

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390211

研究課題名(和文)カルボニルストレスをターゲットとした病態特異的なバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Exploration of specific biomarkers for carbonyl stress inducible disease.

## 研究代表者

伊藤 貞嘉 (Ito, Sadayoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40271613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：Dahl食塩感受性高血圧ラットへのメチルグリオキサール投与は血圧上昇、腎組織障害ならびに心臓組織線維化が認められ、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の同時投与により障害が抑制されたことから、カルボニルストレスによる血圧上昇・組織障害機序の一部にレニンアンジオテンシン系(RAS)の関与が明らかとなった。RAS構成因子である(プロ)レニン受容体[(P)RR]による免疫応答への影響について検討したところ、ヒト末梢血単核細胞において(P)RRはERK経路を介してCOX-2発現やIL-6分泌に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Administration of methylglyoxal (MG) to Dahl salt sensitive rats increased blood pressure, renal injury and cardiac-fibrosis. Simultaneously treatment with angiotensin II (AngII) receptor blocker (ARB) ameliorated MG induced blood pressure increase, renal injury and cardiac injury. These results indicate that renin angiotensin system (RAS) partially contribute hypertension and organ injury induced by carbonyl stress. Since RAS is involved in inflammation, we evaluated the contribution of (pro)renin receptor [(P)RR] to inflammatory reaction. Renin stimulation induced ERK phosphorylation, COX-2 mRNA expression and IL-6 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. (P)RR siRNA treatment ameliorated ERK phosphorylation induced by renin stimulation in human leukemic monocyte lymphoma cells. These results indicates that (P)RR could contribute inflammatory response in human inflammatory cells.

研究分野：腎臓生理学

キーワード：カルボニルストレス、メチルグリオキサール、高血圧、腎障害、レニンアンジオテンシン系、(プロ)レニン受容体、免疫応答、ERK

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)とは原疾患を問わず、腎機能(推定糸球体濾過量, eGFR)の低下もしくは尿所見(尿タンパク)が認められる状態にあることを指す。日本国内では成人のおよそ8人に1人が該当し、患者数1300万人ほどと推定される、非常に患者数の多い病状である。原疾患を問わず、単に腎機能・腎病態のみに依存して患者をCKDと判定することの重要なポイントの1つとして、CKD患者は単に末期腎不全のリスクが上昇するだけでなく、脳心血管イベントによる死亡ならびに全死亡リスクの上昇が報告されていることである。即ち、CKD患者の腎臓保護戦略は、単に腎臓を保護するのみならず、生命そのものを守ることにつながることから、非常に重要であるといえる。

## 2. 研究の目的

解糖系副生成物であるメチルグリオキサール(MG)、グリオキサール(GO)、3-デオキシグルコソールなどは非常に化学的活性が強い物質であり、糖化最終産物(AGE)の前駆物質でもあるのみならず、タンパク質のリジン残基、アルギニン残基の側鎖を化学的に修飾して不活性化させる作用も有しており、カルボニルストレスと総称される。カルボニルストレスは、細胞障害ならびに組織障害を引き起こすことが報告されており、糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症発症にも深く関与すると報告されている。

