4
血清カリウム (mEq/L)	5.0 ± 0.3	4.5 ± 0.1
血清クロール (mEq/L)	111 ± 9.2	109 ± 5.7
ヘモグロビン値 (g/dL)	12.7 ± 0.1	12.3 ± 1.7
ヘマトクリット値 (%)	40.5 ± 2.7	38.6 ± 2.2

各所見は平均値 ± 標準偏差で表記。

表4 海馬障害 (神経細胞の核濃縮所見) の有無による特異的パラメータの比較

パラメータ	海馬障害 (+) (n=3)	海馬障害 (-) (n=3)
尿中 8-OHdG (ng/day)	99.5 ± 18.6	83.1 ± 38.7
尿中アンジオテンシノゲン (ng/day)	125 ± 104	74.6 ± 35.8
尿中イソプラスタン (ng/day)	60.3 ± 14.9	63.2 ± 18.4
腎 SOD (units SOD/mg)	30.6 ± 25.4	67.3 ± 14.6
腎 GPx (mU/mg)	42.3 ± 10.3	73.4 ± 5.6

各所見は平均値 ± 標準偏差で表記。

SOD : superoxide dismutase, GPx : glutathione peroxidase.

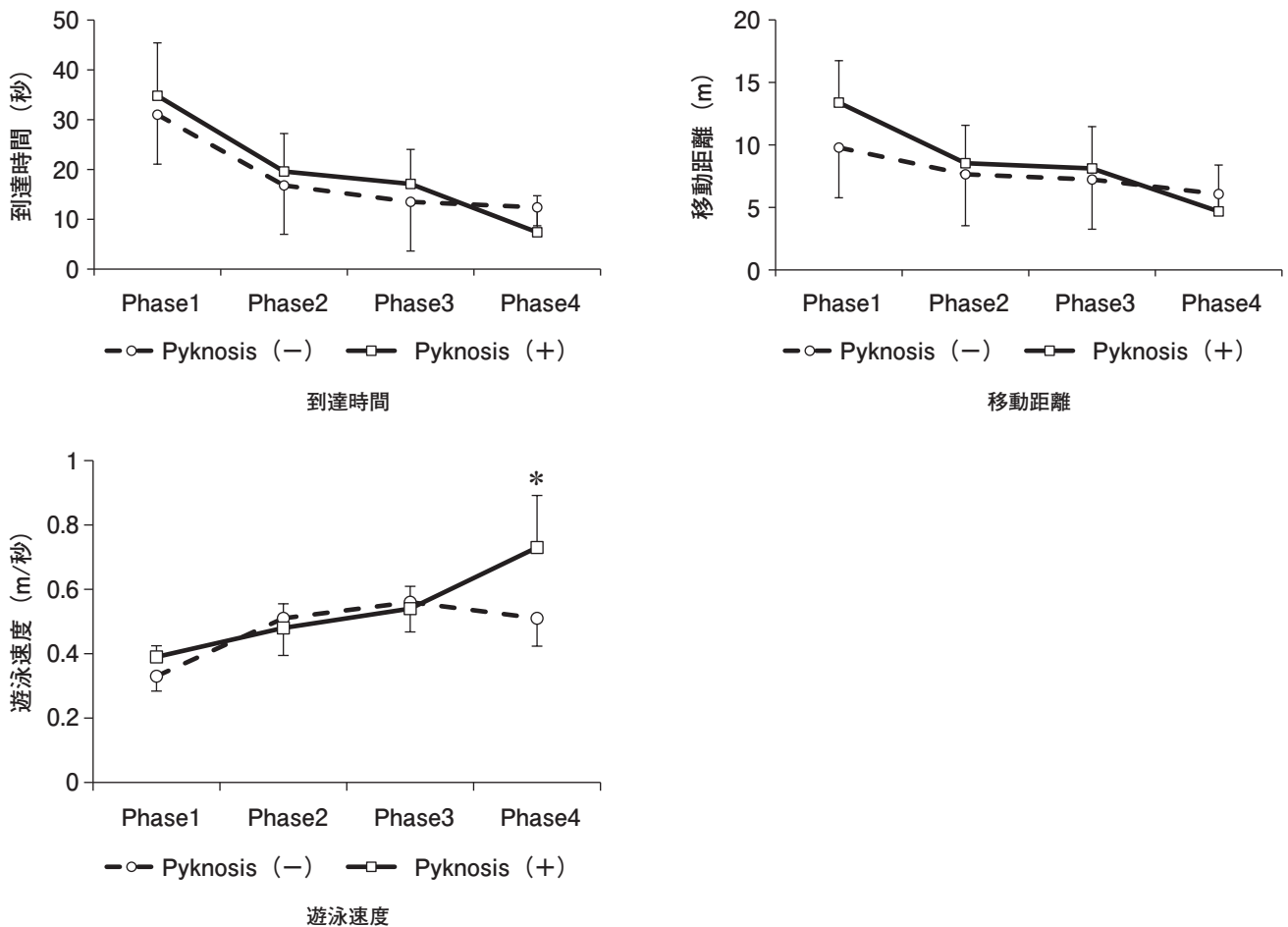


図3 行動実験の結果 (モリス水迷路試験) : 海馬障害の有無での比較

プレイスナビゲーションテスト: 海馬障害ありの群ではなしの群と比較して学習過程で成績が不良の傾向 (Phase 1~3) であった。また、遊泳速度は海馬障害ありの群で速い傾向であった (Phase 4)。\*  $p < 0.05$ 。

に、酸化ストレス亢進が5/6腎摘CKDモデルマウスの検討で認知機能障害に寄与することが報告されているが<sup>8)</sup>、本研究結果は酸化ストレスの亢進だけではなく、抗酸化システムの障害も同様にCKDにおける認知機能障害に寄与する可能性を示している。これらの結果に関しては各々の機序に関するさらなる詳細な検討が必要であると考えられた。

最後に本研究におけるリミテーションを示す。まず、アデニン投与CKDモデルラットは、全体としてはコントロール群と認知機能テストにおける学習進度に差が見られなかった点、そして、全例で脳組織の解析が行われていない点があげられる。認知機能障害はCKDの約30%程度でみられ、その重症度は年齢と腎機能に依存することが知られている。

我々のプレリミナリーの研究において、アデニンを5週間にわたり投与したところ、腎機能障害のレベルは本研究におけるものよりも有意に高いものであった

(平均BUN 228.5 mg/dL, 平均血清クレアチニン 2.96 mg/dL)。しかし、このモデルにおいては尿毒症や高度の腎性貧血などの腎不全に関連する諸症状のために動物自体の衰弱、消耗が著しく、行動実験を完遂することが困難であった。CKDにおける認知機能障害は、神経変性型と血管障害型の組み合わせによるものと考えられ、また、糖尿病の合併や尿毒症物質は重要なリスク因子と考えられている。これらを踏まえると、本研究に用いたモデルに脳虚血再灌流処置を加えたり、糖尿病合併モデルを用いたり、尿毒症物質を追加投与することなどにより、認知機能障害を同定することができるようになるのかもしれない。

本研究にはいくつかのリミテーションがあるが、海馬組織障害を伴う認知機能障害に関与すると推測される因子として、酸化ストレス亢進、抗酸化システム障害、RAS活性化、神経伝達物質の変化など重要なファクターを示すことができた。これらの所見は今後の

本分野の研究を進めるにあたっての基礎的な重要な知見となると考えられた。

