

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860631

研究課題名(和文)慢性腎臓病と臓器連関の病態におけるergothioneine/OCTN1の関与

研究課題名(英文)The role of ergothioneine/OCTN1 in chronic kidney disease

研究代表者

篠崎 康之 (SHINOZAKI, YASUYUKI)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：60706878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性腎臓病と腸管トランスポーターとの関連を、OCTN1およびその基質である食餌由来の抗酸化物質、ergothioneineに着目して検討したものである。CKDモデルマウスの小腸では、管腔側の細胞膜上に局在するOCTN1が減少し、ergothioneineの取り込みが低下していた。Ergothioneineが欠乏しているOCTN1ノックアウトマウスのCKDモデルでは、酸化ストレスが増大し、腎線維化が増悪することが確認された。これらの結果は、慢性腎臓病において腎臓と腸管との間に臓器連関が存在すること、および腎臓-腸管連関がCKDの進展に関与している可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：This study examined the association between chronic kidney disease and intestinal transporter. We focused on organic cation transporter 1 (OCTN1) and its substrate, ergothioneine, which is the antioxidant material derived from diet. OCTN1 expression on the apical side of intestinal cell membrane decreased in chronic kidney disease (CKD) model mice, and the uptake of ergothioneine also decreased. In the OCTN1 knockout mice, which lacked ergothioneine, the increase of oxidative stress and exacerbation of kidney fibrosis were confirmed in CKD model. These results showed the presence of the linkage between CKD and intestinal transporter and this linkage might associate with clinical progress of CKD.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病 臓器連関 トランスポーター 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

本邦での末期腎不全患者数は増加の一途をたどり、2011 年末には 30 万人を超えている。また末期腎不全の前段階である慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)の患者数も同様に増加し続け、2005 年の統計では 1,330 万人にのぼり、成人人口の 12.9%を占めている。維持透析にかかる医療経済的な問題や、ドナー不足といった問題があり、CKD の進展抑制は重要な課題である。一方で、CKD は全身の臓器・組織と関連することが知られており、生命予後に大きく関与しているが、その病態の詳細は不明である。したがって、CKD を、他の臓器障害も含めた全身の病態ととらえた視点からの研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究は CKD の進展過程において、食餌由来の抗酸化物質である ergothioneine(ERGO) および ERGO を腸管から体内に輸送するトランスポーターである organic cation transporter 1 (OCTN1)を介した病態の解明を目指すものである。CKD の進展機序には酸化ストレスの亢進が関与していると推測される。これまでの我々の基礎検討では、腎不全状態では赤血球中の ERGO が低下していることを観察している。この結果から、CKD では腸管で OCTN1 による ERGO の体内への取り込みが低下し、ERGO 欠乏状態になること、それによる全身の酸化ストレスの増大が CKD の進展を招いていると仮説を立てた。本研究は腎臓病の進展機序をトランスポーターの視点から解析するものであり、ERGO-OCTN1 を介した抗酸化作用の解明から CKD 進展の新たな機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、6 週齢マウスの右腎臓を摘出し、左腎臓に虚血再灌流障害を加えたモデルを CKD モデルマウスとして用いた。1)ERGO の腸管粘膜側からの取り込みの検討、2)CKD による腸管の OCTN1 発現の変化の検討、3)ERGO の減少がもたらす酸化ストレスの増大、腎障害への影響についての解析、の 3 つのステップからなる実験計画を立てた。1)ではラジオアイソトープ(RI)を用いた手法により、CKD モデルマウスにおける、腸管 OCTN1 の ERGO の取り込み量の変化を解析する。2)は RT-PCR、Western blot および免疫染色により OCTN1 の発現解析を行う。3)では ERGO が欠乏している OCTN1 ノックアウトマウスを用い、酸化ストレス障害、臓器障害の解析を行う。また、培養細胞を用いた検討で、ERGO の抗酸化作用についても確認を行う。

これら一連の研究により、腎臓と腸管トランスポーターとの連関を介した腎臓病の進展機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ERGO の腸管粘膜側からの取り込みの検討

哺乳類において唯一の、ERGO を体内へ取り込む経路である小腸粘膜の ERGO 吸収能を評価した。マウスの小腸を採取し、上部(口側)と下部に二分し、それぞれを反転させた後に、RI でラベルした ERGO の溶液内に入れ、一定時間取り込ませた後に放射活性を測定する方法(Everted Sac 法)を用いた。CKD モデルマウスの小腸において、ERGO の取り込みが低下していた。RI でラベルしていない十分量の ERGO を同時添加すると、OCTN1 が飽和されることにより、RI でラベルした ERGO の取り込みがコントロールと同程度まで低下することを確認した(図 1)。これらの結果から CKD モデルにおいて小腸粘膜上皮の OCTN1 を介した ERGO の取り込みが低下していると考えられた。

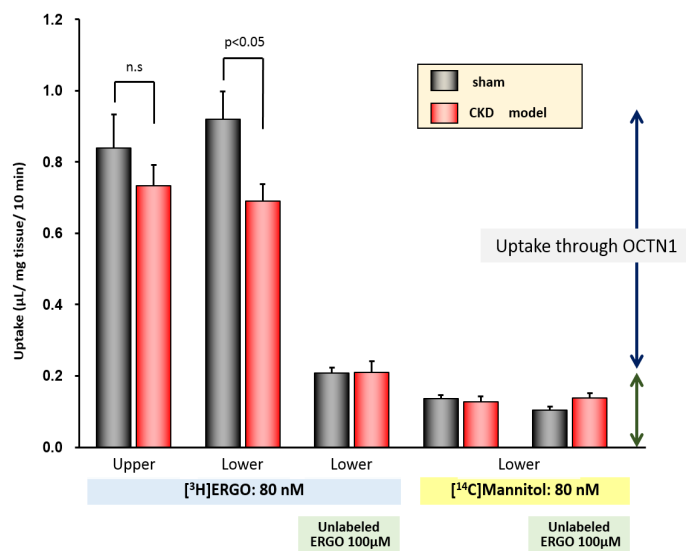


図 1 腸管粘膜の ERGO 取り込み量の変化

(2)CKD による腸管の OCTN1 発現の変化の検討

腸管粘膜からの ERGO の取り込みが低下した機序について検討するために、腸管粘膜の OCTN1 発現について解析した。CKD モデルマウスの小腸を摘出し、腸粘膜を擦り取って採取したサンプルを用いて、OCTN1 の mRNA、蛋白発現をそれぞれ RT-PCR、Western blot で定量解析した。いずれの結果も、コントロールマウス、CKD モデルマウスとの間に差は認めなかった。しかし、免疫染色で OCTN1 の局在を確認すると、コントロールマウスの小腸では主に腸管粘膜の管腔側細胞膜上に OCTN1 の発現が確認されたが、CKD マウスでは同部位に発現している OCTN1 が減少していた(図 2)。以上の結果から、CKD マウスでは腸管粘膜上に局在する OCTN1 が減少することで、ERGO の取り込みが低下すると考えられた。

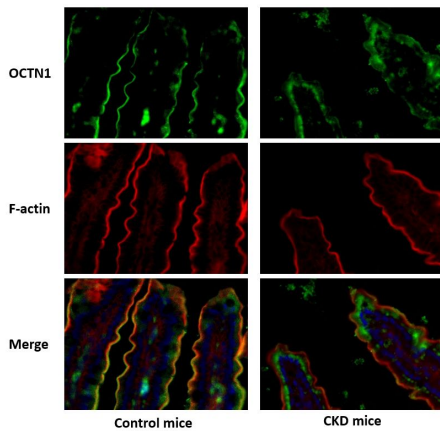


図2 腸管粘膜上での OCTN1 発現の変化

(3) ERGO の減少がもたらす酸化ストレスの増大, 腎障害への影響についての解析

食餌からの ERGO の取り込みが低下した状態が続くと, 体内の ERGO は次第に減少していくと考えられる. 実際に, ヒト CKD 症例の赤血球中の ERGO は, 腎障害の進行とともに減少していることを確認している. 体内の ERGO が減少することが CKD に及ぼす影響を, OCTN1 ノックアウト(KO)マウスを用いて検証した. これまでと同様の CKD モデルを作成し, 腎障害の程度を評価した. KO マウスの CKD モデルはコントロール CKD モデルマウスより血清クレアチニン値が有意に上昇しており, 腎機能低下が大きいことが示された(図 3-1)

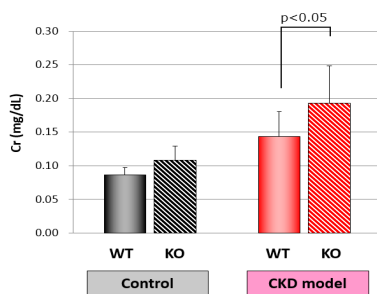


図 3-1 血清クレアチニン値の変化

腎臓の組織を確認すると, CKD の主病態である線維化病変が KO マウスの CKD モデルで増悪していた. Sirius red 染色で評価した線維化面積は増大し, 生化学マーカーである hydroxyproline 量も増加していた(図 3-2).

酸化ストレスについて 4-HNE 染色で評価したところ, KO マウスの CKD モデルで陽性細胞数が増加していた. また, 腎組織中のカルボニルプロテイン量でも同様に KO マウスの CKD モデルで増加していた(図 3-3). この結果から, 抗酸化物質である ERGO を体内に取り込めない OCTN1 ノックアウトマウスは, CKD による酸化ストレスが増大し, 線維化病変が増悪する可能性が示された.

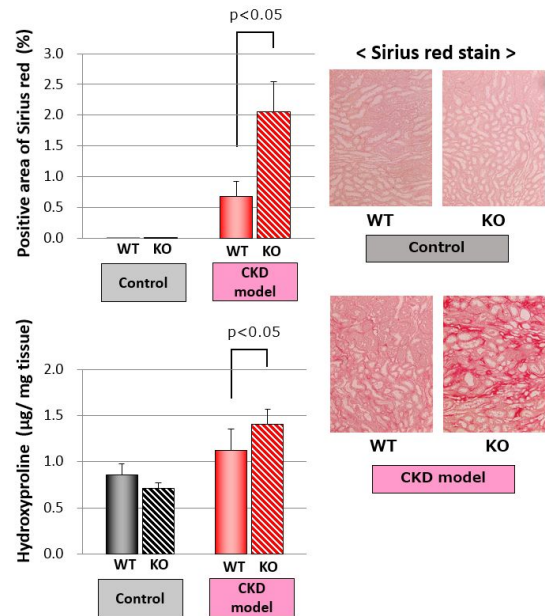


図 3-2 線維化病変の評価

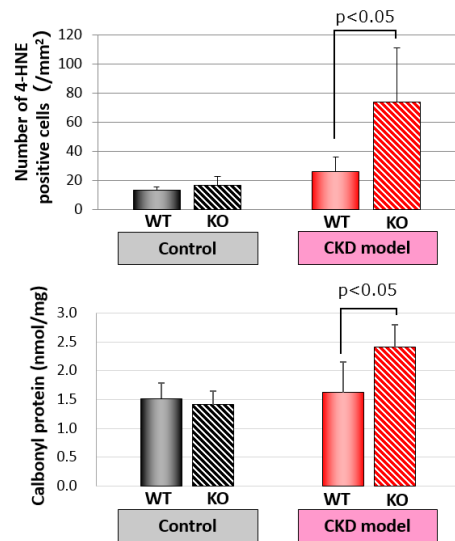


図 3-3 腎組織での酸化ストレスの変化

ERGO の抗酸化作用を確認するために, 尿管上皮培養細胞を用いた検討を行った. 尿毒素の一つであるインドキシル硫酸によって酸化ストレスを誘導し, Flow cytometry で評価した. 酸化ストレスは ERGO を加えることによって容量依存的に減少した(図 3-4).

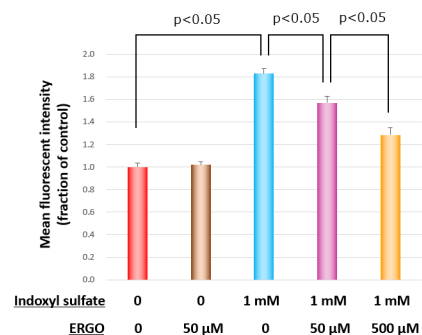


図 3-4 ERGO による抗酸化能の評価

このことから ERGO は CKD の酸化ストレス障害に対して保護的に機能することが示唆された。

(4) まとめ

CKD において、腸管粘膜上への OCTN1 の局在が減少し、ERGO の吸収能が低下すること、および ERGO の欠乏により、酸化ストレスの増大を介した腎線維化病変が増悪することが示された(図 4)。CKD において腸管トランスポーターが変化する腎臓-腸管連関が存在することが確認され、さらにこの臓器連関が CKD の進展に関連している可能性が示された。

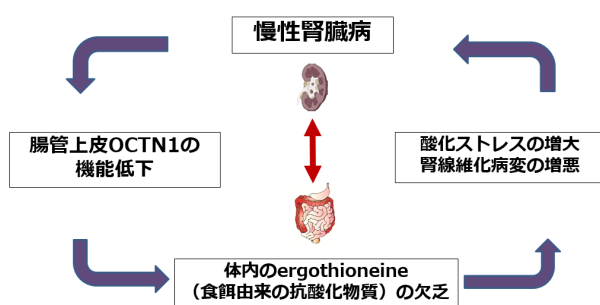


図 4 まとめ

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〕投稿準備中

〔学会発表〕(計 3 件)

Yasuyuki Shinozaki, Kengo Furuichi, Shinji Kitajima, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Norihiko Sakai, Miho Shimizu, Takashi Wada
“The role of ergothioneine/OCTN1 in CKD”
米国腎臓学会 ASN Kidney Week 2015
2015 年 11 月 07 日, San Diego (USA)

篠崎康之, 相良明宏, 北島信治, 岩田恭宜, 坂井宣彦, 清水美保, 古市賢吾, 和田隆志
「慢性腎臓病における腎-腸連関の意義」
第 58 回 日本腎臓学会学術総会
2015 年 06 月 06 日
名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

篠崎康之, 相良明宏, 北島信治, 遠山直志, 岩田恭宜, 坂井宣彦, 清水美保, 古市賢吾, 和田隆志
「腎間質線維化にはたす ergothioneine/OCTN1 の意義」
第 57 回 日本腎臓学会学術総会
2014 年 7 月 5 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
篠崎 康之 (SHINOZAKI YASUYUKI)
金沢大学・医学系・特任助教
研究者番号: 60706878
- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
該当なし