

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19590961

研究課題名（和文）

蛋白結合率の高いアニオン型尿毒症物質を除去するハイブリッド型人工腎臓の開発

研究課題名（英文）

Development of hybrid kidney for removal of protein-bound anionic uremic toxins

研究代表者

鶴岡 秀一（TSURUOKA SHUICHI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：50285798

研究成果の概要（和文）：インドキシル硫酸（IS）などアニオン型尿毒症物質を基質とするヒト有機アニオントランスポーターを導入したヒト由来培養尿細管細胞を、研究者らが今までに開発してきたハイブリッド型人工腎臓に培養し、その安全性・有効性を検討した。また、これらのアニオン型尿毒症性物質が血管平滑筋細胞の増殖を促進することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed hybrid kidney with renal cell over-expressed human organic anion transporters. We found that this system can selectively remove protein-bound uremic toxins, such as indoxyl sulfate, in animal model of chronic renal failure. We also found that some protein-bound uremic toxins directly stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎不全、バイオ人工臓器、尿毒症性物質、有機アニオン輸送体

1. 研究開始当初の背景

透析療法の進歩により末期腎不全患者の予後は以前に比して改善してきたが、未だ非腎不全患者に比べ格段に不良である。これは、現在の透析治療がまだ不十分であることを示唆している。一方、溶質サイズが透析膜の孔径より大きいために現行の透析療法では除去できないような蛋白結合型尿毒症性物質が多数存在する。末期腎不全患者では透析療法を行っているにもかかわらず、これらの尿毒症性物質が体内に蓄積しつづける。更にこの蓄積が、腎臓のみならず心血管系など多くの臓器に悪

影響を与えている。このため、生体に必要な蛋白を除去することなく、かつこれらの蛋白結合型尿毒症性物質をも選択的に排泄できる血液浄化システムの開発が、今後の腎不全治療にとって必要とされている。このような尿毒症性物質には、インドキシル硫酸（IS）、3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate（CMPF）、p-cresyl sulphate などアニオンに荷電したものがほとんどである。

IS は近位尿細管に発現する有機アニオントランスポーター（OAT）を介して尿中へ排泄される。我々も IS が血管平滑筋

細胞に発現する OAT3 を介して培養血管平滑筋細胞の増殖を直接的に促進させること (Yamamoto, Tsuruoka et al. *Kidney Int* 2006) を明らかにしている。これらのことは、IS が直接的に腎不全患者の動脈硬化・血管イベントの発生に関与することを示すとともに、血液中からの IS 除去が血管イベント抑制のための治療標的となることをも示す。

一方申請者はこれまでに、薬物輸送体の一つである多剤耐性蛋白 (MDR) -1 を高発現させた培養尿細管細胞を作成し、これを中空糸 (ホロファイバー) 型モジュール外側膜表面に 3 次元培養が可能であることを報告し、これをハイブリッド型人工腎臓と称した。更に MDR-1 基質であるジゴキシン中毒イヌモデルを作成し、体外血液循環を介してこのシステムを装着することによって、ジゴキシン中毒の選択的な治療が可能であることを報告した (Tsuruoka et al. *Kidney Int* 1999, 2002, *NDT* 2004)。このシステムは用途に合わせて細胞を変えることにより様々な溶質の血液中からの選択的除去が可能である。

2. 研究の目的

そこで本研究ではこれまでの研究を進展させ、OAT 過剰発現培養尿細管細胞を用いて、慢性腎不全イヌモデルの血中から OAT3 基質である IS を選択的に除去可能か否かを明らかにすることを第一の目的とした。

また IS 以外の尿毒症性物質も血管平滑筋細胞増殖刺激効果があるのか否か、さらにこれを抑制する薬物の探索も目的とした。

3. 研究の方法

(1) OAT 発現細胞の調整

近位尿細管由来初代培養細胞を SV40 感染により不死化させ、ヒト OAT-1、-3 -4 遺伝子を含む発現ベクターを導入。薬剤耐性マーカーを指標に、OATs 安定高発現細胞をクローニングした。得られた細胞は、Transwell 上に培養し、アイソトープラベルした IS、PAH の一方向性経上皮輸送能を測定することで機能評価を行った。さらに我々が、これまで開発してきたハイブリッド型人工腎臓システム (前図参照) に OAT-3 細胞を大量、単層培養する。また、最近申請者が報告したように、血漿と接触可能な細胞数を増やし、かつコストを安くするために市販の血液透析用中空糸モジュール (膜面積 0.6m²) を転用する。