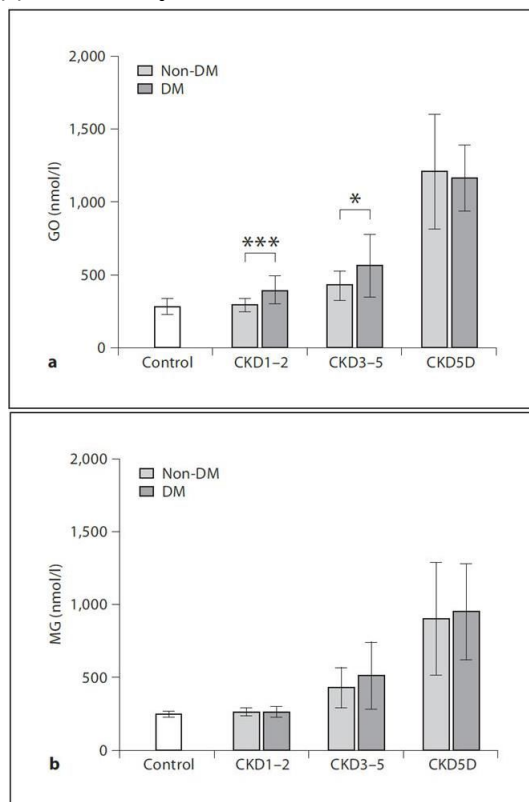


Fig. 1  
健常者(Non-DM)ならびに糖尿病患者(DM)のCKD重症度別血中グリオキサール(a)ならびにメチルグリオキサール(b)濃度

我々はこれまでの検討において、CKDステージの上昇に依存して血漿中MGならびにGO濃度が上昇すること(Fig. 1)を報告している(Nakayama K, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S., Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients, *Am J Nephrol.* 2008;28(6):871-8. doi: 10.1159/000139653).

また我々が行った動物を用いた検討において、Sprague-Dawley (SD)ラットに高食塩飼料給餌とMG溶液飲水負荷を同時に行った際には、高食塩飼料給餌およびMG溶液飲水負荷ともに単独では見られなかった収縮期血圧が上昇する(Fig. 2)ことを報告しており、カルボニルストレスが高血圧発症に関わることを明らかとしている(Guo Q, Mori T, Jiang Y, Hu C, Osaki Y, Yoneki Y, Sun Y, Hosoya T, Kawamata A, Ogawa S, Nakayama M, Miyata T, Ito S., Methylglyoxal contributes to the development of insulin resistance and salt sensitivity in Sprague-Dawley rats., *J Hypertens.* 2009 Aug;27(8):1664-71. doi: 10.1097/HJH.0b013e32832c419a.).

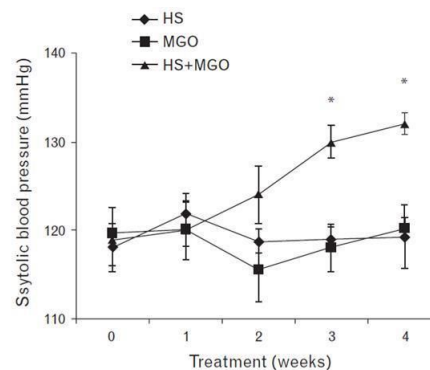


Fig. 2  
SDラットに高食塩飼料給餌(HS)、1% MG飲水負荷(MGO)、高食塩飼料給餌+1% MG飲水負荷(HS+MGO)した際の収縮期血圧の変動。

これらの結果より、カルボニルストレスはCKDの病態や、高血圧をはじめとする病態の発症に関与することが示唆されている。一方で、これまでにカルボニルストレスによる病態発症のメカニズムや、カルボニルストレスをターゲットとした治療薬の開発については十分に検討されているとは言えない状況である。

そこで本研究ではカルボニルストレスによる病態発症メカニズムを明らかにすることにより、カルボニルストレスに起因する疾病予防ならびに治療戦略につながる知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

Dahl 食塩感受性高血圧(DahlS)ラットに1%MGを飲水投与し、12週間の飼育を行った。コントロール群には市水を与えた。試験期間中に収縮期血圧ならびに尿中アルブミン排泄量を測定し、飼育終了時に腎臓・心臓を採取して組織学的に障害を評価した。また、別

のDahlSラットに1%MG溶液飲水負荷ならびにアンジオテンシンII受容体阻害薬(ARB)を経口投与した。コントロール群には1%MG溶液を飲水負荷した。試験期間中に収縮期血圧ならびに尿中アルブミン排泄量を測定し、飼育終了時に腎臓・心臓を採取して組織学的に障害を評価した。

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)をレニンで刺激し、ERKリン酸化、COX2 mRNA発現量、IL-6分泌量を評価した。また、ヒト白血病細胞株であるU937細胞の(プロ)レニン受容体[(P)RR]をsiRNAによりロックダウンし、レニン刺激した際のERKリン酸化について評価した。

