

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03696

研究課題名（和文）腎疾患における酸化ストレス評価法の開発と新規治療戦略および基盤概念の提唱

研究課題名（英文）Development of Evaluation Methods for Oxidative Stress in Renal Disease and Proposal of Novel Therapeutic Strategies and Fundamental Concepts

研究代表者

岩野 正之（Iwano, Masayuki）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：20275324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスは腎疾患の進展に関与することが知られているが、治療薬として臨床応用されている抗酸化薬はない。抗酸化薬の開発には、生体内酸化ストレスを評価する手法が必要である。今回われわれは、独自開発した酸化ストレス・イメージング技術とバイオマーカー技術を用いて、生体内酸化ストレスをリアルタイムに可視化・定量化する手法を確立した。また、われわれが発見した抗酸化物質である分泌型FSP1が尿細管障害を抑制するメカニズムの詳細を明らかにした。さらに、ポドサイトで分泌されたFSP1が尿細管障害を軽減することを生体内で証明することで、ポドサイトー尿細管連関の存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抗酸化薬の臨床応用により末期腎不全患者数を減少させることに直結する。独自開発した酸化ストレス・イメージング技術とバイオマーカー技術を臨床応用することで、抗酸化薬の適応疾患や適応病期の明確化や新たな抗酸化薬の開発が可能となる。さらに、腎疾患のみならず、酸化ストレスが関与する老化、発癌、動脈硬化や糖尿病の進展機序解明や治療法開発にも応用できる可能性もあり、本研究は健康寿命の延伸にもつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： Oxidative stress is known to be involved in the development of renal disease, but there are no antioxidants that have been clinically applied as therapeutic agents. In order to develop antioxidant drugs, a method to evaluate in vivo oxidative stress is necessary. In this study, we established a method to visualize and quantify in vivo oxidative stress in real time using our originally developed oxidative stress imaging technology and biomarker technology. We also clarified the details of the mechanism by which secreted FSP1, an antioxidant we discovered, suppresses tubular damage. Furthermore, we demonstrated in vivo that FSP1 secreted by podocytes reduces tubular damage, thereby clarifying the existence of a podocyte-tubule linkage. This research is directly related to reducing the number of patients with end-stage renal failure through the clinical application of antioxidant drugs.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：酸化ストレス FSP1 チオレドキシン ポドサイト 尿細管障害 PET/MRI

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓病治療における最大の問題点は、慢性腎不全を直す薬物が存在しないということである。そのような状況で唯一、抗酸化薬は腎機能を改善させる可能性がある薬物と考えられているが、現時点では臨床応用されている抗酸化薬はない。抗酸化薬の臨床応用には、酸化ストレスの診断技術開発、新規抗酸化薬の開発、酸化ストレスによる臓器障害のメカニズム探索、の3点を網羅した総合的研究を推進することが求められている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗酸化薬の臨床応用により末期腎不全患者数を減少させることである。目的達成のために、われわれは(1)新規抗酸化薬が尿細管障害を改善するメカニズムの詳細を明らかにし、新たな創薬標的を開拓する、(2)新しい抗酸化薬の有効性を、実用化前段階としてマウスモデルで確認する、(3)生体内酸化ストレス・イメージング法を開発する、(4)酸化ストレス・バイオマーカーを開発する。本研究の遂行により、抗酸化薬の適応疾患や適応病期の明確化、新たな抗酸化薬の開発、新たな創薬標的の開拓という画期的な研究成果が生み出される。さらに、腎疾患のみならず、酸化ストレスが関与する老化、発癌、動脈硬化や糖尿病の進展機序解明や治療法開発にも応用できる可能性もあり、本研究は健康寿命の延伸につながる挑戦的研究である。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規抗酸化薬による尿細管障害改善メカニズムの解明

尿細管上皮細胞株である mProx にリコンビナント FSP1 (20  $\mu$ M) を添加後 12 時間で RNA を抽出し、Thermo Fischer 社製の GeneChip キットを用いて、マイクロアレイ解析を実施した。FSP1 添加後に RNA 発現量が 5 倍以上に増加した遺伝子群の中から Nrf2 活性化に関連する因子を抽出し、リアルタイム PCR 法で発現量を確認した。また、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集で FSP1 の受容体である RAGE の発現をノックアウトした mProx で、上記因子の遺伝子発現量を検討した。

