

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17H04104
研究課題名(和文)腎障害形成・進展における硫酸抱合型尿毒素の役割究明を機軸とする尿毒症抑制薬の探索

研究課題名(英文) Search for uremia suppressive therapeutics based on investigation on role of sulfate-conjugated uremic solutes in development and pregression of kidney injury

研究代表者
齋藤 秀之 (SAITO, HIDEYUKI)
熊本大学・病院・教授

研究者番号：40225727
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：シスプラチン誘発急性腎障害(AKI)における硫酸抱合型尿毒素インドキシル硫酸(IS)の毒性薬理学的役割を解明するために、ISの産生責任酵素である硫酸転移酵素 sulfotransferase (Sult) 1a1を遺伝的に欠損したマウス並びにIS及びシスプラチンで処理したヒト腎近位尿細管上皮細胞HK-2を用いて分子生物学的解析を行った。結果、ISは抗酸化酵素の発現を抑制するとともに、芳香族炭化水素受容体の活性化を介して活性酸素種の産生を亢進させることにより、シスプラチン誘発AKIの病態形成・障害進展に関与していることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、インドキシル硫酸がシスプラチン誘発急性腎障害において活性酸素種の産生を亢進することにより腎組織及び機能障害を惹起することが明らかとなり、インドキシル硫酸が腎臓の病態形成において重要な役割を果たす毒性因子であることを突き止めた。臨床で使用されている吸着活性炭AST-120は服用量が多く服薬アドヒアランスの低い薬剤であるため、ISの産生を抑制する新規機序の治療薬が必要とされている。硫酸転移酵素Sult1a1の欠損マウスを用いた動物試験により、インドキシル硫酸の産生抑制とともに腎障害軽減効果が観察されたことから、Sult1a1が新規治療薬の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acute kidney injury (AKI) induced by cisplatin recognized as a severe side effect in clinical, because the occurrence of AKI lead to decrease in dosage and discontinuation of cisplatin treatment. It is known that various factors such as oxidative stress, apoptosis, and DNA damage are involved in the molecular mechanisms of cisplatin-induced AKI. However, the factor accelerate the progression and deterioration of cisplatin-induced AKI remain undetermined. We previously reported that in cisplatin-induced AKI rat, inhibition of indooxyl sulfate (IS), a typical sulfate-conjugated uremic toxin, presented nephroprotective effect. In order to reveal toxic-pathological role of IS more clearly, we used sult1a1 deficient mice in which IS production was inhibited, and HK-2 cells treated with IS and cisplatin. This study revealed that IS in cisplatin-induced AKI by increased reactive oxygen species production via aryl hydrocarbon receptor (AhR), and downregulated antioxidant enzymes.

研究分野：腎臓生理学・毒性学

キーワード：尿毒症物質 急性腎障害 硫酸転移酵素 シスプラチン腎症 活性酸素種 治療薬開発

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (Acute Kidney Injury, AKI) は様々な要因により引き起こされる疾患であり、そのうち約 20% は腎毒性物質に起因する。特に、抗がん剤であるシスプラチンにより誘発される AKI は臨床上大きな問題となっている。AKI の発症はシスプラチン治療における重篤な副作用の一つとして知られており、治療を受けた患者の約 30% が AKI を発症すると言われている。AKI は用量制限因子であり、シスプラチンの減量や中止による治療の中断が余儀なくされる場合も少なくない。シスプラチンは血清の約 5 倍の濃度で腎近位尿細管上皮細胞に蓄積し、特異的に傷害を引き起こすことが示唆されている。シスプラチンによる AKI の発症には、DNA 傷害、アポトーシス、酸化ストレス等が関与することが報告されているが、AKI を増悪する因子について詳細は不明である。これまで、シスプラチン誘発 AKI モデルラットを用いた検討から、硫酸抱合型尿毒症物質インドキシル硫酸 (IS) の蓄積を抑制することで腎障害が軽減することが示唆された。IS はトリプトファンを前駆物質として代謝・産生される尿毒症物質であり、肝に高発現するスルフトランスフェラーゼ (Sult) 1a1 が IS 産生の責任酵素であることが判明している。Sult1a1 の阻害剤を虚血性 AKI モデルラットに投与した検討結果において、IS の産生抑制とともに腎障害の軽減効果が観察されたことから、Sult1a1 が IS 産生抑制に基づく新たな腎障害治療標的として有用である可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

