

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15465

研究課題名(和文) D-アミノ酸による蛋白恒常性破綻(小胞体ストレス)の腎臓病における病因論の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of D-amino acid on proteostasis in the kidney

研究代表者

稲城 玲子(Reiko, Inagi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50232509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はCKD患者の尿中・血中D-アミノ酸を測定する中、腎機能低下に伴うD-セリンの体内蓄積を見だし、本研究ではヒト近位尿細管上皮細胞に対するD-セリンの病態生理学的活性を検討した。D-セリン刺激尿細管細胞はL-セリンに比し、細胞死亢進や細胞周期停止を呈した。重要なことにD-セリンは尿細管の細胞老化マーカーやSASP、特に炎症系サイトカイン産生を上昇させた。その分子機序として、尿細管細胞内D-/L-セリン比率の上昇がアミノ酸枯渇シグナル誘導性細胞死(GCN2-ATF4-CHOP経路の活性化)を惹起した。以上、D-セリンはアミノ酸代謝系を破綻させて尿細管老化を促す新規尿毒症物質と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that D-serine markedly induced cellular senescence and apoptosis in a human proximal tubular cell line, HK-2, and primary culture of human renal tubular cells. The former was accompanied by G2/M cell cycle arrest and senescence-associated secretory phenotype (SASP), including pro-fibrotic and pro-inflammatory factors, contributing to tubulointerstitial fibrosis. Integrated stress response mediated by GCN2 (GCN2-ATF4-CHOP pathway) played a central role in D-serine-induced cell toxicity and pro-fibrotic phenotypes, accelerating CKD progression and kidney aging. D-serine upregulated the L-serine synthesis pathway and L-serine administration ameliorated D-serine-induced tubular cell arrest, indicating that D-/L-serine ratio is important in tubular homeostasis. In conclusion, this study unveils molecular mechanisms underlying D-serine-induced tubular damage and pro-fibrotic phenotypes, suggesting that D-serine is a uremic toxin involved in CKD pathogenesis.

研究分野：分子腎臓学

キーワード：D-アミノ酸 D-セリン 尿細管上皮細胞 尿細管老化 SASP アポトーシス 細胞周期停止 慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 生体内 D-アミノ酸の病態生理活性

近年の定量分析法の革新的進歩によってアミノ酸キラル体を分けて測定できるようになり、生体内には L-アミノ酸だけでなく D-アミノ酸も存在し、局所によって D-/L-アミノ酸の比率が大きく異なることから、D-アミノ酸が何らかの生理学的意義を有することがわかってきた。それに伴ってアミノ酸ラセマーゼや D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) など生体内で D-アミノ酸の産生、代謝に関与する酵素群の病態生理学的意義も新しい研究領域として注目されている。しかし腎臓におけるそれらの役割はまったく解明されていないが、DAO を最も発現している臓器が腎臓であることから、D-アミノ酸を介して DAO が腎臓の病態生理に関与をしている可能性が推測される。

### (2) 蛋白質恒常性と D-アミノ酸の関連性

蛋白の合成・折りたたみを司る小胞体は蛋白質恒常性維持に重要な小器官である。我々はこれまでに腎臓病の発症・進展に“小胞体ストレス(小胞体機能低下)”が深く関与すること、それがストレス応答経路(UPR 経路)の破綻、ひいては“蛋白質恒常性破綻”を招くこと、それが腎臓病の新たな創薬標的となる可能性などを報告してきた。(Review: Inagi, Nat Rev Nephrol 2014 & 2010, Inagi, Curr Opin Pharmacol 2010) しかし、D-アミノ酸が蛋白恒常性にいかなる影響を及ぼすかは明らかでない。もし D-アミノ酸が正常な機能を有する蛋白の産生を妨げるなら小胞体ストレスも原因となり、“小胞体ストレス応答経路(unfolded protein response, UPR)”を活性化、あるいは破綻させ、腎臓病の形成・進展を加速させる可能性が推測される。