#### 4. 研究成果

1%MG溶液の飲水負荷はDahlSラットの収縮期血圧(Fig. 3)ならびに尿中アルブミン排泄量(Fig. 4)を有意に上昇させた。

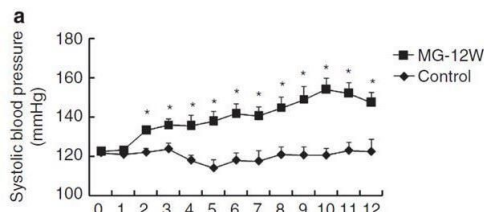


Fig. 3 DahlSラットに1%MG飲水負荷(MGO)を行った。市水を与えたコントロール群と比較して有意な収縮期血圧の上昇が認められた。

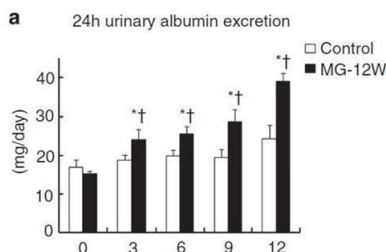


Fig. 4 DahlSラットに1%MG飲水負荷(MGO)を行った。市水を与えたコントロール群と比較して有意な尿中アルブミン排泄量の増加が認められた。

腎臓ならびに心臓組織障害を組織学的・免疫組織化学的ならびに生化学的に評価したところ、MG投与により腎臓では糸球体硬化度(GSI)、尿細管障害マーカーであるオステオポンチン(OPN)陽性領域、マクロファージ浸潤を示すED1陽性細胞数、AGEの一種であるCEL陽性領域、酸化ストレスマーカーである8-OHdG陽性領域、活性酸素種を産生するNADPH oxidase活性、心臓ではコラーゲン陽性領域ならびに血管周囲繊維化スコアの有意な上昇が認められた(Table 1)。

Table 1. MG投与時の心腎組織評価

Group	Control	MG-12W
GSI	1.86±0.06	2.08±0.07*
OPN-positive area (% of cortex and outer medulla)	0.50±0.10	1.49±0.12*
ED-1 in glomerulus (cells per glomerulus)	0.55±0.09	1.34±0.15*
ED-1 in interstitial area (cells per ×400 field)	1.47±0.25	3.37±0.17*
CEL-positive area (% of cortex and outer medulla)	2.8±0.5	17.7±5.5*
8-OHdG-positive area (% of cortex and outer medulla)	2.91±0.12	4.10±0.22*
NADPH oxidase activity (c.p.m. per 200mg protein)	86±3	121±10*
Total collagen content (%)	3.5±0.3	6.9±0.6*
Perivascular fibrosis score	1.8±0.1	2.5±0.2*

一方、MG飲水負荷DahlSラットへのARBの投与は収縮期血圧(Fig. 5)ならびに尿中アルブミン排泄量(Fig. 6)を低下させた。腎臓ならびに心臓組織障害を組織学的・免疫組織化学的ならびに生化学的に評価したところ、ARB投与は、腎臓では糸球体硬化度(GSI)、尿細管障害マーカーであるオステオポンチン(OPN)陽性領域、マクロファージ浸潤を示すED1陽性細胞数、AGEの一種であるCEL陽性領域、酸化ストレスマーカーである8-OHdG陽性領域、活性酸素種を産生するNADPH oxidase活性、心臓ではコラーゲン陽性領域ならびに血管周囲繊維化スコアを有意に低下させた(Table 2)。