### (2) 腎炎モデルにおける新規抗酸化薬の有効性確認

われわれはすでに、分泌型 FSP1 の腹腔内投与あるいはポドサイトへの FSP1 発現誘導により、シスプラチン腎症による急性腎障害が有意に改善することを明らかにしている。今回、RAGE KO マウスを用いた場合、FSP1 の腹腔内投与あるいはポドサイトへの FSP1 発現誘導による腎保護効果が消失するか否かを検討した。

### (3) 酸化ストレス・イメージング法の開発

$^{64}\text{Cu}$ -ATSM を用いた腎臓 PET/MRI で、腎局所における酸化ストレスの可視化を試みた。様々な CKD stage の腎疾患患者に対して  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM を静注し、PET/MRI スキャナ (GE Signa 社) を用いて腎臓を含め腹部 PET/MRI を撮影した。解析は両腎上極から下極まで複数面の 40 関心領域を設定し、standard uptake value (SUV) の平均値を定量化し、腎機能や蛋白尿を含む臨床的パラメーターとの関連性を検討した。

#### (4) 酸化ストレス・バイオマーカーの開発

44 例の急性腎障害患者を対象に、尿中チオレドキシニン値(TRX)と腎予後の関連を検討した。尿中 TRX は ELISA キット (Redox Biosciences) を用いて測定した。

### 4 . 研究成果

#### (1)新規抗酸化薬による尿細管障害改善メカニズムの解明

マイクロアレイ解析により、FSP1 の添加により発現量が 5 倍以上に増加する 142 因子の中から、Nrf2 活性化に関連する heme oxygenase 1 (HO-1), sequestosome 1 (sqstm 1), solute carrier family 7, member 11 (Slc7a11), cystathionine gamma-lyase (CSE) の 4 因子が同定された (図 1a,b)。さらに、FSP1 を mProx に添加することにより、Nrf2 の核内移動が確認された(図 1c)。 FSP1 自体に加え新たな創薬標的が明らかになった。

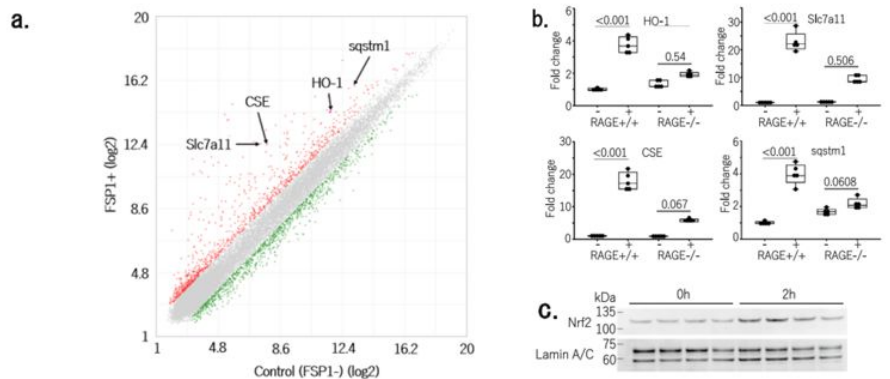


図 1.FSP1 誘導因子による Nrf2 活性化

#### (2) 腎炎モデルにおける新規抗酸化薬の有効性確認

リコンビナント FSP1 の腹腔内投与およびポドサイトにおける FSP1 の過剰発現誘導によりシスプラチン腎症における腎機能障害は改善し、病理学的にも尿細管障害が改善していた。さらに TUNEL 法により観察した細胞死数も抑制されていた。これらの腎障害改善効果は、FSP1 の受容体である RAGE をノックアウトしたマウスにおいては、確認されなかった(図 2a-f)。これらの結果は、ポドサイトから分泌される FSP1 が尿細管上皮細胞保護作用を有することを示しており、ポドサイト-尿細管上皮細胞連関の存在が示唆された。

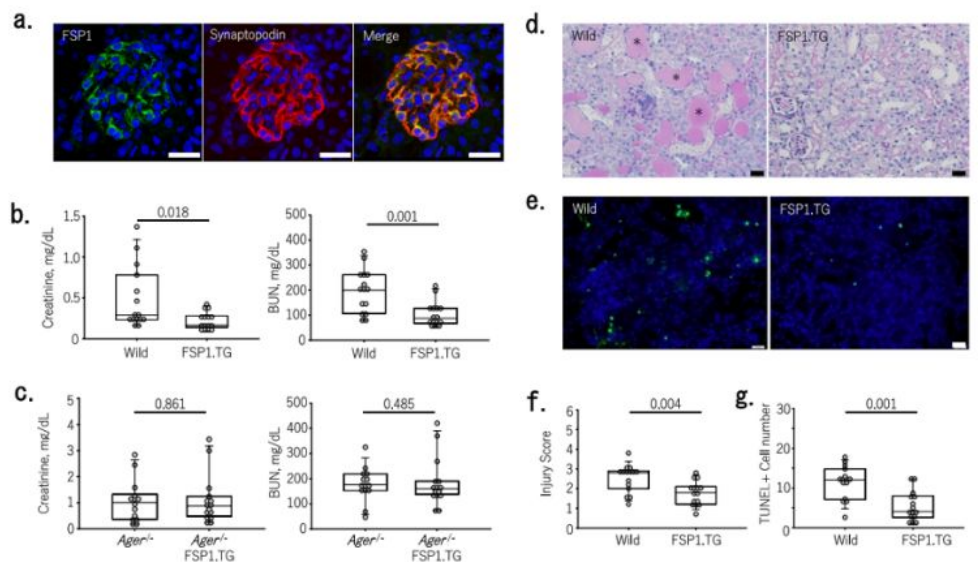


図 2.FSP1 過剰発現による腎障害の改善

### (3) 酸化ストレス・イメージング法の開発

健常者と慢性腎臓病患者 40 例に酸化ストレス・イメージングを実施した。SUV の平均値が eGFR と有意な正相関を認めため、SUV は RI による腎血流で補正を行った。糖尿病性腎臓病患者では健常者と比較し、 $^{64}\text{Cu}$ -AT SM 集積量の増加が認められた (図 3)。血流補正 SUV と蛋白尿 ( $R_s = 0.53$ ,  $P = 0.011$ ) および L-FABP ( $R_s = 0.43$ ,  $P = 0.04$ ) に有意な正相関を認めたが、尿中 8-OHdG とは相関を認めなかった。 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM を用いた PET/MRI で、世界で初めて腎臓の酸化ストレスの可視化に成功した。

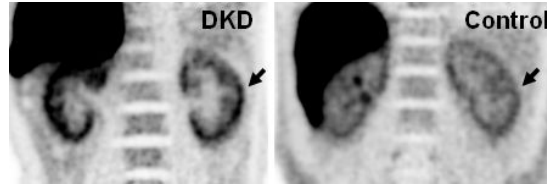


図 3. 酸化ストレス・イメージング

### (4) 酸化ストレス・バイオマーカーの開発

AKI 発症時の尿中 TRX 濃度は、維持透析に移行した患者では、維持透析に移行しなかった患者よりも有意に高かった (図 4)。これらの結果は、AKI 発症時に尿細管細胞で TRX が大量に失われることが、尿細管細胞の再生不全と AKI から CKD への移行、さらには維持透析への移行に関係していることを示している。AKI 後の末期腎不全発症を診断する尿中 TRX 値の診断精度を評価するため、ROC 解析を行った。AUC は 0.7454 (95% 信頼区間、0.5852-0.9056) であり、AKI 発症時の尿中 TRX は、将来的に透析に移行するか否かを予測可能とするバイオマーカーと考えられた。

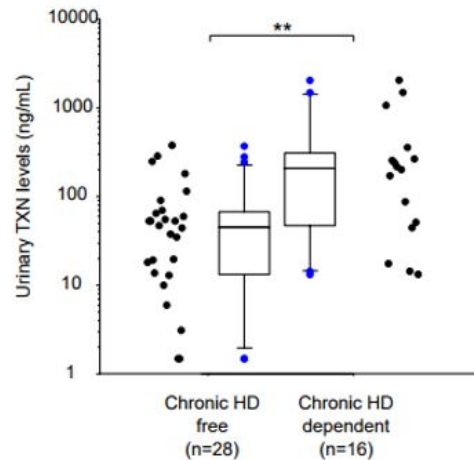


図 4 . 尿中チオレドキシシンと腎予後

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishikawa Y, Takahashi N, Nishikawa S, Shimamoto Y, Nishimori K, Kobayashi M, Kimura H, Tsujikawa T, Kasuno K, Mori T, Kiyono Y, Okazawa H, Iwano M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Feasibility of Renal Blood Flow Measurement Using 64Cu-ATSM PET/MRI: A Quantitative PET and MRI Study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel)	6. 最初と最後の頁 1685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13101685	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 Takahashi N, Yokoi S, Kimura H, Naiki H, Matsusaka T, Yamamoto Y, Nakatani K, Kasuno K, Iwano M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Renoprotective effects of extracellular fibroblast specific protein 1 via nuclear factor erythroid 2-related factor-mediated antioxidant activity.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 22540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-49863-y	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 Kasuno K, Yodoi J, Iwano M.	4. 巻 36
2. 論文標題 Urinary Thioredoxin as a Biomarker of Renal Redox Dysregulation and a Companion Diagnostic to Identify Responders to Redox-Modulating Therapeutics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxid Redox Signal .	6. 最初と最後の頁 1051-1065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2021.0194.	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 -
1. 著者名 Shimamoto Y, Kasuno K, Iwano M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Intrarenal corpuscular multinucleated giant cells in ANCA-associated vasculitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 197-199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02279-w.	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 -

1. 著者名 Nishikawa S, Takahashi N, Nishikawa Y, Yokoi S, Morita S, Shimamoto Y, Sakashita S, Nishimori K, Kobayashi M, Fukushima S, Mikami D, Kimura H, Kasuno K, Naiki H, Iwano M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fanconi syndrome in an elderly patient with membranous nephropathy during treatment with the immunosuppressant mizoribine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CEN Case Rep.	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00715-0.	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 -

1. 著者名 Nakatani K, Asai O, Konishi N, Iwano M	4. 巻 567
2. 論文標題 Role of fibroblast specific protein 1 expression in the progression of adriamycin-induced glomerulosclerosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 148-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.041.	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 -

1. 著者名 Kimura H, Kamiyama K, Imamoto T, Takeda I, Masunaga S, Kobayashi M, Mikami D, Takahashi N, Kasuno K, Sugaya T, Iwano M.	4. 巻 30
2. 論文標題 Fenofibrate reduces cisplatin-induced apoptosis by inhibiting the p53/Puma/Caspase-9 pathway and the MAPK/Caspase-8 pathway rather than by promoting autophagy in murine renal proximal tubular cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 101237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101237.	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 Takahashi Naoki, Yoshida Haruyoshi, Kimura Hideki, Kamiyama Kazuko, Kurose Tomomi, Sugimoto Hidehiro, Imura Toshio, Yokoi Seiji, Mikami Daisuke, Kasuno Kenji, Kurosawa Hiroyuki, Hirayama Yoshiaki, Naiki Hironobu, Hara Masanori, Iwano Masayuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Chronic hypoxia exacerbates diabetic glomerulosclerosis through mesangiolytic and podocyte injury in db/db mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 1678 ~ 1688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfaa074	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 -

1. 著者名 Yokoi Seiji, Kasuno Kenji, Nishimori Kazuhisa, Nishikawa Sho, Nishikawa Yudai, Morita Sayu, Kobayashi Mamiko, Fukushima Sachiko, Mikami Daisuke, Takahashi Naoki, Oota Yumiko, Kimura Hideki, Soya Yoshihiro, Kimata Shinsuke, Nishimura Kengo, Ono Takahiko, Muso Eri, Yoshida Haruyoshi, Yodoi Junji, Iwano Masayuki	4. 巻 507
2. 論文標題 Analytical and clinical validation of rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for urinary thioredoxin, an oxidative stress-dependent early biomarker of acute kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 271 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.04.025	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 -