(2) OAT 導入細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓における尿毒症性物質の In vitro

クリアランスの測定

OAT-3 発現細胞をシステム内に培養開始し、透析膜上にリークがなくなったのを確認するために (通常 7-10 日後)、循環する培養液にインドキシル硫酸、CMPF、インドール酢酸、Guadinoacetic acid などのアニオン型尿毒素、更にリークの指標としてイヌリン、細胞 viability の指標としてパラアミノ馬尿酸を添加し、これら溶質の除去能を in vitro において評価する。

(3) OAT 導入細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓における正常、慢性腎不全イヌを用いた性能評価

正常および慢性腎不全イヌに対して、全身麻酔下において大腿動脈にカニューレクションを行い、動脈血を体外へ導く。血漿交換用血漿分離カラムを用いて血漿を分離し、血漿吸着の要領で上記システム内へ血漿を導入する。ここで溶質除去を行ったのち静脈ラインを介して体内へ戻す。血中からの IS 除去能・安全性も評価する。

(4) IS などアニオン型尿毒症性物質の血管平滑筋細胞増殖能への影響の検討

ラット大動脈由来の血管平滑筋初代培養細胞を用いて、IS、CMPF、インドール酢酸、Guadinoacetic acid を添加し 24 時間時点で 3H-チミジン取り込み能および WST-1 アッセイを用いて細胞増殖能を測定し、溶媒群と比較する。

4. 研究成果

(1) OAT 発現細胞の調整

ヒトヒト OAT-1、-3 -4 遺伝子を高発現した培養尿細管上皮細胞をクローニングした。この細胞の IS 輸送能は 27000omol/mg. prot /hr ととても高く、Km 値は 250 μM であった。またこの輸送は CMPF、P-クレゾール硫酸添加により有意に抑制された。

(2) OAT 導入細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓における尿毒症性物質の In vitro クリアランスの測定

この細胞を我々のハイブリッド型人工腎臓に培養することに成功した。イヌリン輸送のない状態における IS の in vitro clearance は、OAT 発現細胞によりコントロール細胞の平均 6 倍と有意に上昇した。

(3) OAT 導入細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓における正常、慢性腎不全イヌを用いた性能評価

慢性腎不全イヌにおける IS 濃度は正常イヌより有意に上昇していた。4 時間の

ハイブリッド人工腎臓による治療により血中IS濃度は 0.53 ± 0.06 to 0.16 ± 0.02 mg/dl へと有意に低下した。軽度の血小板減少がみられたが、そのほかには大きな有害事象はなく忍容性はおおむね良好であった。

(4) IS などアニオン型尿毒症性物質の血管平滑筋細胞増殖能への影響の検討

IS は血管平滑筋細胞増殖能を有意に増加させた。またこれはアトルバスタチン (250mg) 前処置により有意に抑制された。またP-クレゾール硫酸、CMPF 添加により有意な増殖刺激作用も確認した。

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 10 件)

- ① Kaneda T, Tsuruoka S, Fujimura A. Statins inhibited erythropoietin-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 査読有 649:38-43, 2010.
- ② Purkerson JM, Tsuruoka S, 以下 3 名省略。Recovery from acidosis: changes in anion exchanger distribution and expression are major components of reversible adaptation to metabolic acidosis in the cortical collecting duct. *Kidney Int*. 査読有 78:993-1005, 2010.
- ③ Maeda A, Tsuruoka S, 以下 4 名省略。Drug interaction between celecoxib and methotrexate in organic anion transporter 3-transfected renal cells and in rats in vivo. *Eur J Pharmacol*. 査読有 640:168-71, 2010.
- ④ Ioka T, Tsuruoka S 以下 5 名省略。Hypertension Induced by Erythropoietin Has a Correlation With Truncated Erythropoietin Receptor mRNA in Endothelial Progenitor Cells of Hemodialysis Patients. *Clin Pharmacol Ther*. 査読有 86(2):154-9. 2009.
- ⑤ Muto S, Tsuruoka S 以下 6 名省略。Basolateral Na(+)/H(+) exchange maintains potassium secretion during diminished sodium transport in the rabbit cortical collecting duct. *Kidney Int*. 査読有 75(1):25-30, 2009.
- ⑥ Tsuruoka S, Swenson ER, Fujimura A, Imai M. Mechanism of Cd-induced inhibition of Na-glucose cotransporter in rabbit proximal tubule cells: Roles of luminal pH and membrane-bound carbonic

anhydrase. *Nephron Physiol*. 査読有 110(2):p11-20, 2008.