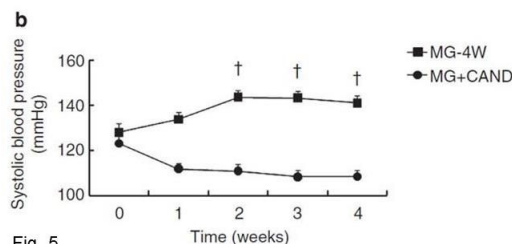


Fig. 5 DahlSラットに1%MG飲水負荷(MGO)を行った。ARB(CAND)投与群では有意な収縮期血圧の低下が認められた。

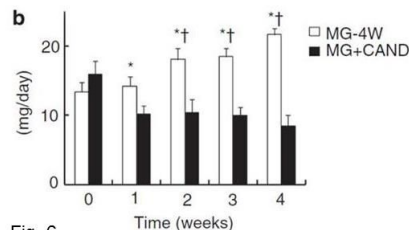


Fig. 6 DahlSラットに1%MG飲水負荷(MGO)を行った。ARB(CAND)投与群では有意な尿中アルブミン排泄量の低下が認められた。

Table 2. MGならびにARB投与時の心腎組織評価

Group	MG-4W	MG+CAND
GSI	1.69±0.05	1.35±0.03†
OPN-positive area (% of cortex and outer medulla)	1.18±0.28	0.36±0.08†
ED-1 in glomerulus (cells per glomerulus)	1.26±0.09	0.97±0.09†
ED-1 in interstitial area (cells per ×400 field)	2.15±0.06	1.16±0.13†
CEL-positive area (% of cortex and outer medulla)	7.1±0.9	2.8±0.3†
8-OHdG-positive area (% of cortex and outer medulla)	2.10±0.25	1.17±0.21†
NADPH oxidase activity (c.p.m. per 200mg protein)	143±6	124±4†
Total collagen content (%)	4.4±0.4	1.4±0.1†
Perivascular fibrosis score	1.7±0.1	1.2±0.2†

以上の結果より、カルボニルストレスの投与は酸化ストレス産生の上昇、炎症の誘導を介して腎臓ならびに心臓組織障害ならびに高血圧を誘導し、レニンアンジオテンシン系(RAS)の阻害によりこれらの作用が減弱される可能性が示唆された(Chen X, Mori T, Guo Q, Hu C, Ohsaki Y, Yoneki Y, Zhu W, Jiang Y, Endo S, Nakayama K, Ogawa S, Nakayama M, Miyata T, Ito S., Carbonyl stress induces hypertension and cardio-renal vascular injury in Dahl salt-sensitive rats., Hypertens Res. 2013 Apr;36(4):361-7. doi: 10.1038/hr.2012.204.)。

次に、カルボニルストレスにより誘導される炎症がRAS系の阻害により抑制されたこ

とから、RAS系と炎症誘導の関連について詳細に検討することとした。

PBMCをレニン刺激したところ有意なERKの活性化(Fig. 7)が認められた。これは(P)RR siRNA処置により抑制されたことから、レニンの(P)RR受容体を介したシグナル伝達経路を介したものであることが示唆された。