シスプラチン誘発 AKI における IS の毒性薬理的役割について分子・細胞生物学的機序を究明することを企図し、Sult1a1 遺伝的欠損マウスを用いて独自に作成したシスプラチン誘発 AKI モデルマウス並びに IS もしくはシスプラチン負荷処理を行ったヒト腎近位尿細管上皮細胞 HK-2 細胞を用いて比較解析・評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

C57/BL 6J 雄性マウスを使用した。6 週齢マウスを購入し、水と飼料は自由摂取の下、温度 22 ± 2 、湿度 50~70%、明期 12 時間、暗期 12 時間サイクル環境下で数日間順化させた後、実験に供した。Sult1a1 欠損マウス胚を購入し、熊本大学生命資源研究・支援センターにて融解、仮親へ移植、ヘテロマウスの復元を行った。その後、交配・繁殖を行いホモマウスを作製した。シスプラチン誘発 AKI モデルマウスは、シスプラチン (25 mg/kg) を腹腔内に投与し作成した。対照群には同量の生理食塩水を投与した。生理食塩水またはシスプラチン投与 72 時間後に麻酔下で解剖を行い、血液及び組織を採取し各種実験に供した。生理食塩水またはシスプラチン投与 72 時間後に採血を行い、遠心後、血清を分離した。得られた血清は測定まで -80 で冷凍保存した。血清中 IS 濃度は、質量分析装置を用いて測定した。生理食塩水またはシスプラチン投与 72 時間後において摘出した腎臓を、10% リン酸緩衝ホルマリン液に 24 時間浸し、その後パラフィン切片を作成した。2 μm の厚みで薄切した切片を Hematoxylin-Eosin (HE) 染色に用いた。腎組織のパラフィンブロックを 4 μm の厚みで薄切した切片を用いた。TUNEL 染色は in situ Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ) を使用した。腎組織からの mRNA の抽出は Trizol を用いたフェノール/クロロフォルム抽出法により行った。cDNA を鋳型とした Real-Time PCR 反応は、SYBR® Premix Dimer Eraser® Perfect Real Time (Takara) を用い、95 5 秒、55 30 秒、72 30 秒の反応を 50 サイクル行った。

(2) 培養細胞実験

ヒト近位尿細管上皮細胞由来 Human Kidney-2 (HK-2) 細胞は ATCC (American Type Culture Collection) より購入した。培地は 10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS) を加えた DMEM/F-12 にて培養を行った。24 well プレート (7.5×10^4 cells/well) に HK-2 細胞を播種し、血清不含 DMEM/F-12 培地で、CO₂ インキュベータ (37 °C, 5% CO₂, 95% air) で 24 時間培養した。その後、培地を血清不含 DMEM/F-12 とシスプラチンの終濃度が 0, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、IS の終濃度が 0, 500 μM となるように薬剤処理を行った。薬剤添加 24 時間後に培地を除去し Cell counting kit-8 (DOJINDO) 25 μL 含む DMEM/F12 を 275 μL /well で添加し、1 時間 CO₂ インキュベータで培養後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定を行った。96 well プレート (1.0×10^4 cells/well) に HK-2 細胞を播種し、血清不含 DMEM/F-12 培地で、CO₂ インキュベータで 24 時間培養した。その後、Lipofectamine RNAi MAX を用いて、siRNA の終濃度が 50 nM になるように導入した。導入後 48 時間 CO₂ インキュベータで培養し、活性酸素種 (ROS) 産生の評価に使用した。

