

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890013

研究課題名(和文) トランスポーターによる尿毒症物質除去を標的とした新規慢性腎臓病治療法の開発

研究課題名(英文) Regulation of SLC04C1 transporter-mediated excretion of uremic toxins as a therapeutic strategy for Chronic Kidney Disease

研究代表者

秋山 泰利 (Akiyama, Yasutoshi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：70635557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)が進行するとさまざまな尿毒素が体内に蓄積する。これまで申請者らは腎臓近位尿細管に特異的に発現するトランスポーターSLC04C1がある種の尿毒素の排泄にも関与することを明らかにし、スタチンなどによりSLC04C1の発現を亢進させることで尿毒素の排泄が促進することを報告した。今回申請者はCKDにおいて尿毒素のインドキシル硫酸が転写因子GATA3を介してSLC04C1の発現を抑制することを明らかにした。スタチンの投与に加え、経口吸着炭などによるインドキシル硫酸除去、GATA阻害薬の投与を併用することで、SLC04C1を介した尿毒素排泄をより効果的に促進させられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is a global health problem that carries a substantial risk for cardiovascular morbidity and death. With the progression of CKD, various uremic toxins accumulate, subsequently causing renal damage and hypertension. Recently, we have revealed that kidney-specific organic anion transporter SLC04C1 excretes uremic toxins, and the up-regulation of SLC04C1 resulted in the reduction of blood pressure and renal inflammation in a CKD model. In this study, we revealed that indoxyl sulfate (IS), one of the best-known uremic toxins, inhibits the expression of SLC04C1 through GATA3 and that removal of IS increases the SLC04C1 expression. The combination therapy of, (1) activating the SLC04C1 expression by statins, (2) reducing the plasma IS concentration by the administration of AST-120 and (3) administering GATA inhibitor, could be a more effective remedy for the excretion of uremic toxins and preservation of renal function in CKD patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：トランスポーター 尿毒症 尿毒素 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD)は心血管疾患の強力な独立した危険因子であり、日本も含め世界中で人口の10%以上が罹患していると言われている。CKDでは腎機能の低下とともに腎不全物質が体内に蓄積してくるが、その中で生体に対し毒性を発揮するものを特に尿毒症物質という。

尿毒症物質は炎症や酸化ストレスなどを惹起し腎障害を悪化させ、さらにその腎障害が尿毒症物質の蓄積を促進するという悪循環が存在するため、一旦尿毒症物質が蓄積し始めると患者の生命予後は加速度的に悪化する。また腎機能低下が進行し透析に至った患者は現在本邦で約30万人、透析患者に対する医療費は年間約1兆6千億円にも及ぶため、CKD進行および透析導入を抑止する治療法の開発は医療経済と社会に大きく貢献することになる。

上述の通り尿毒症物質はCKDの増悪の悪循環を形成していると考えられることから、CKDの有力な治療標的となる可能性がある。しかしながらこれまでのところ尿毒症物質を除去する確立した治療法は透析と経口吸着炭 (AST-120, クレメジン®)のみである。また測定系が確立していない尿毒症物質も多く、さらにいまだ同定されていない尿毒症物質が数多く存在すると考えられ、透析やAST-120に関しても、尿毒症物質の除去効率などの特性はほとんど明らかになっていないのが現状である。

今日までに申請者らはヒト近位尿細血管側に発現するSLCO4C1トランスポーターを単離するとともに (PNAS 2004)、SLCO4C1が尿毒症物質の排泄を行うトランスポーターであり、SLCO4C1の発現を増強させることにより尿毒症物質の排泄が促進し血圧や腎内の炎症が改善することを報告し (JASN 2009)、トランスポーターの発現調節が尿毒症物質除去を目的とした新たな治療標的となる可能性を報告した。しかしながらCKDにおいてはSLCO4C1の発現が低下することが明らかとなり、腎機能低下時にはSLCO4C1の抑制のために十分な尿毒症物質の排泄が行われていない可能性が考えられたが、このメカニズムはいまだ不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではCKDにおけるトランスポーターの発現制御機構のさらなる解明、加えて尿毒症物質の毒性や産生源、トランスポーターによる尿毒症物質輸送の特性の解明を行い、さらに透析やAST-120による尿毒症物質の動態のプロファイルを明らかにすることで、尿毒症物質を多角的に効率良く除去するCKD治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

CKDにおけるSLCO4C1発現低下の機序として、尿毒症物質が直接SLCO4C1の発現を低下させるという仮説をたてた。

仮説を検証するため、これまで申請者らがキャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS)を用い、腎機能の低下とともに蓄積する腎不全物質として同定した (Hypertens Res 2010) 52物質を中心に、培養細胞を用いて各種物質のSLCO4C1 mRNA発現への影響をスクリーニングした。

さらにスクリーニングにより同定された物質に対し、*in vivo*での影響を検討するため、5/6腎摘慢性腎不全モデルラットを用いて、投与によるslco4c1の発現や尿毒症物質の血中濃度変化などを検討した。

