

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390152

研究課題名(和文)酸化ストレスに対する新規のレドックス診断法の開発

研究課題名(英文)Development of new method detecting redox regulation against oxidative stress

研究代表者

中村 肇(Nakamura, Hajime)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第8研究部・部長

研究者番号：70303914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：チオレドキシンは酸化ストレスにより誘導される生体防御タンパクである。これまで血中チオレドキシンの酸化ストレス疾患で上昇することを報告してきたが、今回尿中チオレドキシンの慢性腎臓病において尿細管障害マーカーである尿中N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)と有意な相関を認めることを明らかにした。さらに酸化ストレスを迅速に診断する方法として、チオレドキシンのmRNA発現増加を迅速に検出する方法を開発した。これにより酸化ストレスにさらされた病態を迅速に診断することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Thioredoxin is a redox-regulating protein which is induced by oxidative stress. We previously reported that plasma/serum levels of thioredoxin are elevated in diseases associated with oxidative stress. In this study, we found that urinary levels of thioredoxin are correlated with urinary levels of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase which is a marker for damage of renal tubules in chronic renal diseases. We have developed a new rapid method detecting the elevation of thioredoxin mRNA. It is possible to diagnose rapidly the pathological condition suffering from oxidative stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：チオレドキシンの急性腎障害 慢性腎臓病 酸化ストレス 血液透析 末梢血リンパ球 過酸化水素  
バイオマーカー

## 1 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、感染、虚血再灌流障害、発がんなど種々の疾患の一因となっており、その早期診断は病態の診断治療にも重要である。これまでに報告されてきた酸化ストレスの指標は、カルボニル蛋白や酸化 LDL などいずれも酸化生成物すなわち酸化ストレスの結果であり、酸化ストレスを早期に診断できるバイオマーカーとは言えないものが多かった。一方、われわれはこれまでに血中チオレドキシシン(TRX)蛋白濃度が種々の疾患において酸化ストレスマーカーとなり疾患の活動性や予後と相関することを発見・報告し、国際的に高く評価されてきた。

近年、慢性腎臓病(CKD)や血液透析(HD)の患者では腎死よりも酸化ストレスが原因となる心血管イベントの合併症による死亡率の方が高いことが明らかになり、腎疾患に伴う酸化ストレスをいかに迅速に診断するかが重要である。

## 2 研究の目的

チオレドキシシン(TRX)は腎系球体において血中から一旦原尿中に排泄され、尿細管において再吸収されると考えられる。したがって、腎尿細管の障害では、尿中 TRX 値が上昇すると考えられる。種々の腎疾患において、尿中 TRX 値を測定し、尿中 TRX 値が腎尿細管障害のマーカーとして有用であるかを検証する。

また TRX mRNA の酸化ストレスレポーターとしての特性を生かしてヒト末梢血リンパ球(単核球)中の TRX mRNA を測定し、これを新規の生体酸化ストレスマーカーとして開発・応用するための研究を行う。

## 3 研究の方法

(1)尿中チオレドキシシン(TRX)については

血中 TRX と同様に ELISA 法により測定した。

(2)末梢血リンパ球 TRXmRNA については RT-PCR 法により測定した。さらに高速全自動遺伝子解析装置・東洋紡 GENECUBE を用いた測定について基礎検討を行った。

## 4 研究成果

(1)尿中TRX値を種々の腎疾患患者で測定したところ、尿中TRXは急性腎障害で上昇していた。尿中TRXは人工心肺開始後、早期急性腎障害マーカーである尿中Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)とほぼ同時に上昇した。また尿中TRXは尿細管障害マーカーである尿中 N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)や尿細管の萎縮度と有意な相関を認めた。尿中TRXが急性腎障害(AKI)の診断ツールとして有用かどうかROC解析を行った。カットオフ値を 35.2 ng/mgとした場合、感度 0.9、特異度 0.82、AU C0.9でAKIの診断に有用であることが明らかとなった。

(2)CKD/HD患者および健常人の末梢血リンパ球を用いて、酸化ストレスにより増加することが知られているTRXmRNAを測定した。HD患者では、TRXmRNAは透析前に上昇し、透析後に低下することから、透析による酸化ストレスを鋭敏に反映すると考えられる。さらに健常人リンパ球に腎毒性物質を添加培養すると、腎毒性物質の添加によりTRXmRNAが増加することも判明した。

細胞内のTRXmRNA量を過酸化水素水の添加後継時的に観察した。過酸化水素水添加12時間後までは細胞内のTRXmRNA量は上昇しなかったが、24時間目には増加した。また正常健康人の末梢血リンパ球に種々の尿毒性物質を

