

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08204

研究課題名(和文)慢性腎臓病における血清スルファチド異常の臨床的重要性と機序の解明

研究課題名(英文)Clinical significance and mechanism of serum sulfatide abnormalities in chronic kidney disease

研究代表者

上條 祐司(Kamijo, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授

研究者番号：50377636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腎臓病患者における血清スルファチド(sulf)異常の臨床的意義、および血清sulf低下機序を明らかにすることを目的とした。様々なモデル動物の検証の結果、尿毒素の体内蓄積や不飽和脂肪酸欠乏時にはsulf分解酵素群の発現が増加すること(Glycoconj J.2019, FASEB J 2020)、高血圧、脂質異常症、酸化ストレスによりsulf合成酵素の発現が低下すること(Hypertens Res. 2019, Arch Toxicol. 2019)を明らかとした。臨床研究としては、血清sulf値は糸球体の活動性病変と関連することが明らかとなった(J Clin Med. 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、腎臓病に伴うsulf異常の出現機序が明らかとなった。また血清sulf値が新たな腎臓病のバイオマーカーになる可能性が示唆された。血清sulf値異常は、血小板機能、凝固機能、炎症過程などに影響することが知られているため、本研究結果が新たな新規腎臓病治療法開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the clinical significance of serum sulfatide (sulf) abnormalities in patients with kidney disease and to clarify the mechanism of serum sulfide reduction. As a result of verification in various experimental model, the expression of sulf-degrading enzymes increased by the accumulation of uremic toxins, as well as unsaturated fatty acid deficiency (Glycoconj J.2019, FASEB J 2020). We also clarified that hypertension, hyperlipidemia, oxidative stress decreased the expression of sulf-synthase (Hypertens Res. 2019, Arch Toxicol. 2019). Clinical studies demonstrated that serum sulf levels are associated with active glomerular lesions (J Clin Med. 2022).

研究分野：腎臓内科

キーワード：sulfatide 腎臓病 高血圧 脂質代謝 尿毒素 酸化ストレス 糸球体活動性病変 バイオマーカー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

信州大学では様々な動物実験結果から、血清スルファチドは血小板表面膜上スルファチドとP-セレクチンとの相互作用による血小板接着・凝集を阻害する作用を持ち抗血小板作用を持つこと、またフィブリノーゲンやトロンピンへの直接作用により抗凝固作用を発揮すること(Arch Biochem Biophys 2004;426:157-62) さらに、動脈硬化の進展過程にも関連している可能性(J Biochem 1991;109:904-8)を報告してきた。

このような背景をふまえ、信州大学腎臓内科では心臓血管病発症のハイリスク集団である透析患者において血清スルファチド異常の有無や血清スルファチド異常を呈する患者の特徴などについて検討してきた。

その結果、

透析患者では血清スルファチド値が著明に低下すること、
心血管病既往のある透析患者では血清スルファチド値の低下が顕著であること(、 : Glycoconj J. 2007;24:565-71)
血液透析患者の血清スルファチド値低下は透析年数により経時的に低下すること、
血清スルファチド異常は腎機能低下に伴う全身性の酸化ストレスによって誘発されること、
(、 Hemodial Int. 2015;19:429-38)
腎移植により腎機能が改善すると血清スルファチド異常が正常化すること(Clin Exp Nephrol. 2012;16:959-67, Glycoconj J. 2011;28:125-35)などを報告してきた。

また、腎機能障害が血清スルファチド異常をもたらす機序について基礎的検討を重ね、急性腎障害マウスモデルでは酸化ストレス増強に伴いスルファチド合成が低下することで血清スルファチド異常が出現すること(Biochem Biophys Res Commun. 2009;390:1382-8, Nephrology (Carlton). 2009;14:658-62)を見出した。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、我々は慢性腎臓病患者では、様々な慢性腎臓病リスク因子によりスルファチド代謝が変調し、血清中のスルファチド濃度低下が引き起こされ腎臓病の各種病態に関連している可能性を考えた。

本研究では、これらを明らかにすることを目的に一連の研究を行った。

3. 研究の方法

血清スルファチド異常の臨床的意義を明らかにするための臨床研究

信州大学腎臓内科で保存している腎臓病患者の血清サンプルを用い、腎臓病の病態や、その後の臨床的アウトカム(心血管病発症、死亡など)との関連性について統計的に解析した。

血清スルファチド異常の出現機序を明らかにするための基礎研究

慢性腎臓病モデルとして5/6腎摘マウス、高血圧モデルとして持続的Ang 投与マウス、脂質異常症モデルとして高コレステロール食持続的摂取マウス、不飽和脂肪酸欠乏食マウスを用いてスルファチド代謝の変調と表現型の変化について検討した。

各モデルマウスを作成後、経時的に血清サンプル、腎サンプル、肝サンプル(血清スルファチド合成は肝臓で行われる)を採取し、スルファチド合成酵素群、分解酵素群、細胞内転送酵素群の発現変化を蛋白およびmRNAレベルで解析した。蛋白レベルの解析としては、western blot法と免疫組織化学法にて解析した。mRNAの解析としては、real time PCR法を主に用いた。

また、予備実験によりこれらの因子が酸化ストレスの増加と関連している可能性が示唆されていたので、各種酸化ストレスマーカーの発現変化(血清および肝内過酸化脂質含有量、肝内活性酸素消去系酵素群、活性酸素産生酵素群の発現変化)との関連も検討した。

血清スルファチド測定方法

血清サンプルを用いて質量分析器により血清スルファチド含有量の定量(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計MALDI-TOF/MS)を行った。

4. 研究成果

臨床研究としては、

- 1) 血液透析患者において、血清スルファチド低下は心血管病のリスク因子であるか、心血管病を予測するバイオマーカーになりうるか研究をすすめた。

Development cohort として 2004 年～2010 年までに新規に透析導入された心血管病既往のない患者を、心血管病を発症した群と発症していない群に分け、追跡開始時の血清スルファチド濃度を Mann-Whitney U 検定を用いて比較したところ、心血管病発症群で有意に血清スルファチド低下がおきることが判明した。また、ROC 曲線により Cut-off 値を求めた後に、心血管病と死亡の累積発症率についてカプランマイヤー法と Log-rank test により比較したところ、血清スルファチド値低値群で心血管病および死亡の発症率が有意に上昇することを発見した。2023 年 6 月現在、Validation cohort として 2011 年～2014 年に新規透析導入した集団を同 Cut-off 値で 2 群に分け、その後の心血管病と死亡の累積発症率をカプランマイヤー法と Log-rank test により比較検討しており、これらの結果を確認後に論文発表の予定である (unpublished)。

- 2) ANCA 関連腎炎患者において、血清スルファチド値は低下すること、また腎組織所見との関連性について解析したところ、血清スルファチド値は糸球体の破壊所見 (半月体形成) が強い患者で著明に低下することが統計的解析により明らかとなった (J Clin Med. 2022;11:762.)。

2023 年 6 月現在、IgA 血管炎や抗 GBM 病などの血管炎症候群全体を対象とした解析も行っており、やはり抗 GBM 抗体腎炎や活動性の高い IgA 血管炎で同様の所見を認めており、現在論文作成中である。

腎臓病モデル動物におけるスルファチド代謝異常出現機序について様々な結果が得られた。

- 1) 5/6 腎摘マウスではインドキシル硫酸の体内蓄積によりスルファチド分解酵素群の発現が増加し血清スルファチド値が低下すること、またこれらの機序は培養細胞にインドキシル硫酸を添加した際にも同様の代謝異常がおきを確認した (Glycoconj J.2019,36:1-11)。

- 2) 高血圧モデルである持続的 Ang 投与マウスでは、高血圧および酸化ストレスの上昇によりスルファチド合成酵素の発現が低下し血清スルファチド値が低下すること、また降圧薬により高血圧を是正するとこれらの異常が軽減すること、が明らかとなった (Hypertens Res. 2019;42:598-609)。

- 3) 高脂血症モデルである高コレステロール食の持続摂取マウスでは、凝固系因子の増加と内因性抗凝固因子である血清スルファチド値が低下し血栓傾向が高まること、血清スルファチド値の低下はスルファチド合成酵素群の発現が低下することによりもたらされること、そしてこれらの変化は核内転写調節因子であるペルオキシソーム活性化受容体 型 (PPAR) の欠損状態で顕著になることが明らかとなった (Arch Toxicol.2019;93:149-161)。

- 4) 脂質異常モデルとして不飽和脂肪酸欠乏食持続摂取マウスを解析したところ、不飽和脂肪酸欠乏食持続摂取は脳内や腎内のスルファチド分解酵素の発現上昇をもたらすスルファチド異化が高まること、このスルファチド分解酵素の発現上昇には autophagy やライソソーム機能の異常亢進が関連していること、そしてこれらの変化は不飽和脂肪酸の補充により軽減することが明らかとなった (FASEB J 2020;34:9594-9614)。

これらの一連の臨床研究により、血清スルファチドは慢性腎臓病に伴う心血管病や、腎炎活動性を予測するバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。

また、血清スルファチドは、凝固活性、血小板機能、炎症などに関わる multifunctional molecule であるため、血清スルファチド異常の是正が新たな慢性腎臓病治療の 1 つの目標になる可能性がある。

基礎研究では、尿毒素蓄積、高血圧、脂質異常症、不飽和脂肪酸欠乏など、様々な慢性腎臓病リスク因子によって血清スルファチド代謝が変調し血清スルファチド異常が出現することが判明した。また、これらリスク因子の是正が血清スルファチド異常の是正に極めて重要であることが示唆された。

慢性腎臓病における血清スルファチド異常の是正のためには、多角的な慢性腎臓病リスク因子への介入が大変重要であると考えられる。

また、血清スルファチド代謝に影響する薬剤は、新規腎臓病治療につながる可能性が示唆されたため、今後、スルファチド代謝改善薬の開発などさらなる研究の継続が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada Makoto, Nakajima Takero, Yamada Yosuke, Aomura Daiki, Yamaguchi Akinori, Sonoda Kosuke, Tanaka Naoki, Hashimoto Koji, Kamiyo Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum Sulfatide Levels as a Biomarker of Active Glomerular Lesion in Patients with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis: A Single Center Pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 762 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11030762	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 Wang Y, Nakajima T, Diao P, Yamada Y, Nakamura K, Nakayama J, Tanaka N, Aoyama T, Kamiyo Y	4. 巻 34
2. 論文標題 Polyunsaturated fatty acid deficiency affects sulfatides and other sulfated glycans in lysosomes through autophagy-mediated degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J .	6. 最初と最後の頁 9594-9614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000030RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Y, Harada M, Hashimoto K, Guo R, Nakajima T, Kashihara T, Yamada M, Aoyama T, Kamiyo Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Impact of chronic kidney dysfunction on serum Sulfatides and its metabolic pathway in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoconj J.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-018-9850-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Guo R, Hu X, Yamada Y, Harada M, Nakajima T, Kashihara T, Yamada M, Aoyama T, Kamiyo Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of hypertension and antihypertensive treatments on sulfatide levels in serum and its metabolism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 598-609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0160-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lu Y, Harada M, Kamijo Y, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kyogashima M, Gonzalez FJ, Aoyama T.	4. 巻 93
2. 論文標題 Peroxisome proliferator-activated receptor attenuates high-cholesterol diet-induced toxicity and pro-thrombotic effects in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Toxicol.	6. 最初と最後の頁 149-161.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-018-2335-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Y. Kamijo, R. Guo, Y. Yamada, M. Harada, T. Nakajima, K. Hashimoto, T. Kashiwara, Y. Mitsuhiko, T. Aoyama
2. 発表標題 EFFECTS OF HYPERTENSION AND ANTIHYPERTENSIVE TREATMENTS ON SULFATIDE LEVELS IN SERUM AND ITS METABOLISM
3. 学会等名 国際腎臓学会 (WCN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yamada, Y. Kamijo, A. Daiki.
2. 発表標題 DYSFUNCTION ON SERUM SULFATIDES AND ITS METABOLIC PATHWAY IN MICE.
3. 学会等名 国際腎臓学会 (WCN 2019) (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上條祐司、山田洋輔、青村大輝、原田真、園田光佑、山口晃典、橋本幸始
2. 発表標題 内因性抗凝固因子：スルファチド代謝に与える高血圧の影響について
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田洋輔、上條祐司.
2. 発表標題 マウスにおける慢性腎機能障害が血清スルファチドとその代謝経路に与える影響.
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 上條祐司、山田洋輔、山口晃典、園田光佑、山田愛子、藤井一聡、原悠太、増田知恵、藤田識志、小川洋平、橋本幸始、中嶋岳郎、青山俊文
2. 発表標題 PPAR がコレステロール過剰摂取による血管内凝固作用を軽減する
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田洋輔、橋本幸始、上條祐司、中嶋岳郎、青山俊文
2. 発表標題 5/6腎摘慢性腎臓病モデルマウスにおける血清スルファチド低下メカニズムの解明
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kamijo, Daiki Aomura, Shigekazu Kurihara, Takayuki Nimura, Makoto Harada
2. 発表標題 Peroxisome proliferator-actitvated receptor attenuates hypercholesterolemia-induced serum sulfatide abnormalities
3. 学会等名 アメリカ腎臓学会 (ASN Kidney Week 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. YAMADA, Y. Kamijo, A. Daiki.
2. 発表標題 IMPACT OF CHRONIC KIDNEY DYSFUNCTION ON SERUM SULFATIDES AND ITS METABOLIC PATHWAY IN MICE
3. 学会等名 アメリカ腎臓学会 (ASN Kidney Week 2018) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	青山 俊文 (Aoyama Toshifumi) (50231105)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

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
---------	---------