4. 研究成果

尿毒症物質が直接SLCO4C1遺伝子の発現を抑制する可能性を検討するため、各種腎不全物質を用いSLCO4C1 mRNA発現への影響をスクリーニングした。その結果尿毒症物質のひとつであるインドキシル硫酸 (IS)が濃度依存性にSLCO4C1発現を抑制し、逆に転写因子GATA3の発現を亢進させることを明らかにした (図1)。またGATA3を過剰発現させるとSLCO4C1の発現が低下し、逆にノックダウンするとSLCO4C1の発現は上昇した (図2) ことから、ISはGATA3の発現亢進を介してSLCO4C1の発現を負に制御していると考えられた。

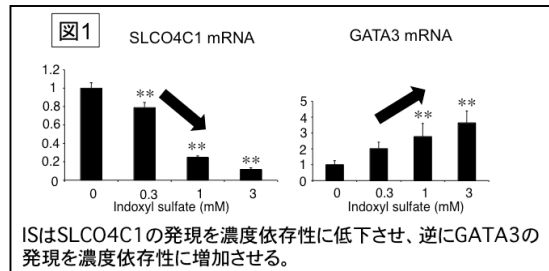


図1 ISはSLCO4C1の発現を濃度依存性に低下させ、逆にGATA3の発現を濃度依存性に増加させる。

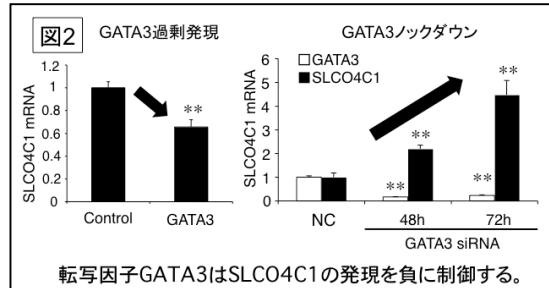
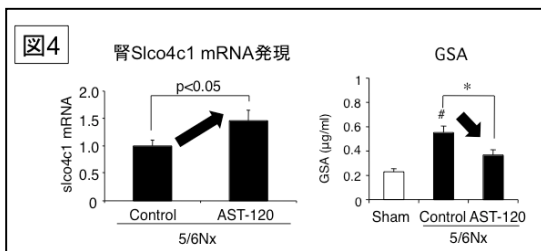
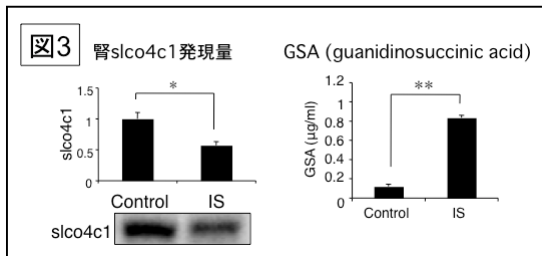


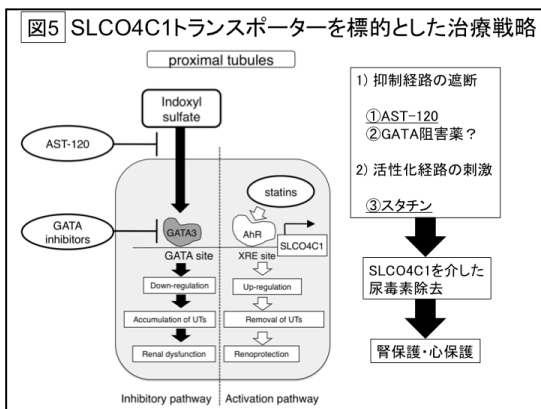
図2 転写因子GATA3はSLCO4C1の発現を負に制御する。

*In vivo*の検討ではラットにISを投与すると腎slco4c1の発現が低下し、slco4c1の基質であるグアニジノコハク酸の血中濃度が上昇した (図3)。さらに慢性腎不全モデルラットに対し経口吸着炭であるAST-120を投与したところ、ISの血中濃度の低下とともにslco4c1 mRNAの発現が有意に上昇し、グア

ニジノコハク酸 (GSA) の血中濃度が低下した (図 4)。これらより IS は GATA3 の発現増強を介して SLCO4C1 の発現を低下させることで、本来であれば SLCO4C1 により排泄されるべき尿毒症物質の蓄積をも招いてしまうことが示唆された。