加えると用量依存的にTRX mRNAが上昇することを明らかにした。

高速全自動遺伝子解析装置・東洋紡GENECUBE を用いれば、従来の RT-PCR 法よりも迅速に TRXmRNA の測定が可能であることが確認された。

## 5 主な発表論文等

### 雑誌論文 (計 14 件)

Taketani Y, Kinugasa K, Kitajima R, Nishiumi S, Asada H, Nakamura H, Fujita T, Kanzaki K, Masutani H, Yodoi J: Protective effects of oral administration of yeast thioredoxin against gastric mucosal injury

Biosci. Biotech. Biochem. In press

Sato S, Nakayama N, Otsuki S, Tanaka S, Nakamura H, Koshiyama H, Nohara R: Smoking counteracts the favorable effect of exercise training on endothelial function in patients with type 2 diabetes.

Japanese Clinical Medicine 4: 15-19, 2013

Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, Suehiro M, Goto D, Urata N, Kawamoto T, Nakamura H, Yodoi J, Hino K, Yamada G: Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with vitamins E and C: a pilot study

Hepat Med 5:11-16, 2013

Matsuo Y, Irie K, Kiyonari H, Okuyama H, Nakamura H, Son A, Lopez-Ramos DA, Tian H, Oka S, Okawa K, Kizaki-Kondoh S, Masutani H, Yodoi J: The protective role of the transmembrane thioredoxin-related protein TMX in inflammatory liver injury

Antiox. Redox Signal. 18:1263-1272, 2013

Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, Suehiro M, Goto D, Urata N, Oka T, Kawamoto H, Nakamura H, Yodoi J, Yamada G:

Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with vitamins E and C: a pilot study.

Hepat. Med. 5 :11-16, 2013

Matsuo Y, Irie K, Kiyonari H, Okuyama H, Nakamura H, Son A, Lopez-Ramos DA, Tian H, Oka S, Okawa K, Kizaki-Kondoh S, Masutani H, Yodoi J:

The protective role of transmembrane thioredoxin-related protein TMX in inflammatory liver injury.

Antiox. Redox Signal 18 :1263-1272, 2013

Song J, Dong X, Chen Y, Chen G, Liang H, Nakamura H, Yodoi J, Bai J:

The expression of thioredoxin1 in preterm delivery placenta

Redox Report 17:187-193, 2012

Nagano M, Hatakeyama K, Kai M, Nakamura H, Yodoi J, Asada Y, Chijiwa K:

Nuclear expression of thioredoxin-1 in the invasion front is associated with outcome in patients with gallbladder carcinoma.

HPB 14: 573-582, 2012

Luo FC, Zhou J, Lv T, Qi L, Wang SD, Nakamura H, Yodoi J, Bai J:

Induction of endoplasmic reticulum stress and the modulation of thioredoxin-1 in formaldehyde-induced neurotoxicity

Neurotoxicology 33: 290-298, 2012

Luo FC, Qi L, Lv T, Wang SD, Liu H, Nakamura H, Yodoi J, Bai J:

Geranylgeranylacetone protects mice against morphine-induced hyperlocomotion, rewarding effect, and withdrawal syndrome.

Free Radic. Biol. Med. 52: 1218-1227, 2012

Luo FC, Zhou J, Lv T, Qi L, Wang SD, Nakamura H, Yodoi J, Bai J:

Induction of endoplasmic reticulum stress and the modulation of thioredoxin-1 in formaldehyde-induced neurotoxicity.

Neurotoxicology 33: 290-298, 2012

Luo FC, Qi L, Lv T, Wang SD, Liu H, Nakamura H, Yodoi J, Bai J:

Geranylgeranylacetone protects mice against morphine-induced hyperlocomotion, rewarding effect, and

withdrawal syndrome.  
Free Radic. Biol. Med. 52: 1218-1227,  
2012  
Taketani Y, Kinugasa K, Furukawa S,  
Nakamura H, Otsuki R, Yasuda H, Fujita  
T, Kanzaki K, Masutani H, Yodoi J:  
Yeast thioredoxin-enriched extracts  
for mitigating the allergenicity of  
foods.  
Biosci. Biotechnol. Biochem.  
75:1872-1879, 2011  
Ito W, Kobayashi N, Takeda M, Ueki S,  
Kayaba H, Nakamura H, Yodoi J, Chihara  
J:  
Thioredoxin in allergic inflammation  
Int. Arch. Allergy Immunol. 155 Suppl  
1: 142-146, 2011

