

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06606

研究課題名（和文）貧血治療薬エリスロポエチンの動脈硬化抑制薬としてのドラッグ・リポジショニング研究

研究課題名（英文）anti-atherosclerotic effects of erythropoietin

研究代表者

鳥羽 裕恵（Toba, Hiroe）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90351270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：ラットにスクロース（12%）を飲料水中で10週間負荷しインスリン抵抗性モデルラットを作製し、最後の4週間にエリスロポエチン（75 U/kg）を投与した。耐糖能異常の指標であるOGTT、HOMA-IRはエリスロポエチンによって改善した。耐糖能異常改善の機序に、肝臓におけるSTAT3経路を介した抗炎症作用が関与している可能性が示唆された。また、エリスロポエチンは腎尿細管間質の線維化を減少する傾向にあった。さらに、スクロース負荷による大動脈組織へのマクロファージの浸潤を抑制した。以上より、エリスロポエチンはインスリン抵抗性時の耐糖能と腎障害、血管炎症を改善することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は、エリスロポエチンが間接的（肝臓への作用による耐糖能異常改善）かつ直接的（腎臓や血管への作用）な動脈硬化抑制薬となることを証明した点である。これは、貧血治療薬からメタボリックシンドローム患者に対する動脈硬化抑制薬にドラッグ・リポジショニングしうることを示す。

高血圧、糖尿病、脂質異常症が合併しやすいメタボリックシンドローム患者では各疾患の厳格な管理が必要なため、高用量・多種の治療薬服用が必須である。故に、社会的意義は1剤で耐糖能異常と動脈硬化の両面からアプローチできる治療薬を提示する点である。また、ドラッグ・リポジショニングに発展できれば迅速に健康・平均寿命を延長できる点である。

研究成果の概要（英文）：This study investigated whether erythropoietin would inhibit glucose tolerance and renal and vascular injury. Rats were treated with 12% sucrose in drinking water for 10 weeks to induce insulin resistance. Erythropoietin (75U/kg) was treated for the last 4 weeks. Oral glucose tolerance test and the value of HOMA-IR showed that erythropoietin improved glucose tolerance. In the liver, inflammatory cytokine TNF-alpha was decreased in erythropoietin-treated rats. Erythropoietin tended to reduce fibrotic collagen deposition in renal tubulointerstitial area and macrophage infiltration in aortic adventitia. In conclusion, erythropoietin improved glucose tolerance and might protect renal and vascular injury in the settings of insulin resistance.

研究分野：循環薬理学

キーワード：インスリン抵抗性 エリスロポエチン 動脈硬化 ドラッグ・リポジショニング

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎性貧血治療薬として臨床応用されているエリスロポエチンは赤血球前駆細胞上のエリスロポエチン受容体に作用した後、細胞内で JAK2 とその下流の PI3K-Akt 経路を活性化し、アポトーシスを抑制することで造血作用を発揮する。エリスロポエチン受容体が非造血組織においても広く発現していることが発見されるとともに、エリスロポエチンが心臓や脳、腎臓において急性虚血再灌流障害を抑制することが報告された (Lancet, 365, 1890-1892, 2005)。これらの研究では薬理的過剰用量が急性投与されていたが、研究代表者は臨床に近い用量を慢性投与した場合でも腎細胞内 PI3K-Akt 経路活性によるアポトーシス抑制を介して糖尿病ラットの腎障害が軽減することを報告した (Toba et al., Eur. J. Pharmacol., 612(1-3), 106-114, 2009)。また PI3K-Akt 経路は血管内皮細胞において血管弛緩因子であり動脈硬化抑制作用を有する一酸化窒素の産生を促進する経路であることに着目し、エリスロポエチンが糖尿病ラットや腎臓病ラットにおいて動脈硬化の初期病変を軽減することを報告してきた (若手研究(B) #23790608, Toba et al. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 37, 1139-1146, 2010, Toba et al., Eur. J. Pharmacol., 656, 81-87, 2011, Toba et al., Eur. J. Pharmacol., 691(1-3), 190-197, 2012, Wang & Toba et al. Pharmacology, 91, 48-58, 2013)。

(2) 高血圧、糖尿病、脂質異常症は日本人の死因の 23%を占める動脈硬化性疾患の危険因子であるが、これらはメタボリックシンドロームの一部として発症することが多く、肥満・インスリン抵抗性を基盤に合併しやすい。危険因子の集積は動脈硬化リスクを上昇させることに加え、インスリンシグナル異常 (インスリン抵抗性) は糖取り込みに関わる肝臓、骨格筋だけでなく血管や腎臓においても認められ、動脈硬化発症・進展を加速する一因となっている。