1. 著者名 Shan Juanping, Kimura Hideki, Yokoi Seiji, Kamiyama Kazuko, Imamoto Toru, Takeda Izumi, Kobayashi Mamiko, Mikami Daisuke, Takahashi Naoki, Kasuno Kenji, Sugaya Takeshi, Iwano Masayuki	4. 巻 25
2. 論文標題 PPAR- activation reduces cisplatin-induced apoptosis via inhibiting p53/Bax/caspase-3 pathway without modulating autophagy in murine renal proximal tubular cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 598 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02039-2	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西川 翔, 糟野 健司, 西森 一久, 松田 航平, 福島 佐知子, 西川 雄大, 森田 紗由, 小林 麻美子, 三上 大輔, 高橋 直生, 木村 秀樹, 岩野 正之
2. 発表標題 急性腎障害によるレドックス制御破綻はゲノム不安定性を誘発して慢性腎臓病への移行を促進する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 直生, 西川 雄大, 坂下 紗弓, 西川 翔, 西森 一久, 福島 佐知子, 森田 紗由, 小林 麻美子, 木村 秀樹, 糟野 健司, 岩野 正之
2. 発表標題 IgMPC-TIN の組織, ならびに, 臨床診断基準の確立
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸口 周平, 岩村 菜々美, 鳥居 国雄, 山野 智子, 川田 知恵子, 宮崎 良一, 重松 陽介, 岩野 正之, 木村 秀樹
2. 発表標題 血液透析患者におけるカルニチンと造血動態関連因子の解析
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川 雄大, 高橋 直生, 坂下 紗弓, 島本 侑樹, 西森 一久, 森田 紗由, 小林 麻美子, 福島 佐知子, 横井 靖二, 三上 大輔, 木村 秀樹, 糟野 健司, 辻川 哲也, 岡沢 秀彦, 岩野 正之
2. 発表標題 64Cu-ATSM PET/MRIを用いた腎臓酸化ストレスイメージングと臨床的パラメーターとの比較
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 直生, 吉田 治義, 木村 秀樹, 上山 和子, 横井 靖二, 三上 大輔, 糟野 健司, 黒澤 寛之, 平山 吉朗, 原 正則, 岩野 正之
2. 発表標題 長期低酸素飼育のdb/dbマウスで糖尿病性糸球体硬化が増悪する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 糟野 健司, 横井 靖二, 島本 侑樹, 坂下 紗弓, 西森 一久, 西川 雄大, 森田 紗由, 小林 麻美子, 三上 大輔, 福島 佐知子, 高橋 直生, 木村 秀樹, 岩野 正之
2. 発表標題 レドックス制御破綻を介した新たなAKI-to-CKD transitionのメカニズム
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 上山 和子, 今本 徹, 武田 泉, 竹内 貴洋, 増永 慎也, 岩野 正之, 木村 秀樹
2. 発表標題 ジクロ口酢酸は炎症・オートファジー調整を介さずcaspase活性化を抑制しシスプラチン腎障害を軽減する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Kasuno, Sho Nishikawa, Seiji Yokoi, Masayuki Iwano et al.
2. 発表標題 Redox dysregulation after acute renal injury is a novel pathophysiology
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川 雄大, 高橋 直生, 西川 翔, 岩野正之ら
2. 発表標題 各種腎疾患における64Cu-ATSM PET / MRI を用いた酸化ストレス可視化の試み
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 麻美子, 三上 大輔, 上山 和子, 岩野 正之ら
2. 発表標題 短鎖脂肪酸はFFAR2 / 3 受容体を介してアデニン誘導性慢性腎臓病を軽減する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上山 和子, 木村 秀樹, 岩野 正之ら
2. 発表標題 ジクロ口酢酸はcFLIP 発現増強と14-3-3蛋白リン酸化抑制を介してcaspase 経路を抑制しシスプラチン腎障害を軽減する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Takahashi, Haruyoshi Yoshida, Masayuki Iwano, et al.
2. 発表標題 Severe Diabetic Glomerulosclerosis by Chronic Hypoxic Housing of db/db Mice: The Role of Mesangiolytic and Podocyte Injury
3. 学会等名 Kidney Week 2020 (アメリカ腎臓学会)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 直生, 横井 靖二, 西川 翔, 西森 一久, 西川 雄大, 小林 麻美子, 木村 秀樹, 糟野 健司, 岩野 正之
2. 発表標題 急性腎障害における細胞外 FSP1 の腎保護効果
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西川 雄大, 高橋 直生, 島本 侑樹, 西川 翔, 西森 一久, 森田 紗由, 小林 麻美子, 福島 佐知子, 木村 秀樹, 糟野 健司, 辻川 哲也, 岡沢 秀彦, 岩野 正之
2. 発表標題 64Cu-ATSM PET / MRI を用いた腎血流 (RBF) 測定の有用性
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 抗酸化剤および腎障害処置剤	発明者 岩野正之、横井靖 二、木村秀樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6831567	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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	森 俊雄  (Mori Toshio)  (10115280)	奈良県立医科大学・医学部・研究員   (24601)	
研究分担者	清野 泰  (Kiyono Yasushi)  (50305603)	福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授   (13401)	
研究分担者	岡沢 秀彦  (Okazawa Hidehiko)  (50360813)	福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授   (13401)	
研究分担者	糟野 健司  (Kasuno Kenji)  (60455243)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授   (13401)	

#### 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
---------	---------