## 2. 研究の目的

本研究の達成目標は、「D-アミノ酸は小胞体ストレスを誘導し、蛋白質恒常性の破綻を介して腎機能障害を起こし、腎臓病発症・進展の原因となる」という仮説を立て、D-アミノ酸、及び DAO の腎臓における病態生理学的活性を解明することにある。申請者はこれまでに、様々な腎疾患モデルの腎臓における小胞体ストレスの病態生理学的関与を明らかにし、それら成果の革新性や独創性は高く評価されて引用されてきた。それらを基盤として D-アミノ酸に関する研究をすることで、小胞体ストレスと D-アミノ酸の領域に新しい理解と腎臓病との因果関係の解明が見込まれる。さらに本研究の成果はこれまでと異なる視点から腎臓病の新たな病因論を確立するもので、それに基づく新たな創薬の研究基盤整備にも貢献することが期待される。その医学的、社会的意義は大きく、腎臓病学に多大な貢献が見込まれ、世界レベルの社会問題である“腎臓病撲滅”の糸口となることが期待される。

## 3. 研究の方法

これまでに申請者は、腎臓病における小胞体ストレスとそのストレス応答経路(UPR 経路)の病態生理活性を明らかにしてきた。本研究では一連の研究で蓄積してきた知識、独創的研究材料や手法を駆使し、D-アミノ酸によるストレス応答反応誘導・破綻の分子機序、D-アミノ酸代謝酵素や UPR 関連分子遺伝子改変マウスを用いた独創的 in vivo 研究を遂行する。それによって作業仮説「D-アミノ酸は小胞体ストレスを誘導し、蛋白質恒常性の破綻を介して腎機能障害を起こし、腎臓病発症・進展の原因となる」の検証により、D-アミノ酸の病態生理活性を解明する。

具体的に、以下の項目を検討する。

### (1) ストレス負荷腎臓細胞における D-アミノ酸プロファイル変動と D-アミノ酸の病態生理学的意義の解明 (in vitro study)

培養系球体足細胞や尿細管上皮細胞に小胞体ストレスを伴う障害(低酸素、酸化ストレス、飽和脂肪酸負荷)を与え、上清と細胞内の D-/L-アミノ酸プロファイルの変動をみる。

### (2) 腎障害モデル動物における DAO と D-アミノ酸の病態生理学的活性 (in vivo study)

小胞体ストレスを伴う腎疾患モデル動物を用いて、小胞体ストレスレベル(UPR 経路分子の発現変動)や腎障害表現型(病理所見、尿・血清生化学)が、尿細管細胞の DAO 活性レベルにいかなる変化を与えるかを検討する。小胞体ストレスと DAO の関連性が腎臓組織の D-/L-アミノ酸プロファイル変動といかなる相関を示すかも検討する。

## 4. 研究成果

我々はこれまでに CKD 患者における尿中・血中 D-アミノ酸測定を進める中、疾患に伴う D-セリンの体内蓄積を見いだした。D-セリンは CKD 増悪因子の可能性が報告されており、また尿細管老化は CKD 進行に重要とされている。そこで本研究ではヒト近位尿細管上皮細胞の株化細胞 HK-2 や初代培養細胞 NHREC に対する D-セリンの病態生理学的活性を目的とした。

我々は初年度に、D-セリン刺激(5-20mM, 48hr) 近位尿細管細胞は L-セリン刺激に比し、有意に細胞死の亢進(Annexin V 陽性、bax, bcl-2 発現変動)や細胞周期の停止(G2/M 期)などを呈することを明らかにした。さらに重要なことに、D-セリンによる一連の細胞障害は細胞老化(p21, p16, SA-β-Gal の亢進)それに伴う Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP, 特に炎症系サイトカイン IL-6, IL-8)の発現も上昇させることを明らかにしてきた。

これらの成果から、D-セリンが近位尿細管細胞老化を加速させ、尿細管障害を誘導することが示された。そこで次年度はその分子機序を解析し、D-セリンは近位尿細管細胞の A

ミノ酸枯渇シグナル誘導性細胞死 (GCN2-ATF4-CHOP 経路) を介して細胞の恒常性を破綻させることを見いだした。事実、GCN2 や CHOP の siRNA による遺伝子発現低下で D-セリンによる尿細管細胞毒性が軽減された。さらに D-セリンによる尿細管細胞毒性は L-セリン添加で軽減され、その現象が他の L-アミノ酸添加ではみられないことから、尿細管細胞内 D-/L-セリン比率がアミノ酸代謝経路を変動させ、アミノ酸枯渇シグナル誘導性細胞死に關与する可能性を明らかにした。さらに興味深いことに、D-セリン添加尿細管細胞ではセリン合成経路活性化が認められ、D-/L-セリン比率の恒常性維持のためにセリン合成経路が活性化すると考えられ、セリン代謝系の細胞機能維持における重要性が示唆された。

以上の研究成果より、D-セリンはアミノ酸代謝系を介して尿細管老化、ひいては尿細管機能障害 (特に細胞増殖・修復機能において) を促す新規尿毒症物質であることが示された。

#### 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 15 件、すべて査読有り)

Ishimoto Y, Inagi R. Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Jul;31(7):1062-9.