(3) インスリンシグナル経路の中核は PI3K-Akt 経路であることから「エリスロポエチンが肝臓、骨格筋だけでなく、血管内、腎臓内の PI3K-Akt 経路を活性化することで、各々のインスリンシグナル異常を改善できるか」が第一の問いである。第二の問いはエリスロポエチンについて「貧血治療薬からメタボリックシンドローム患者に対する動脈硬化抑制薬としてのドラッグ・リポジショニングが可能か否か」である。

2. 研究の目的

インスリン抵抗性モデルラットに臨床量のエリスロポエチンを慢性投与し、エリスロポエチンが間接的かつ直接的な動脈硬化抑制薬となることを証明する。

(1) 肝臓：耐糖能改善により高血圧、糖尿病、脂質異常症の発症を抑制する。

(2) 腎臓：動脈硬化性疾患の一つであるとともに動脈硬化の危険因子でもある慢性腎臓病を防ぐ。

(3) 血管：動脈硬化の初期病変である内皮細胞機能障害や血管炎症を抑制することで、動脈硬化を抑制する。

3. 研究の方法

(1) インスリン抵抗性モデルラットは 12%スクロース水を 10 週間投与することで作製した。ラットは腎負荷を高めるため、あらかじめ片腎摘術を施した。

(2) 研究代表者がこれまでに、エリスロポエチンの腎性貧血治療薬の枠を超えた腎保護薬、血管保護薬としての有用性について報告した過去の研究に基づき、造血を呈さなかった 150 U/kg のエリスロポエチンをスクロース負荷開始時から週 3 回、皮下投与した。必要に応じ投与期間、投与量の調節を行った。

(3) 経口糖負荷試験と HOMA-IR の測定から、耐糖能を検討した。

(4) 24 時間蓄尿から尿蛋白を測定し、腎障害の評価を行った。

(5) 投与期間終了後、肝臓、脂肪組織、腎臓、大動脈を摘出した。大動脈の一部は摘出後すぐに血管弛緩反応測定に用い、血管内皮機能を評価した。各組織のホモジネートは蛋白抽出、RNA 抽出、薄切切片はヘマトキシリンエオシン染色、マッソントリクロム染色、免疫染色によるマクロファージの検出に用い、炎症の程度や細胞内シグナル経路を検討した。

4. 研究成果

(1) 150 U/kg のエリスロポエチンの投与によりヘマトクリットと血圧の上昇がエリスロポエチン投与開始から 4 週以降で顕著に認められ、尿蛋白、大動脈弛緩反応の悪化が認められた (図 1)。そのため、エリスロポエチンの投与期間を最後の 4 週間とし、投与量も半減し (75 U/kg)、再検討を行った。以降の実験は 75 U/kg を用いた。ヘマトクリット値は 150 U/kg と同等に上昇した。

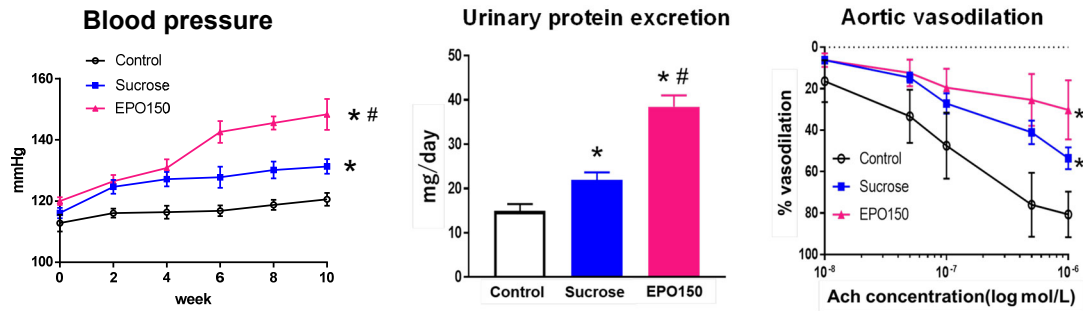


図1 150 U/kg エリスロポエチン投与による作用

(2) スクロース負荷により悪化した耐糖能は、エリスロポエチンにより改善し、エリスロポエチンのインスリン抵抗性改善薬としての有用性を提示することができた (図2)。75 U/kg に減量し、投与期間を4週間に変更すると、血圧に影響を与えなかった。