4. 研究成果

(1) シスプラチン AKI の病態形成における IS の分子毒性学的役割の解明

シスプラチン誘発 AKI モデルマウスを作成し、Sult1a1 KO マウスと対照マウスを比較することで、シスプラチン AKI 時の IS の毒性学的役割について精査した。血清中 IS 濃度に及ぼす影響について確認した結果、対照マウスではシスプラチン投与により血清中 IS 濃度が有意に上昇したが、Sult1a1 KO マウスではシスプラチン投与による血清中 IS 濃度上昇は有意に抑制された (Figure 1)。次に腎機能検査値並びに腎組織に及ぼす影響について比較精査した。対照マウスではシスプラチン投与により、腎機能検査値である BUN, SCr いずれもに有意に上昇し (Figure 2a, b)、HE 染色の結果より、円柱形成や尿細管の拡張といった著しい腎組織障害がみられた (Figure 2c)。一方、Sult1a1 KO マウスでは、シスプラチンによる腎機能値の上昇は有意に抑制され、腎組織障害についても抑制されることが判明した。

過去の報告より、シスプラチン AKI の病態形成・障害進展においてアポトーシスが関与することが示唆されたことを踏まえ、次に TUNEL 染色によりアポトーシスを評価した。対照マウスでは、シスプラチン投与により TUNEL 陽性細胞が著しく増加しアポトーシスが亢進していることが確認されたが、Sult1a1 KO マウスではその増加が有意に抑制されていた。

シスプラチン AKI の病態形成に関わる重要な要因として炎症や酸化ストレスの関与も報告されている。そこで、炎症や酸化ストレスに関連する様々な因子について、腎組織中の mRNA 発現量の変動を確認した。IL-6 については、シスプラチン投与により対照マウスで発現上昇傾向がみられ、Sult1a1 KO マウスでは抑制傾向がみられた。

AhR や XO は、いずれのマウスにおいてもシスプラチン投与で発現上昇傾向がみられた。また、酸化ストレス応答性転写因子である Nrf-2 の下流因子として知られているヘムオキシゲナーゼ (HO : heme oxygenase)-1 とキノノオキシドレダクターゼ (NQO : NADPH quinone oxidoreductase)1 の発現もシスプラチン投与により上昇傾向がみられた。一方、NADPH オキシダーゼ (NOX : NADPH oxidase) 4 はいずれのマウスにおいてもシスプラチン処理により発現低下がみられた。また、抗酸化酵素として知られているスーパーオキシドジスムターゼ (SOD : superoxide dismutase)1 や SOD2、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx : glutathione peroxidase) 1 やカタラーゼ (Cat : catalase) は、シスプラチン投与により WT マウスで発現が低下していたが、特に SOD1 と GPx-1 については Sult1a1 KO マウスで発現低下が有意に抑制されていた。

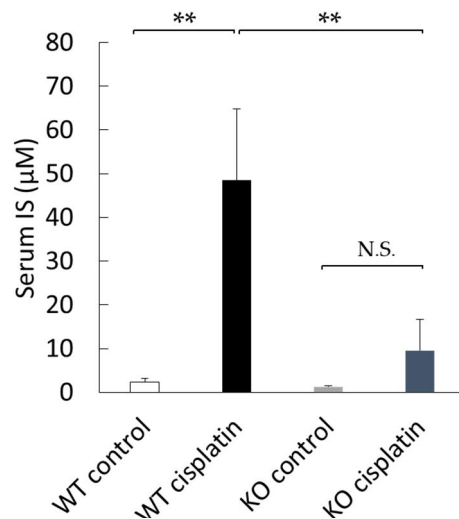


Figure 1. IS concentration in serum of WT and Sult1a1^{-/-} (KO) mice 72h after treatment with saline or cisplatin. Each column represents the mean ± S.D. of 4-8 mice. **p<0.01; N.S.: not significant.

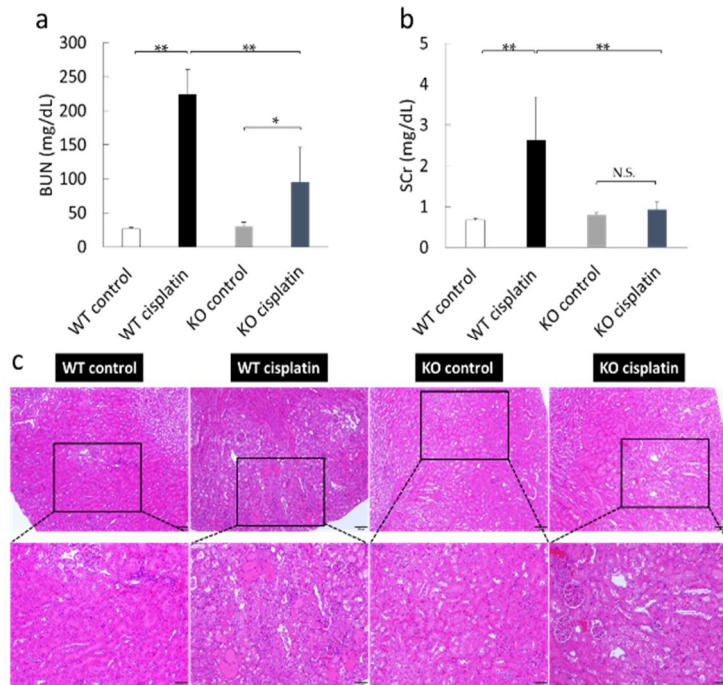


Figure 2. Effect of cisplatin treatment on renal function and damage in WT and Sult1a1^{-/-} (KO) mice. (a, b) Effect of cisplatin treatment on (a) BUN and (b) serum creatinine. Each column represents the mean ± S.D. of 4-8 mice. *p<0.05; **p<0.01; N.S.: not significant. (c) Effect of cisplatin treatment on renal tissue histology (HE staining). Scale bar,

(2) IS 及びシスプラチン処理が HK-2 細胞に及ぼす影響

動物試験の結果より、シスプラチン投与によって AhR の発現は上昇傾向を示し、対照マウスで見られたシスプラチン投与による抗酸化酵素の発現低下は、Sult1a1 KO マウスでは抑制されていた。これまで、抗酸化酵素の発現低下が ROS 蓄積の増加を引き起こすこと、IS は AhR を介して ROS の産生を亢進することが報告されている。従って、シスプラチン AKI においてもこの経路を介して腎障害を増悪している可能性が推量された。そこで、シスプラチン AKI 時の IS の分子毒性的役割をさらに詳細に検討するために、HK-2 細胞を用いて、IS やシスプラチン処理を行った際の影響を評価した。HK-2 細胞において IS やシスプラチン単独または共処理が細胞生存に及ぼす影響について検討した結果、シスプラチン単独処理と比較して、IS とシスプラチンの共処理により、細胞生存率は有意に低下傾向を示した。シスプラチン投与により AhR の発現増加がみられたため、HK-2 細胞においてもその発現を確認した。IS 単独処理により AhR の発現は低下し、シスプラチン単独処理により発現は上昇した。一方 IS とシスプラチンの共処理では、IS 単独処理と比較すると発現低下が抑制された。IS は AhR を介して NOX4 を活性化し、ROS 産生を増加させることで傷害を引き起こすことが示唆されている。また酸化ストレス関連因子の一つである XO は AhR により転写活性化されることも報告されている。そこで HK-2 細胞において、AhR や XO, NOX4 をノックダウンした場合の ROS 産生に及ぼす影響について検討した結果、IS で誘導される ROS の産生は AhR や XO, NOX4 のノックダウンにより抑制された。

以上の結果から、IS は AhR を介した ROS 産生の亢進をもたらすことで、シスプラチン誘発 AKI の病態形成において、毒性分子として寄与していることが示唆された (Figure 3)。Sult1a1 KO により IS の産生が抑制されることにより腎障害が軽減されたことから、IS 産生抑制による腎障害抑制の新たな治療標的として Sult1a1 が有用である可能性が示唆された。

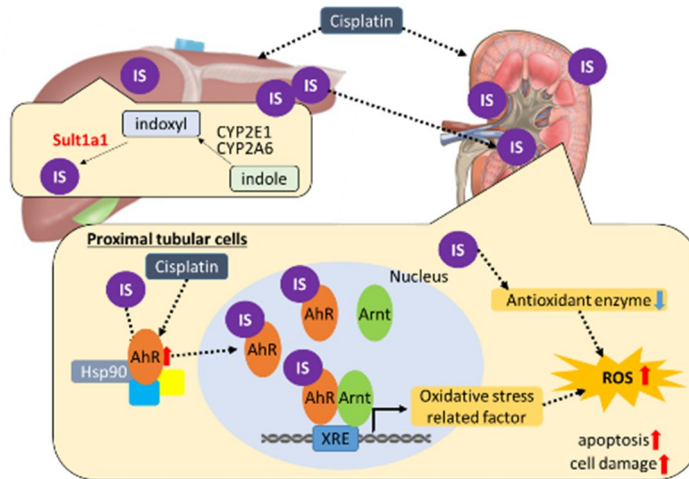


Figure 3. Proposed mechanisms involved in IS-mediated increase in renal ROS production associated with cisplatin-induced AKI.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nozomi Yabuuchi, Huixian Hou, Nao Gunda, Yuki Narita, Hirofumi Jono, Hideyuki Saito	4. 巻 22
2. 論文標題 Suppressed Hepatic Production of Indoxyl Sulfate Attenuates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Sulfotransferase 1a1-Deficient Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1764 ~ 1776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18010011	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Suenaga Naoki, Kuramitsu Mimi, Komure Kanae, Kanemaru Ayumi, Takano Kanako, Ozeki Kazuya, Nishimura Yuka, Yoshida Ryoji, Nakayama Hideki, Shinriki Satoru, Saito Hideyuki, Jono Hirofumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Loss of Tumor Suppressor CYLD Expression Triggers Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5194 ~ 5194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205194	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Narita Y, Hamamura K, Kashiyama M, Utsumi S, Kakizoe Y, Kondo Y, Ishitsuka Y, Jono H, Irie T, Mukoyama M, Saito H, Kadowaki D, Hirata S, Kitamura K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Edoxaban Exerts Antioxidant Effects Through FXa Inhibition and Direct Radical-Scavenging Activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E4140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20174140	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Oda K, Kamohara H, Katanoda T, Hashiguchi Y, Iwamura K, Nosaka K, Jono H, Saito H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Continuous high-dose infusion of doripenem in a pneumonia patient infected by carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharm Health Care Sci.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-019-0144-4	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nakagawa T, Kakizoe Y, Iwata Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Adachi M, Izumi Y, Kuwabara T, Suenaga N, Narita Y, Jono H, Saito H, Kitamura K, Mukoyama M.	4. 巻 315
2. 論文標題 Doxycycline attenuates cisplatin-induced acute kidney injury through pleiotropic effects.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol.	6. 最初と最後の頁 F1347-F1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00648.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Aoki M, Hayashi H, Rao KV, Das D, Higashi-Kuwata N, Bulut H, Aoki-Ogata H, Takamatsu Y, Yedidi RS, Davis DA, Hattori SI, Nishida N, Hasegawa K, Takamune N, Nyalapatla PR, Osswald HL, Jono H, Saito H, Yarchoan R, Misumi S, Ghosh AK, Mitsuya H.	4. 巻 17
2. 論文標題 A novel central nervous system-penetrating protease inhibitor overcomes human immunodeficiency virus 1 resistance with unprecedented aM to pM potency.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.28020	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Endo-Tsukude C, Sasaki JI, Saeki S, Iwamoto N, Inaba M, Ushijima S, Kishi H, Fujii S, Semba H, Kashiwabara K, Tsubata Y, Hayashi M, Kai Y, Saito H, Isobe T, Kohroggi H, Hamada A.	4. 巻 41
2. 論文標題 Population Pharmacokinetics and Adverse Events of Erlotinib in Japanese Patients with Non-small-cell Lung Cancer: Impact of Genetic Polymorphisms in Metabolizing Enzymes and Transporters.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 47 - 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00521	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 鶴木隼平、小山直子、下河優奈、城野博史、齋藤秀之
2. 発表標題 糖尿病 (DM) 併発虚血性急性腎障害 (AKI) ラットの病態進展におけるインドキシル硫酸 (IS) の関与
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下馨介、米田剛、中田悦史、西一彦、城野博史、齋藤秀之
2. 発表標題 血液透析患者における心血管合併症および予後予測因子としてのインドキシル硫酸の有用性検証
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsushita K, Gunda N, Fujino R, Nishigaki A, Hayashi Y, Nishi K, Jono H, Saito H
2. 発表標題 Ischemia-Reperfusion-Induced AKI (IR-AKI) Associated with Renal Fibrosis Is Attenuated Through Suppressing Indoxyl Sulfate Accumulation in Sulfotransferase (Sult) 1a1-Deficient Mice
3. 学会等名 Kidney Week 2019, American Society of Nephrology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Huixian H, Fujino R, Hayashi Y, Unoki J, Matsushita K, Gunda N, Jono H, Saito H
2. 発表標題 Unilateral Ureter Obstruction (UUO)-Induced Renal Fibrosis Is Attenuated by Suppression of Indoxyl Sulfate (IS) Accumulation in Sulfotransferase (Sult)1a1-Deficient Mice
3. 学会等名 Kidney Week 2019, American Society of Nephrology Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hou K, Fujino R, Unoki S; Tanaka H; Matsushita K, Gunda N, Jono H, Saito H
2. 発表標題 Sulfotransferase (Sult) 1a1 plays a toxico- pathological role in cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) through metabolic generation of indoxyl sulfate (IS)
3. 学会等名 World Congress of Nephrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下真美、衛藤萌、米田剛、藤野梨香、城野博史、齋藤秀之
2. 発表標題 低酸素条件下におけるインドキシル硫酸の腎線維化亢進作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田優美、阿部絵理佳、藤野梨香、城野博史、齋藤秀之
2. 発表標題 分子病理学的解析に基づいたアデニン誘発性慢性腎臓病モデル動物の有用性検証
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamashita M, Eto M, Yoneda G, Fujino R, Jono H, Saito H
2. 発表標題 Elucidation of mechanism for indoxyl sulfate (IS)-promoted renal fibrotic response in HK-2 cells under hypoxic condition and mice with ischemia-reperfusion (IR)-induced AKI
3. 学会等名 ・Kidney Week 2017, American Society of Nephrology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujino R, Unoki S, Tanaka H, Matsushita K, Yoneda G, Miyake S, Jono H, Saito H
2. 発表標題 Experimental confirmation of toxico-pharmacological role of sulfate-conjugated uremic solutes in cisplatin nephropathy
3. 学会等名 ・Kidney Week 2017, American Society of Nephrology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 齋藤秀之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 471
3. 書名 腎と透析増刊号・腎と透析ベッドサイド検査事典	

1. 著者名 Hideyuki Saito, Takaaki Abe	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature eBook	5. 総ページ数 180
3. 書名 Uremic Toxins and Organ Failure	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	城野 博史 (Jono Hirofumi) (40515483)	熊本大学・病院・准教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------