Nakatani Y, Inagi R. Epigenetic Regulation Through SIRT1 in Podocytes. *Curr Hypertens Rev*. 2016;12(2):89-94.

Inagi R. RAGE and glyoxalase in kidney disease. *Glycoconj J*. 2016 Aug;33(4):619-26.

Yamaguchi J, Tanaka T, Inagi R. Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy. *Nephron*. 2017;135(3):201-206.

Hirakawa Y, Inagi R. Glycative Stress and Its Defense Machinery Glyoxalase 1 in Renal Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 17;18(1). pii: E174.

Maekawa H, Inagi R. Stress Signal Network between Hypoxia and ER Stress in Chronic Kidney Disease. *Front Physiol*. 2017 Feb 8;8:74.

Tanaka S, Tanaka T, Kawakami T, Takano H, Sugahara M, Saito H, Higashijima Y, Yamaguchi J, Inagi R, Nangaku M. Vascular adhesion protein-1 enhances neutrophil infiltration by generation of hydrogen peroxide in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2017 Jul;92(1):154-164.

Hasegawa S, Jao TM, Inagi R. Dietary Metabolites and Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2017 Apr 4;9(4).

pii: E358.

Hirakawa Y, Jao TM, Inagi R. Pathophysiology and therapeutics of premature ageing in chronic kidney disease, with a focus on glycative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Dec;44(1):70-77.

Nangaku M, Hirakawa Y, Mimura I, Inagi R, Tanaka T. Epigenetic Changes in the Acute Kidney Injury-to-Chronic Kidney Disease Transition. *Nephron*. 2017;137(4):256-259.

Sasaki M, Sasako T, Kubota N, Sakurai Y, Takamoto I, Kubota T, Inagi R, Seki G, Goto M, Ueki K, Nangaku M, Jomori T, Kadowaki T. Dual Regulation of Gluconeogenesis by Insulin and Glucose in the Proximal Tubules of the Kidney. *Diabetes*. 2017 Sep;66(9):2339-2350.

Okada A, Nangaku M, Jao TM, Maekawa H, Ishimono Y, Kawakami T, Inagi R. D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via GCN2 activation. *Sci Rep*. 2017 Sep 11;7(1):11168.

Inagi R, Ishimoto Y, Jao TM. Foreseeing the future of glomerular disease through slits: miR-NPNT axis. *Kidney Int*. 2017 Oct;92(4):782-784.

Ishimoto Y, Inagi R, Yoshihara D, Kugita M, Nagao S, Shimizu A, Takeda N, Wake M, Honda K, Zhou J, Nangaku M. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell Biol*. 2017 Oct 9. pii: MCB.00337-17.

Anusornvongchai T, Nagaku M, Jao TM, Wu CH, Ishimoto Y, Maekawa H, Tanaka T, Shimizu A, Yamamoto M, Suzuki N, Sassa R, Inagi R. Palmitate deranges erythropoietin production via ATF4 activation of unfolded protein response. *Kidney Int*. 2018 "In press"

[学会発表](計 71 件)

(1)海外招待講演 計 10 件

Inagi R. The link between uremic toxins and proteostasis on Gut-Kidney axis. XVIII International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease (ICRNM 2016) in Okinawa, Japan, 2016 Apr 1-23

Inagi R. Role of ER stress on AKI: Organelle stress network between ER and mitochondria. Korean Society of Nephrology Congress (KSN 2016) in Seoul, Korea, 2016 Jun 2-5

Inagi R. Chronic Kidney disease and kidney aging in super aging society. Jongbloed Seminar in Utrecht University in Utrecht, Netherlands, 2016 Sep 1

Inagi R. Renal cellular metabolism and oxidative stress. The 15<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology & the 52<sup>th</sup> Australian and New Zealand Society of Nephrology (APCN/ANSN 2016) in Perth, Australia, 2016 Sep 17-21

Inagi R. Unfolded Protein Response and Epigenetic Change in Kidney Diseases. Kidney Week 2016 in Chicago, USA, 2016 Nov 15-20

Inagi R. Premature aging and chronic kidney disease. NTU-UTOKYO Joint Conference in Taipei, Taiwan, 2016 Nov 30-Dec 1

Inagi R. ATF6 deranges tubular homeostasis via mitochondrial fatty acid metabolism: a role for ATF6-PPAR $\alpha$  axis. Uppsala Kidney Oxygen Meeting in Uppsala, Sweden, 2017 Aug 17-20

Inagi R. Pathophysiological impact of uremic toxin and uremic management in CKD. Annual Congress of Chinese Society of Nephrology 2017 -CME- in Wuhan, China, 2017 Sep 13-16

Inagi R. Proteostasis in ER: A New Mechanism in Kidney Disease. Kidney Week 2017 in New Orleans, USA, 2017 Nov 2-5

Inagi R. Organelle Stress Signal in Chronic Kidney Disease. Renal Grand Rounds in University of Miami in Miami, USA, 2017 Nov 9

(2) 国内招待講演 計 16 件

稲城玲子 . シンポジウム : 腎泌尿器疾患と酸化ストレス 超高齢社会における腎障害と酸化ストレス . 第 16 回抗加齢医学会総会 横浜 2016 年 6 月 10-12 日

稲城玲子 . 小胞体ストレス応答と慢性腎臓病 (CKD) . 第 11 回臨床ストレス応答学会 山口 2016 年 11 月 11-12 日

稲城玲子 . 臓器老化による臓器間ネットワークの破綻を探る - 慢性腎臓病と臓器連関 - . 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

石本遊 , 稲城玲子 . シンポジウム 7 : ミトコンドリア・メディスン . ミトコンドリアと多発性嚢胞腎 . 第 60 回日本腎臓学会学術総会 仙台 2017 年 5 月 26 日-28 日

稲城玲子 . シンポジウム : 尿毒素から紐解く臓器連関と生体恒常性破綻のメカニズム、尿毒素が引き起こす細胞小器官ストレス . ConBio 2017 (日本生化学会、

日本分子生物学会合同総会) 神戸 2017 年 12 月 6-9 日

(3) 国際学会 計 26 件から抜粋

Ishimoto Y, Nangaku M, Nagao S, Yoshihara D, Kugita M, Yoshida Y, Zhou J, Murphy M, Shimizu A, Inagi R . Mitochondrial dysfunction contributes to cyst proliferation of autosomal dominant polycystic kidney disease. The 15<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology & the 52<sup>th</sup> Australian and New Zealand Society of Nephrology (APCN/ANSN 2016) in Perth, Australia, 2016 Sep 17-21 (Young Investigator Award Basic Science, Runner-up 受賞演題)

Okada A, Jao TM, Maekawa H, Ishimoto Y, Nangaku M, Inagi R . D-Serine, a novel emerging uremic toxin candidate, induces cell cycle arrest and apoptosis through up-regulation of ER stress and oxidative stress in proximal tubular cells. Kidney Week 2016 in Chicago, USA, 2016 Nov 15-20  
Okada A, Jao TM, Nangaku M, Inagi R . D-serine accelerates chronic kidney disease progression via increase in tubular senescence associated with oxidative and ER stress. WCN 2017 (International Society of Nephrology Meeting) in Mexico City, Mexico, 2017 Apr 21-25

Okada A, Jao TM, Nangaku M, Inagi R . D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via GCN2 activation. The 3rd International Conference of D-amino acid Research (IDAR2017) in Varese, Italy, 2017 Jul 10-13 (Travel grant 受賞)

Okada A, Jao TM, Maekawa H, Ishimoto Y, Kawakami T, Nangaku M, Inagi R . D-Serine, a Novel Uremic Toxin, Induces Senescence in Human Renal Tubular Cells via GCN2 Activation. Kidney Week 2017 in New Orleans, USA, 2017 Nov 2-5

Okada A, Jao TM, Maekawa H, Ishimoto Y, Mita M, Mangaku M, Inagi R . D-serine induces senescence via GCN2 activation and amino acid metabolic alteration in human renal tubular cells. ISN-Frontiers Meetings 2018 in Tokyo, Japan, 2018 Feb 22-25

Ishimoto Y, Nangaku M, Tanaka S, Okabe S, Inagi R. Pathophysiological impact of elasticity, estimated by atomic force microscopy, on podocyte function. ISN-Frontiers Meetings 2018 in Tokyo, Japan, 2018 Feb 22-25

- (4) 国内学会 口頭発表計 19 件から抜粋  
石本 遊、南学正臣、稲城玲子. ミトコンドリア機能阻害は多発性嚢胞腎の嚢胞形成に關与する. 第 59 回日本腎臓学会総会 横浜 2016 年 6 月 17-19 日  
岡田 啓、Jao Tzu-Ming、南学正臣、稲城玲子. D-セリンは小胞体ストレスと酸化ストレスを介した尿細管老化を促進する. 第 11 回臨床ストレス応答学会山口 2016 年 11 月 11-12 日  
Okada A, Jao TM, Ishimoto Y, Maekawa H, Nangaku M, Inagi R. D-Serine accelerates chronic kidney disease progression via increase in tubular senescence associated with oxidative and ER stress. 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日  
岡田 啓、稲城玲子. D-セリンは小胞体ストレスと酸化ストレスを介した尿細管老化を促進する. Kidney Summit 2016 大阪 2016 年 12 月 17-18 日(若手高得点演題賞受賞)  
岡田 啓、Tzu-Ming Jao、南学正臣、稲城玲子. D-セリンはアミノ酸代謝経路を介して尿細管老化を促進させる新規尿毒素である. 第一回日本 Uremic Toxin 研究会学術集会 東京 2017 年 2 月 18 日  
岡田啓、Tzu-Ming Jao、南学正臣、稲城玲子. D-セリンは、アミノ酸欠乏シグナルを介した尿細管老化を亢進させる新規尿毒素である. 第 54 回日本臨床分子医学会 東京 2017 年 4 月 14-15 日  
Jao TM, Ishimoto Y, Okada A, Maekawa H, Nangaku M, Inagi R. ATF6 deranges tubular homeostasis via mitochondrial fatty acid metabolism: a role for ATF6-PPAR $\alpha$  axis. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 仙台 2017 年 5 月 26-28 日 (Highest Asian Session Oral Award 受賞)  
岡田 啓、Jao Tzu-Ming、南学正臣、稲城玲子. D-セリンは、セリン欠乏シグナルを介した尿細管老化を亢進させる尿毒素である. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 仙台 2017 年 5 月 26-28 日

〔図書〕(計 6 件)

- 城愛理, 稲城玲子. 疾患とメイラード反応. メイラード反応の機構・制御・利用. シーエムシー出版 2016; pp39-47.  
前川洋, 稲城玲子. 酸化ストレスの糖尿病合併症に対する影響 糖尿病性腎症を中心にー. 腎と透析. 東京医学社 2016;81:991-996.  
前川洋, 稲城玲子. 腸内細菌と慢性腎臓病. Medical Practice. 文光堂 2016;33:893-897.

- 正路久美, 稲城玲子. 飽和脂肪酸の生物学. 腎臓内科・泌尿器科. 科学評論社 2016;4:521-528.  
前川洋, 稲城玲子. 小胞体ストレス、UPR 経路は慢性腎臓病の創薬ターゲットである. 尿酸と血糖. 先端医学社 2017;3:175-179.  
岡田啓, 稲城玲子. 腎臓を中心とした小胞体ストレスと臓器間ネットワーク. 最新醫學. 最新医学社 2017;72:752-772.

〔その他〕

- (1) 受賞  
岡田 啓 : Kidney Summit 2016 若手高得点演題賞を受賞  
岡田 啓 : The 3rd International Conference of D-amino acid Research (IDAR2017, Varese, Italy) で Travel grant を受賞  
(2) ホームページ  
東京大学大学院医学系研究科 CKD 病態生理学講座  
<http://www.todai-ckd.com>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
稲城 玲子 (INAGI, Reiko)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 5 0 2 3 2 5 0 9
- (2) 研究分担者  
南学 正臣 (NAGAGU, Masaomi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号 : 9 0 3 1 1 6 2 0
- 田中 哲洋 (TANAKA, Tetsuhiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 9 0 5 0 8 0 7 9
- 川上 貴久 (KAWKAMI, Takahisa)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 1 0 7 2 2 0 9 3
- 加藤 秀樹 (KATO, Hideki)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 9 0 6 2 5 2 3 7
- 吉田 瑤子 (YOSHIDA, Yoko)  
東京大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号 : 9 0 6 4 9 4 4 3
- (3) 研究協力者  
石本 遊 (ISHIMOTO, Yu)  
岡田 啓 (OKADA, Akira)