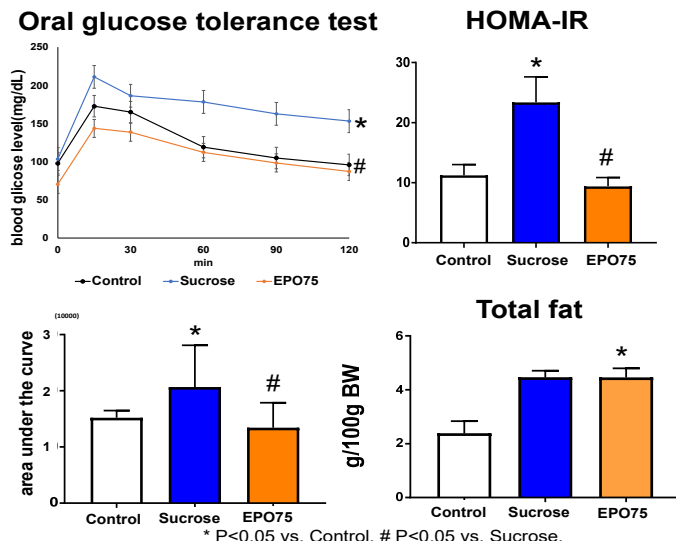


図2 エリスロポエチンによる耐糖能改善作用

(3) エリスロポエチンはインスリン抵抗性モデルラットの尿蛋白の増加に影響を与えなかったが、腎髄質における尿細管間質の線維化を軽減する傾向が認められた (図3)。腎線維化は長期にわたる慢性炎症の結果引き起こされ、不可逆的な腎機能低下に繋がる病態であるため、エリスロポエチンによる腎保護効果が期待できる。

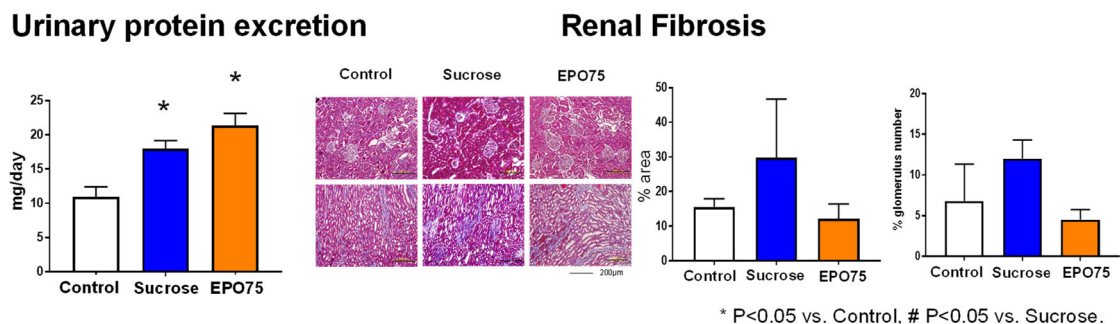


図3 インスリン抵抗性モデルラットの腎臓へのエリスロポエチンの影響

(4) インスリン抵抗性モデルラット大動脈における内皮依存性弛緩反応(血管内皮機能)の悪化にエリスロポエチンは影響を与えなかったが、若干の改善傾向にあった。一方、大動脈外膜組織に浸潤したマクロファージ数はエリスロポエチン投与群で有意に減少していた(図4)。動脈硬化は血管の慢性炎症の終末像であることから、インスリン抵抗性の病態時における動脈硬化抑制薬としてのエリスロポエチンの可能性が示された。

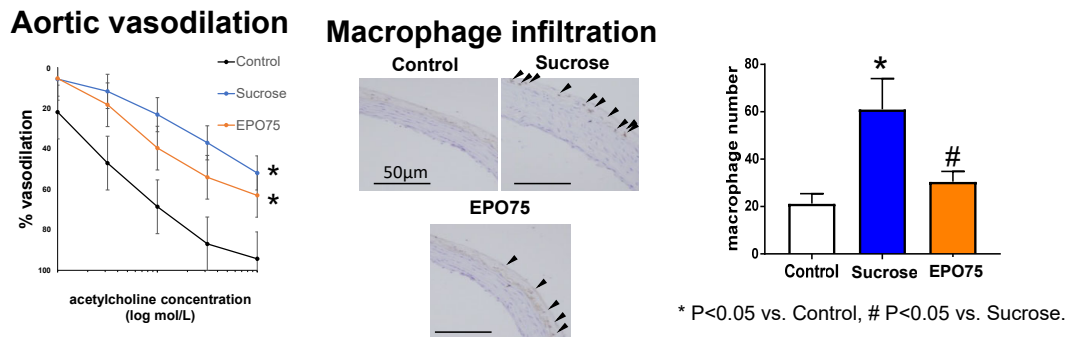
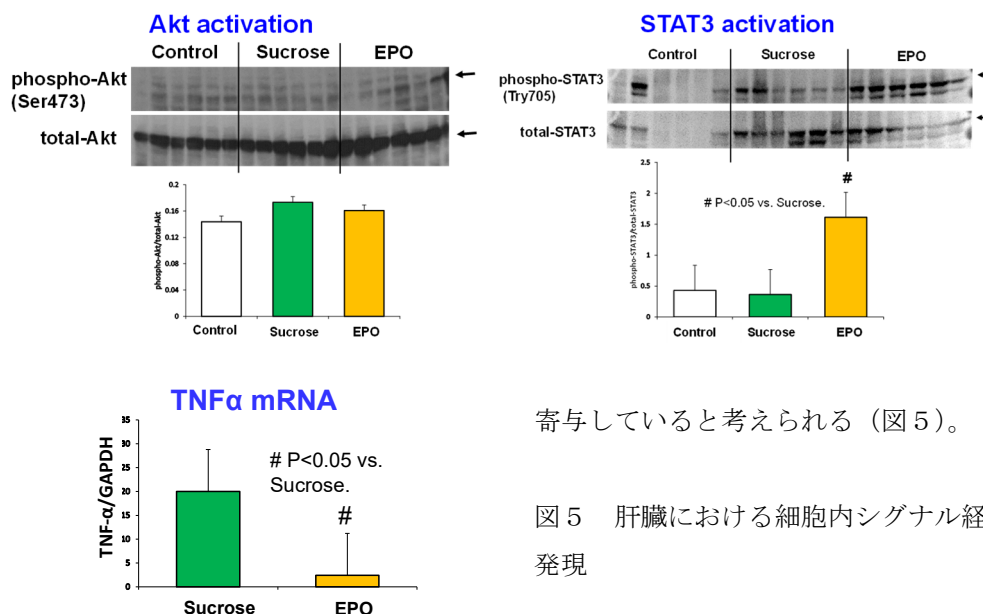