- ⑦ Araki N, Tsuruoka S, 以下 8 名省略。Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: in vitro screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity. *Xenobiotica*. 査読有 38:1355-64, 2008.
- ⑧ Maeda A, Tsuruoka S, 以下 5 名省略。Evaluation of the interaction between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and methotrexate using human organic anion transporter 3-transfected cells. *Eur J Pharmacol*. 査読有 31:596:166-72, 2008.
- ⑨ Tsuruoka S, Kaneda T, Maeda A, Ioka T, Fujimura A. Dosing time-dependent variation of bone resorption by cyclosporin A in rats' femurs. *Eur J Pharmacol* 査読有 564: 226-231, 2007
- ⑩ Taniguchi J, Tsuruoka S, Mizuno A, Sato J, Fujimura A, Suzuki M. TRPV4 as a flow sensor in flow-dependent K⁺ secretion from the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 査読有 292:F667-F673, 2007

[学会発表] (計 9 件)

- ① Maeda A, Tsuruoka S, 以下 6 名省略。Drug interaction between celecoxib and methotrexate in organic anion transporter 3-transfected renal cells and in rats. American Society of Nephrology's 43rd Annual Renal Week, Denver CO, USA, Nov 16-19, 2010.
- ② Tsuruoka S, Omasa T, Enosawa S, Yamagata K. Future blood purification system for AKI with hepatic failure. International Session of The 55th Congress of Japanese Society for Dialysis Therapy, Kobe, Hyogo, June 5-7, 2010
- ③ Tsuruoka S, Kaneko S, Yamagata K, Fujimura A. Dosing Time-Dependent Variation of Bone Resorption by Cyclosporin A in Rats Femurs. American Society of Nephrology's 42nd Annual Renal Week, San Diego CA, USA, Oct 29-Nov. 1, 2009.
- ④ Maeda A, Tsuruoka S, 以下 4 名省略。Evaluation of the interaction between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and methotrexate using human organic anion transporter 3-transfected cells. American Society of Nephrology's 41st Annual Renal Week, Philadelphia, PA, USA, Nov 3-8, 2008.

- ⑤Kaneda A, Tsuruoka S, Fujimura A. Statin suppresses erythropoietin (EPO)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells in vitro. American Society of Nephrology's 41st Annual Renal Week, Philadelphia, PA, USA, Nov 3-8, 2008.
- ⑥Purkerson JM, Tsuruoka S, Schwartz GJ. Plasticity of Intercalated cells in the Cortical Collecting Duct: Amelioration of Acidosis Restores the Phenotype of beta-intercalated cells. American Society of Nephrology's 41st Annual Renal Week, Philadelphia, PA, USA, Nov 3-8, 2008.
- ⑦金田多絵、鶴岡秀一、藤村昭夫。スタチンはエリスロポエチンによる培養血管平滑筋細胞増殖を抑制する。第51回日本腎臓学会学術総会，福岡，2008年5月30～6月1日。
- ⑧Tsuruoka S, Swenson ER, Fujimura A, Imai M. Mechanism of cadmium(Cd)-induced Na-glucose cotransporter inhibition in isolated perfused rabbit proximal tubule cells: Roles of luminal pH and luminal membrane-bound carbonic anhydrase (CA). American Society of Nephrology's 40th Annual Renal Week, San Francisco CA, USA, Nov 3-5, 2007.
- ⑨Ioka, T., Tsuruoka, S., 以下7名省略。Erythropoietin-related cGMP production inversely correlated with the ratio of EPO receptor subtype mRNA in circulating endothelial progenitor cells of HD patients and HUVECs. American Society of Nephrology's 40th Annual Renal Week, San Francisco CA, USA, Nov 3-5, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴岡 秀一 (TSURUOKA SHUICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：50285798

(2) 研究分担者

藤村 昭夫 (FUJIMURA AKIO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90156901