#### 学会発表 (計 13 件)

山田信子、久保麻友子、永原 守、  
井上裕子、金田恵美、志水晃介、  
長谷川美里、鎗野 りか、中村 肇:  
緩和ケア介入患者に対する食事サポート  
管理栄養士と看護士の協働による積極的  
な介入  
第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会  
平成 26 年 1 月 11-12 日 大阪  
久保麻友子、山田信子、志水晃介、山崎  
みどり、阿賀千香子、池上由利子、  
井下春美、藤本寛太、内田洋一朗、  
中村 肇:  
NST の栄養提案に対する実施率について  
~ 介入方式変更前後での比較 ~  
第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会  
平成 26 年 1 月 11-12 日 大阪  
Sakakibara A, Matsui K, Nagano T, Kono  
S, Nakamura H:  
A comparative study on neoadjuvant  
chemotherapy for cervical cancer at  
high risk of relapse: A retrospective  
single-center pilot study  
The 3<sup>rd</sup> Biennial Meeting of Asian  
Society of Gynecologic Oncology, Kyoto,  
Japan, December 13-15, 2013  
山崎みどり、加藤千春、渡壁一雄、辻野  
久美、清水英樹、西藤悠佳、  
中村 肇:  
入院患者における検査受付時及び実施時  
の患者確認方法 ~ 患者誤認防止対策とし  
ての無線バーコードリーダー導入の取り組  
み ~

第 8 回医療の質・安全学会学術集会 平成  
25 年 11 月 23-24 日 東京  
長谷川美里、山田信子、鎗野 りか、久  
保麻友子、石床 学、中村 肇、  
山内清明:  
消化器癌との比較における肺癌化学療法  
の栄養評価  
第 51 回日本癌治療学会 平成 25 年 10 月  
24-26 日 京都  
高森行宏、米本智美、近藤尚哉、  
高橋綾子、中村 肇:  
ヘリコバクター・ピロリ感染が健診結果に  
与える影響について  
第 54 回人間ドック学会学術大会 平成  
25 年 8 月 29-30 日 浜松  
岩崎聡美、内田洋一朗、野田祥子、  
井下春美、山田信子、久保麻友子、  
阿賀千賀子、池上由利子、山崎みどり、藤  
本寛太、佐藤正人、中村 肇:  
胃癌術後の誤嚥性肺炎に対して口腔ケア  
介入が著効した一症例  
第 50 回日本外科代謝栄養学会学術集会  
平成 25 年 7 月 4-5 日 東京  
伊藤寿夫、中村 肇、奥村亮介、濱野孝  
志、下村弘一、今阪 剛、渡壁一雄、  
奥井詩帆、上藤裕里加:  
当院の造影 CT 検査における検査説明・チ  
ェック表・同意書の運用について  
第 63 回日本病院学会 平成 25 年 6 月  
27-28 日 新潟  
高森行宏、米本智美、松岡敦子、  
近藤尚哉、高橋綾子、中村 肇:  
30 歳代男性における高感度 CRP 検査の有  
用性と生活習慣との関連について  
第 53 回人間ドック学会学術大会 平成  
24 年 9 月 1-2 日 (発表 1 日) 東京  
中村 肇:  
心筋炎と抗酸化療法 レドックス制御蛋  
白チオレドキシンの有用性  
第 76 回日本循環器病学会ランチョンセミ  
ナー 平成 24 年 3 月 17 日  
久保麻友子、山田信子、山崎みどり、阿  
賀千香子、井下春美、野村美香、  
河崎祐貴子、佐藤正人、中村 肇:  
栄養サポートチーム加算算定後 1 年間に  
振り返る  
= 北野病院 NST の栄養介入の傾向と今後  
の展望について =  
第 15 回日本病態栄養学会年次学術集会  
平成 24 年 1 月 15 日 京都  
Kawanaka M, Oga C, Kawamoto H, Izumi A,  
Nakamura H, Yodoi J, Yamada G:

Monitoring of serum thioredoxin levels  
in NASH/NAFLD with repeated liver  
biopsies

2011 AASLD Annual Meeting, The Liver  
Meeting 2011, San Fransisco, CA, USA,  
November 4-8, 2011

高森行宏、米本智美、松岡敦子、  
近藤尚哉、高橋綾子、中村 肇：

「当健康管理センターにおける高感度  
CRP 検査の有用性について」

第 52 回日本人間ドック学会学術大会(大  
阪) 2011 年 8 月 25-26 日(発表 25 日)

図書 (計 1 件)

中村 肇

生体の抗酸化システム (3) チオレド  
キシン系

酸化ストレスの医学 第 2 版 印刷中

産業財産権

なし

研究組織

(1) 研究代表者

中村 肇 (NAKAMURA, Hajime)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第 8 研  
究部・部長

研究者番号 7 0 3 0 3 9 1 4

(2) 研究分担者

糟野健司 (KASUNO, Kenji)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号 6 0 4 5 5 2 4 3