図4 インスリン抵抗性モデルラットの血管へのエリスロポエチンの影響

(5) エリスロポエチンによる耐糖能改善機序を検討すべく、肝臓におけるAkt経路の活性化をウェスタンブロット法でリン酸化Aktの発現から評価したが、全群に有意差を認めなかった。そこで、エリスロポエチン受容体刺激の下流で活性化される別の経路、STAT経路の関与について検討を行った。結果、肝臓におけるリン酸化STAT3発現がエリスロポエチンにより増加しており、JAK/STAT経路がエリスロポエチンによるインスリン抵抗性改善作用に重要な役割を担っていることが示唆された。また、肝臓における炎症性サイトカインtumor necrosis factor- α (TNF α)の発現が低下していたことから、耐糖能改善作用にもエリスロポエチンによる抗炎症作用が



寄与していると考えられる(図5)。

図5 肝臓における細胞内シグナル経路とTNF α 発現

(6) これらの研究成果から、エリスロポエチンはJAK2/STAT3経路活性化を介した抗炎症作用

により耐糖能異常を改善することが明らかとなった。本検討ではエリスロポエチンが高血圧や糖尿病、脂質代謝異常発症を抑制する段階までは証明できていないが、耐糖能異常に起因する高インスリン血症はこれらの疾患を引き起こすことから、本研究課題の目的（1）を証明できたと考える。目的（2）のエリスロポエチンによる腎臓への効果については検討を残すが、線維性変化を抑制する傾向にあり、十分に期待できる。目的（3）の血管組織への作用についても、血管内皮機能障害の有意な改善までは確認できなかったが、腎機能低下、血管内皮機能低下が本病態モデルでは軽微であり、エリスロポエチンによる改善効果を検出することが困難であった可能性が考えられる。しかし、動脈硬化の中心的な病態である炎症反応を抑制することを明らかにすることができ、動脈硬化抑制薬へのドラッグ・リポジショニングを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Yusuke, Nessa Naseratun, Toba Hiroe, Kobara Miyuki, Nakata Tetsuo	4. 巻 107
2. 論文標題 Angelica acutiloba Exerts Antihypertensive Effect and Improves Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats Fed with a High-Fat Diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology	6. 最初と最後の頁 188 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000520982	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 Toba Hiroe, Ikemoto Mitsushi J., Kobara Miyuki, Nakata Tetsuo	4. 巻 914
2. 論文標題 Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS1) increments by the renin-angiotensin system induce renal fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174681 ~ 174681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2021.174681	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 Yokota Rodrigo, Bhunu Benjamin, Toba Hiroe, Intapad Suttira	4. 巻 2
2. 論文標題 Sphingolipids and Kidney Disease: Possible Role of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction (IUGR)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 534 ~ 541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34067/KID.0006322020	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧澤恭平、鳥羽裕恵、小原幸、中田徹男
2. 発表標題 インスリン抵抗性モデルラットの耐糖能異常と臓器障害に対するエリスロポエチンの効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroe Toba, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata
2. 発表標題 Role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in vascular endothelial cell dysfunction and inflammation
3. 学会等名 第 95 回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroe Toba, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata
2. 発表標題 SPARC and ADAMTS1 are induced as anti-inflammatory factors at the early stage of vascular endothelial injury in DOCA-salt hypertensive rats
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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