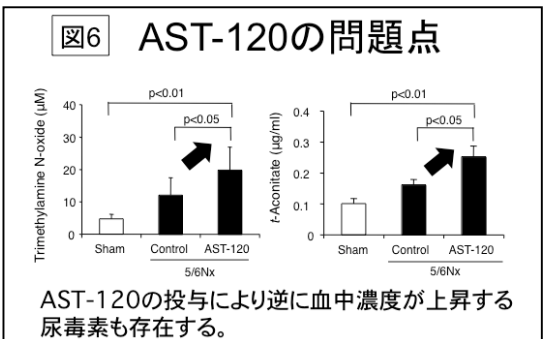
これらの結果は IS が SLCO4C1 の発現低下を介してさらなる尿毒症物質の蓄積を招く、尿毒症物質蓄積の悪性サイクルの原因物質である可能性を初めて明らかにするものであった。またこの機序には IS がもつ GATA 転写因子の発現増強作用が関与することが初めて明らかとなった。これまで申請者らが提唱したスタチンによる SLCO4C1 活性化経路の刺激に加え、AST-120 による IS 除去や GATA 阻害薬により SLCO4C1 抑制経路を遮断することが、SLCO4C1 発現増強による効果的な尿毒症物質除去を可能にすると考えられ (図 5)、新たな CKD 治療戦略となる可能性があると考えられたため論文にて報告した (PlosONE 2013)。



経口吸着炭 AST-120 はこれまで腸管内で尿毒症物質およびその前駆物質を吸着することが主な作用機序と考えられていたが、申請者の研究により、実際は IS 除去による SLCO4C1 発現増加による他の尿毒症物質の変動などの他の機序も存在する可能性が明らかとなった。AST-120 投与による尿毒症物質や代謝性物質の変動についてはこれまでほとんど明らかになっておらず、AST-120 の

薬理作用の全容を解明する必要があると考えられた。

そこで申請者は 5/6 腎摘慢性腎不全モデルラットに AST-120 を投与し、血漿中の代謝物濃度を CE-MS にて網羅的に解析した。解析した物質はアニオン 61 項目、カチオン 85 項目で、このうちアニオン 6 項目とカチオン 17 項目で AST-120 投与により有意に血中濃度が低下していた。この 23 項目のうち、アニオンのインドキシル硫酸と馬尿酸を除く計 21 項目はこれまで AST-120 に関する報告がなく、AST-120 により血中濃度が低下する新規物質であった。さらにこのうち N-acetyl-neuraminic acid, 4-pyridoxate, 4-oxopentanoate, glycine, γ-guanidinobutyrate, N-γ-ethylglutamine, allantoin, cytosine, 5-methylcytosine, imidazole-4-acetate の 10 項目は慢性腎不全モデルで血中濃度が増加し、かつ AST-120 により血中濃度が有意に低下していることから、AST-120 の効果の指標となる腎不全物質として分類できると考えられ、AST-120 による体内動態の変化を推測する上で有用な情報となると考えられた。また Trimethylamine N-oxide や trans-Aconitate など、AST-120 により逆に血中濃度が上昇してしまう尿毒症物質も存在し、AST-120 が必ずしも有益な作用ばかりは示さない可能性が示唆された (図 6)。



今回の研究により AST-120 による治療効果の詳細が明らかになると考えられたため論文にて報告した (Toxins 2012)。AST-120 により吸着される物質は一般的に腸管にて腸内細菌により産生される物質や前駆物質が多く、今回検討したさまざまな物質の腸内細菌の寄与の可能性についても有益な情報となると考えられた。また AST-120 投与により血中濃度が低下した物質は、IS 除去による slco4c1 の発現亢進により尿中排泄が促進された可能性が考えられ、AST-120 の新たな薬理作用の可能性を示唆する結果と考えられた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Akiyama Y, Kikuchi K, Saigusa D et al. (18 人中 1 番目): Indoxyl Sulfate Down-Regulates SLCO4C1 Transporter through Up-Regulation of GATA3. PLoS ONE 8: e66518, 2013 査読あり
DOI: 10.1371/journal.pone.0066518
2. 秋山泰利、阿部高明: 尿毒素の輸送と CKD 腎と骨代謝 26:223-229, 2013 査読なし
3. Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, et al. (12 人中 1 番目): A Metabolomic Approach to Clarifying the Effect of AST-120 on 5/6 Nephrectomized Rats by Capillary Electrophoresis with Mass Spectrometry (CE-MS). Toxins 4: 1309-1322, 2012 査読あり
DOI: 10.3390/toxins4111309
4. Wong C, Akiyama Y, Abe T et al. (6 人中 2 番目): Carrier-mediated transport of quercetin conjugates: Involvement of organic anion transporters and organic anion transporting polypeptides. Biochem. Pharmacol. 84: 564-570, 2012 査読あり
DOI: 10.1016/j.bcp.2012.05.011

[学会発表] (計 1 件)

1. 秋山泰利. A metabolomic approach to clarifying the effect of AST-120 on 5/6 nephrectomized rats by capillary electrophoresis with mass spectrometry (CE-MS). 2012 年アメリカ腎臓学会

[図書] (計 1 件)

1. 秋山泰利、阿部高明: 慢性腎不全の病態トピックス 9 トランスポーター
医学出版 腎不全治療レシピ 111-120, 2013 査読なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 泰利 (AKIYAMA, YASUTOSHI)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師
研究者番号: 70635557

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: