

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09289

研究課題名(和文)慢性腎不全患者の予後を規定する炎症をターゲットとする新しい治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new treatment strategy targeting inflammation for patients with chronic renal failure

研究代表者

坂田 史子 (Sakata, Fumiko)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：20726484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)における慢性炎症は予後不良の危険因子であるが、機序は分かっていない。我々は動物実験(腎不全マウス)や細胞実験で、食塩負荷による高浸透圧の状況をつくることで、臓器炎症が惹起される機序を解明した。腎不全患者では、塩分制限ができていないと、浮腫や心不全を起こしやすい。CKD患者にとって減塩は血圧コントロールをするうえで、重要である。さらに減塩で臓器炎症が抑えられると、心血管系の合併症の軽減、腎不全そのものの進行の抑制が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation, which is often associated with high all-cause and cardiovascular mortality, is prevalent in patients with renal failure; however, the precise mechanisms remain unclear. We studied the effects and mechanisms of high salt loading on tissue and systemic inflammation in CKD mice and in cultured cells. Sodium chloride promoted tissue inflammation via osmotic stimuli in renal failure.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎不全 食塩 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎不全で、炎症を起こす機序は分かっていない

慢性腎臓病にみられる炎症は、心血管病、貧血、筋萎縮などを増悪させる因子であるが機序はよく分かっていない。炎症は慢性腎臓病の予後を規定する因子であり、機序の解明が望まれている。(Blood Purif 19: 143-151, 2001)

(2) 末期腎不全患者の腹膜には、マクロファージ浸潤が有意に認められる

我々は、腹膜透析カテーテル留置時の腹膜検体において、末期腎不全患者の腹膜組織を観察した。結果、腎不全患者は正常腎機能者(腎移植ドナー)と比べてマクロファージ浸潤が有意に増加していることを報告した(Nephrol Dial Transplant 26: 2322, 2011)。つまり、腎不全患者では臓器局所に炎症が起こっていることが確認された。我々は5/6腎摘腎不全モデルに食塩負荷を行うことで、腹壁にマクロファージ浸潤が起きる現象を確認している(図1:平成26年日本腎臓学会で発表)。

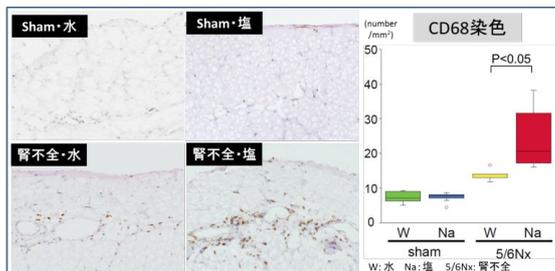


図1 腎不全・塩負荷モデルではマクロファージ浸潤が有意に増加していた

(3) 塩分負荷によって、皮膚にマクロファージ浸潤が起きる

正常ラットに高塩分負荷をすると、腹壁の炎症性サイトカインが増加する(Nephrol Dial Transplant 25:1688,2010)。また、新しい血圧調節システムの提唱として、塩分負荷後のtonicity-responsive enhancer binding protein(TonEBP)の作用が報告されている。TonEBPは、高浸透圧時に細胞に保護的な作用をもたらす転写因子として腎での働きは以前から知られていたが、全身の細胞にも発現していることが判明。正常マウスに塩分負荷をすると、Na蓄積により軟部組織の局所浸透圧が上昇し、マクロファージが浸潤、TonEBPを介しVEGF-Cが分泌され、リンパ管新生を誘導して血圧を低下させると報告された(Nat Med 15:545, 2009)。この報告は塩負荷によるマクロファージ浸潤、TonEBPの関わりを知る上で重要である。

(4) 血液透析患者の筋肉や皮膚にはNa<sup>+</sup>が蓄

積している

CKD患者は正常腎機能者と比べてNaが蓄積しやすい。透析前の筋肉や皮膚には有意にNaが蓄積している事実がNa-23 MRI という方法で報告された(Kidney Int 2014)。このことから、腎不全患者では塩の影響を健常人より受けやすく、塩の毒性について検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

慢性腎臓病(CKD)における慢性炎症は予後不良の危険因子であるが、機序は分かっていない。塩負荷は軟部組織へのNa<sup>+</sup>蓄積となり、局所に高浸透圧刺激を生じ、転写因子であるTonEBPが誘導される。CKDと炎症を結びつけるものとして、我々はこの塩とTonEBPの関係に着目し、塩負荷による高浸透圧下で増加するTonEBPを介して、マクロファージ浸潤が生じ、炎症へと進展する機序を考えた。本研究では、塩負荷により誘導される臓器炎症を検討することで、CKDにおいて慢性炎症が進行する機序を解明する。また、このTonEBPシグナルをターゲットとした、慢性炎症を抑える新たな治療法の可能性を検討していく。

3. 研究の方法

(1) 2つの腎不全モデル(5/6腎摘、アデニン負荷、図2)を用いて、塩負荷の有無により、臓器炎症の違いを評価する。特に、腹壁、大動脈、心臓などにフォーカスを当てて、TonEBP、MCP-1、酸化ストレスの発現を検討する。

(2) CKDにおける塩負荷と炎症との関連を確

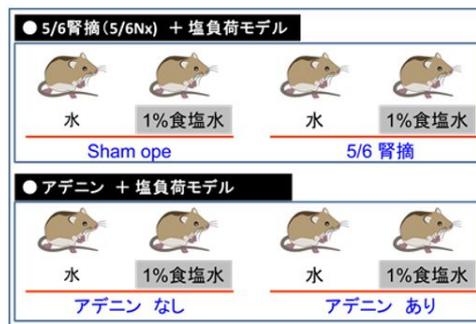


図2 腎不全マウスモデル

認するために、利尿薬であるフロセミド投与により炎症が抑制されるかを評価する。

(3) 上記の機序を解明するため、ヒト中皮細胞(Met5A)、ヒト心筋細胞(HCM)を用いて、塩刺激によりTonEBPを介してMCP-1が誘導されるかを検討する。動物実験と細胞実験で同様の結果が得られるかを確認する。

(4) 確認された機序は、治療薬のターゲットとなりうるか検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 腎不全動物モデルに塩負荷を行い、臓器炎症を評価した。2つの腎不全動物モデルにおいて、塩負荷が腹壁、心臓、大動脈周囲などの局所組織に炎症/マクロファージ浸潤を惹起することを確認した。また、腎不全塩負荷マウスの腹壁組織のNa貯留を調べたところ、sham群と比べて、明らかなNa蓄積が確認された(図3)。このことから組織内の高浸透圧が推測された。動物実験において、塩刺激による高浸透圧下ではTonEBP mRNA、MCP-1 mRNA、蛋白が増加する現象も確認できた(図4)。

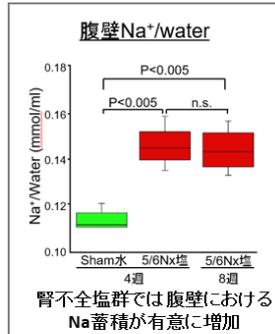


図3 腹壁組織のNa含有

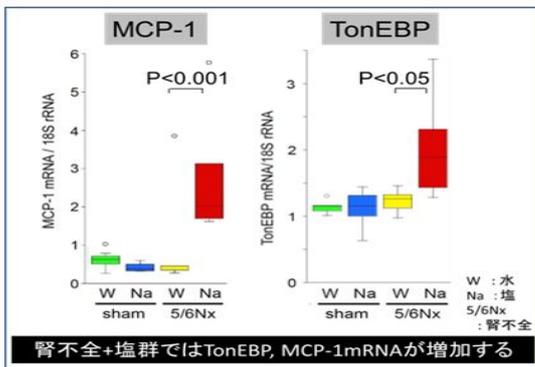


図4 マウス腹膜のmRNA発現

(2) 腎不全塩負荷マウスへの利尿剤投与でNa排泄を行ったところ、炎症の軽減を確認できた(図5)。

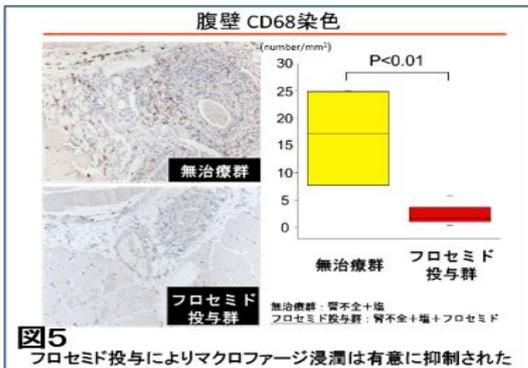


図5 フロセミド投与によりマクロファージ浸潤は有意に抑制された

(3) *in vitro* 実験として、Met5A や HCM に塩刺激を行い、TonEBP、MCP-1 mRNAが増加することを確認した。このMCP-1の増加が、TonEBP依存性であるかを検証するために、TonEBP siRNAによる細胞実験を検討したところ、

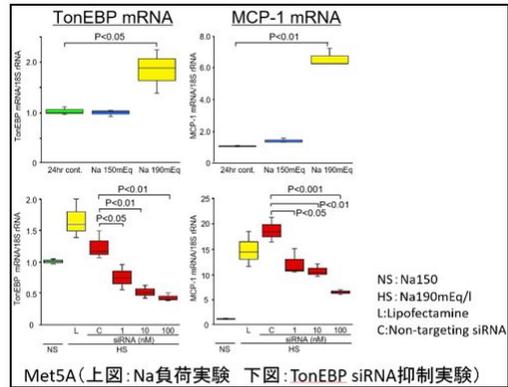


図6 Met5A塩刺激、TonEBP siRNA抑制実験

TonEBP siRNAにより、濃度依存性にMCP-1が抑制されることを確認した(図6)。以上の成果から、腎不全において、高食塩摂取はTonEBPを介して局所のマクロファージ浸潤を誘導する重要な因子であることを示した。腎不全の予後を規定する炎症は、腎不全に加え、塩分負荷に密接に関連することが明らかとなった。この組織内炎症誘導に、TonEBP-MCP-1 pathwayが関与していることを示した。

#### 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1件)

Fumiko Sakata, Yasuhiko Ito, Masashi Mizuno, Akiho Sawai, Yasuhiro Suzuki, Takako Tomita, Mitsuhiro Tawada, Akio Tanaka, Akiyoshi Hirayama, Akihiro Sagara, Takashi Wada, Shoichi Maruyama, Tomoyoshi Soga, Seiichi Matsuo, Enyu Imai & Yoshifumi Takei, Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice, *Laboratory Investigation* 査読有 (2017) 97, 432-446

〔学会発表〕(計4件)

坂田 史子, 伊藤 恭彦, 多和田 光洋, 富田 貴子, 鈴木 康弘, 水野 正司, 丸山 彰一, 松尾 清一, 腎不全マウスにおいて食塩負荷は, Tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP) -MCP-1を介し炎症を惹起する, 第59回日本腎臓学会学術総会, 2016/6/19, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

伊藤 恭彦, 坂田 史子, 鈴木 康弘, 水野 正司, 透析患者の炎症 ~病態・原因・対策~, 第61回日本透析医学会学術総会・集会, 2016/6/12, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル, 大阪府

Fumiko Sakata, Yasuhiko Ito, Masashi Mizuno, Yasuhiro Suzuki, Takeshi Terabayashi, Takako Tomita, Mitsuhiro

Tawada, Shoichi Maruyama, Enyu Imai, Yoshifumi Takei, Seiichi Matsuo  
S,odium Chloride Promotes Tissue Inflammation via Osmotic Stimuli in Subtotal Nephrectomized Mice. 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2015/11/7, San Diego, USA.

坂田 史子、伊藤 恭彦、狩谷 哲芳、多和田 光洋、富田 貴子、寺林 武、鈴木 康弘、水野 正司、松尾 清一、腎不全マウスにおいて食塩負荷は、浸透圧刺激によってMCP-1, sgk-1を誘導し炎症を惹起する、第58回日本腎臓学会学術総会、2015/6/6、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市

〔図書〕(計1件)

坂田史子・伊藤恭彦、腎不全時における塩分摂取と炎症の関連、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、263巻6号 TOPICS、2017年

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

坂田 史子 (SAKATA, Fumiko)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：20726484

### (2)研究分担者

伊藤 恭彦 (ITO, Yasuhiko)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60402632

水野 正司 (MIZUNO, Masashi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：20303638

鈴木 康弘 (SUZUKI, Yasuhiro)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師  
研究者番号：20584676