

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21220

研究課題名(和文)単球の膜輸送体に着目した「真の尿毒症物質」の探索とCKD性心不全増悪機構の解明

研究課題名(英文) Search for "the true uremic substance" focusing on membrane transporters of monocytes and elucidation of the exacerbation mechanism of CKD-induced heart failure

研究代表者

吉田 優哉 (Yoshida, Yuya)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90907536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)患者は尿毒症物質の生体内蓄積によって様々な疾患を合併する。本研究では過去の知見で得られた「尿毒症物質の一つであるレチノールの細胞内取込み増加」という現象から着想を得て、CKDマウスの単球におけるその他尿毒症物質の取込みを担う膜輸送体の探索を行い、CKD時の病態と強い相関を示す「真の尿毒症物質」の同定を行った。NGS解析などから候補となる膜分子を数種同定し、特に発現変化が顕著であるトランスポーターおよびこれを介して細胞内へ取り込まれる物質を同定した。この物質の取込み量はCKDにて顕著に増加しており、活性酸素種の代謝酵素であるALDH等の発現上昇に関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定した物質は、CKD時に排泄が阻害されることは以前から知られていたが、この分子自体には一般に毒性はない、と考えられており、CKD時の病態悪化の原因としては着目されてこなかった。本研究による解析にて、この物質の細胞内での異常な蓄積が炎症の増悪に寄与していることを明らかにした。本物質が「真の尿毒症物質」として着目されるきっかけとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) patients suffer from various diseases due to accumulation of uremic substances in the body. Inspired by our previous findings of "increased cellular uptake of retinol, a uremic substance," we searched for membrane transporters responsible for the uptake of other uremic substances in monocytes of CKD mice and identified "true uremic substances" that strongly correlate with the pathophysiology of CKD. We identified several candidate membrane molecules based on NGS analysis, and in particular, identified transporters with marked changes in expression and substances that are taken up into cells via these transporters. The uptake of these substances was significantly increased in CKD, and they were involved in the increased expression of ALDH and other enzymes that metabolize reactive oxygen species.

研究分野：生命科学、時間生物学

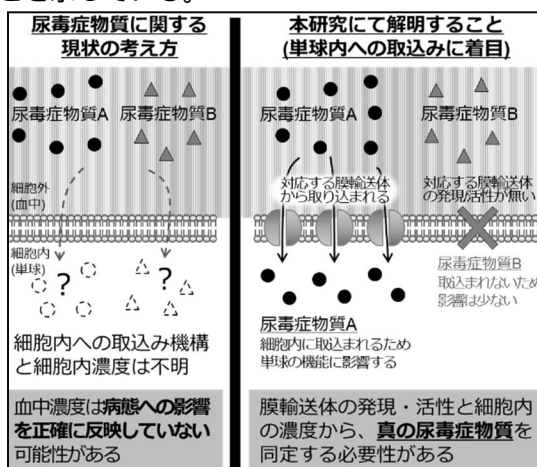
キーワード：慢性腎臓病 ビタミンA 体内時計 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

CKD と心疾患 ; CKD 患者数は世界的に増加している [Bikbov et al., Lancet. 2020]。特に国内では患者数が約 1330 万人と推計され [Nitta et al., Ren Replace Ther. 2020]、「新たな国民病」と称されている。CKD は特に心血管疾患の重大なリスクファクターであるが、これは心臓と腎臓が様々な因子によって密接に関連しているためである。近年、この関連に単球 (マクロファージ) が重要な役割を担っていることが我々 [Yoshida Y et al., Nat. Commun. 2021] や他の研究者 [Fujiu K et al., Nat. Med. 2017] によって解明され、研究が進んでいる (図 1)。

CKD 時のレチノールの細胞内取込み活性 ; CKD 患者では腎機能低下に伴い、老廃物、サイトカイン等の血中濃度が増加し、ホメオスタシスが崩壊する。これらの物質は尿毒症物質と呼ばれ、CKD 患者の合併症は主にこれら尿毒症物質を介して引き起こされる。申請者はこの 1 つであるレチノールに着目し、血中レチノール蓄積が単球の炎症活性化を引き起こし、心不全を増悪させる機序を明らかにした [Yoshida Y et al., Nat. Commun. 2021]。また、その後の検討によって、単球内レチノール濃度の上昇率が血中の上昇率を上回ること、これがレチノールの膜輸送体 (STRA6) の発現増加に起因することも明らかになった。レチノールは基本的に細胞内取込み後にシグナル伝達に影響するため、この結果は「CKD 時のレチノールによる影響を真に反映するのは血中濃度ではなく STRA6 活性である」とことを示している。

単球の膜輸送体活性に着目した仮説 ; 尿毒症物質はレチノールのみではなく、CKD 時の病態は複数の尿毒症物質によって悪化する。単球についても、複数の尿毒症物質が単球の炎症活性化に影響を及ぼすことは示唆されているが [Nakano T et al., Circulation. 2019 等]、取込み活性に焦点を当てた報告は殆ど存在しない。よってこれらの知見は申請者に「レチノール以外の尿毒症物質についても細胞内取込みを担う膜輸送体の活性が真に病態を反映するのではないか？」という仮説をもたらした。



2. 研究の目的

CKD 時の単球における膜輸送体の発現および機能を解析し、単球の尿毒症物質取込み能が単球の機能および心臓病態へ及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

検討項目 1 : (レチノール以外の) 単球内に蓄積している尿毒症物質の同定 ; CKD 時の単球に蓄積している尿毒症物質については報告がない。そこで、まずは CKD モデルマウス単球を対象にメタボローム解析を実施し、どの尿毒症物質が細胞内に蓄積しているかを明らかにすることで、真の尿毒症物質の候補を絞り込む。

検討項目 2 : 尿毒症物質の取込みを担う膜輸送体の同定 ; まず、CKD モデルマウスの RNA-Seq から膜輸送体の発現を網羅的に解析し、CKD によって発現が変化する膜輸送体を絞り込む。そして、これらを阻害 (またはノックダウン) した初代培養単球における着目した尿毒症物質の取込み能を、in vitro の実験系にて評価する。さらに、得られた候補膜輸送体の阻害剤を CKD モデルマウスに投与した際の 着目した尿毒症物質の単球内濃度、心臓の炎症および線維化、を評価することで、候補膜輸送体活性と病態との関連を明らかにする。

検討項目 3 : 膜輸送体の発現 (活性) 上昇メカニズムの解析 ; 上記検討にて明らかにした膜輸送体の遺伝子上流に着目し、ChIP-Seq や過去の膜輸送体に関する報告から、発現を制御している転写因子を同定する。さらに得られた候補転写因子の活性を変化させる細胞内シグナル伝達経路を RNA-Seq 等から絞り込み、CKD モデルマウスに対するシグナル伝達阻害剤投与実験、および標的遺伝子の発現を操作した単球の移植実験を行い、CKD による膜輸送体の発現上昇メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

CKD モデルマウスの単球を対象としたマイクロアレイ解析やプロテオミクス解析などから候補となる膜分子を数種同定し、これらが種々の尿毒症物質の取込みに関与していることを明らか

にした。その中でも特に発現変化が顕著であることトランスポーターおよびこのトランスポーターに取り込まれる物質に着目した解析を行い、この物質の蓄積が単球やマクロファージ、樹状細胞などにおける ALDH (レチノールや活性酸素種の代謝酵素)や過去に同定した GPR68 の発現にも影響することが明らかとした。さらにこの物質の正常マウスへの投与が上記分子の発現を上昇させることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshida Yuya, Matsunaga Naoya, Nakao Takaharu, Hamamura Kengo, Kondo Hideaki, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki, Tsuruta Akito, Kurogi Masayuki, Nakaya Michio, Kurose Hitoshi, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Alteration of circadian machinery in monocytes underlies chronic kidney disease-associated cardiac inflammation and fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23050-x	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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 優哉, 松永 直哉, 濱村 賢吾, 鶴田 朗人, 小柳 悟, 大戸 茂弘
2. 発表標題 単球に着目した慢性腎臓病時における心臓病態悪化の新規メカニズム解明
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2021/第29回クリニカルファーマシーシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 優哉, 松永 直哉, 鶴田 朗人, 小柳 悟, 大戸 茂弘
2. 発表標題 概日時計の分子機構を基盤とした心-腎連関機構の解析
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川直希, 吉田優哉, 松永直哉, 鶴田朗人, 小柳悟, 大戸茂弘
2. 発表標題 タモキシフェン誘発性肝障害の時間薬理学的研究
3. 学会等名 日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 優哉, 松永 直哉, 鶴田 朗人, 小柳 悟, 大戸 茂弘
2. 発表標題 単球の概日時計変容と心不全増悪 ~新たな心腎連関の解明~
3. 学会等名 日本薬理学会【第96回年会】
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