## 5 結 論

CKD における認知機能障害の機序として、酸化ストレス亢進、抗酸化システム障害、RAS 活性化、神経伝達物質の変化が想定された。脳腎関連障害の機序を明らかにするために、これらの各要因に関する詳細な検討が今後必要であると考えられた。

平成 25 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として投稿中のため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

## 文 献

- 1) McQuillan R, Jassal SV : Neuropsychiatric complications of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6 : 471-479.
- 2) Khatri M, Nickolas T, Moon YP, et al. : CKD associates with

- cognitive decline. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20 : 2427-2432.
- 3) Lu R, Kiernan MC, Murray A, et al. : Kidney-brain crosstalk in the acute and chronic setting. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11 : 707-719.
- 4) Watanabe K, Watanabe T, Nakayama M : Cerebro-renal interactions : impact of uremic toxins on cognitive function. *Neurotoxicology* 2014; 44 : 184-193.
- 5) Sweeney VP, Perry TL, Price JD, et al. : Brain gamma-aminobutyric acid deficiency in dialysis encephalopathy. *Neurology* 1985; 35 : 180-184.
- 6) Li JM, Mogi M, Iwanami J, et al. : Temporary pretreatment with the angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, prevents ischemic brain damage through an increase in capillary density. *Stroke* 2008; 39 : 2029-2036.
- 7) Iwanami J, Mogi M, Li JM, et al. : Deletion of angiotensin II type 2 receptor attenuates protective effects of bone marrow stromal cell treatment on ischemia-reperfusion brain injury in mice. *Stroke* 2008; 39 : 2554-2559.
- 8) Fujisaki K, Tsuruya K, Yamato M, et al. : Cerebral oxidative stress induces spatial working memory dysfunction in uremic mice : neuroprotective effect of tempol. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29 : 529-538.