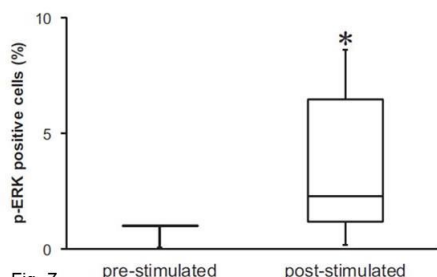


Fig. 7 レニン刺激はPBMCにおいてERKを活性化させた。

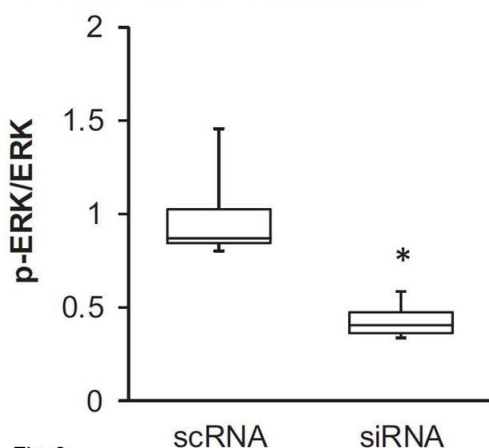


Fig. 8 (P)RR siRNAはレニン刺激に誘導されるERK活性化を抑制した。

さらに、レニン刺激はPBMCにおいてERK経路依存的にCOX2 mRNA発現を上昇させ(Fig. 9)、IL-6分泌を促進させた(Fig. 10)。

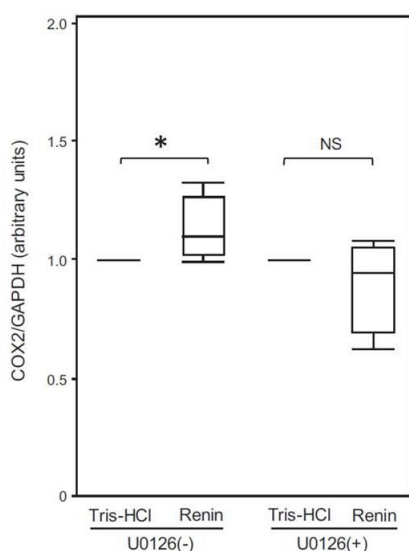


Fig. 9 レニン刺激はPBMCのCOX2発現を誘導し、これはERK阻害薬(U0126)により抑制された。

これらの結果より、(P)RRはヒト免疫細胞において免疫応答に関与していることが示唆された(Narumi K, Hirose T, Sato E, Mori T,

Kisu K, Ishikawa M, Totsune K, Ishii T, Ichihara A, Nguyen G, Sato H, Ito S., A functional (pro)renin receptor is expressed in human lymphocytes and monocytes., *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 Mar 1;308(5):F487-99. doi: 10.1152/ajprenal.00206.2014.

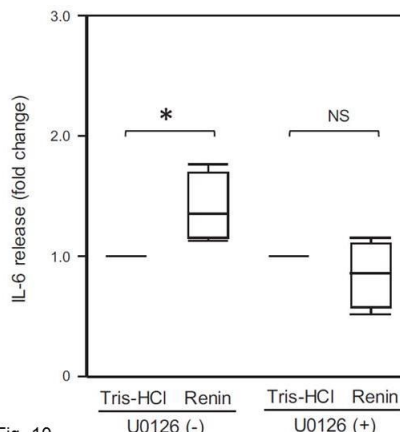


Fig. 10 レニン刺激はPBMCのIL-6分泌を誘導し、これはERK阻害薬(U0126)により抑制された。

## 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5件)

1. Kaori Narumi, Takuo Hirose, Emiko Sato, Takefumi Mori, Kiyomi Kisu, Mayuko Ishikawa, Kazuhito Totsune, Tomonori Ishii, Atsuhiro Ichihara, Genevieve Nguyen, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito. A functional (pro)renin receptor is expressed in human lymphocytes and monocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 Mar 1;308(5):F487-99,doi:10.1152/ajprenal.00206.2014. (査読有)
2. Rong Rong, Osamu Ito, Nobuyoshi Mori, Yoshikazu Muroya, Yuma Tamura, Takefumi Mori, Sadayoshi Ito, Kazuhiro Takahashi, Kazuhito Totsune, Masahiro Kohzuki. Expression of (pro)renin receptor and its upregulation by high salt intake in the rat nephron. *Peptides.* 2015 Jan;63:156-62.doi:10.1016/j.peptides.2014.12.007. (査読有)
3. Takefumi Mori, Makiko Chida, Ikuko Oba, Kenji Koizumi, Masahide Furusho, Mizuho Tanno, Eri Naganuma, Sadayoshi Ito. Diurnal variations of blood glucose by continuous blood glucose monitoring in peritoneal dialysis patients with diabetes. *Adv Perit Dial.* 2014;30:54-9. (査読有)
4. Susumu Ogawa, Junko Takiguchi, Kazuhiro Nako, Masashi Okamura,



Takuya Sakamoto, Shigeru Kabayama, Takefumi Mori, Yoshitaka Kinouchi, Sadayoshi Ito.

Elucidation of the etiology and characteristics of pink urine in young healthy subjects.

Clin Exp Nephrol. 2014 Dec 5. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s10157-014-1066-y (査読有)

5. Xiangang Chen, Takefumi Mori, Qi Guo, Chunyan Hu, Yusuke Ohsaki, Yoshimi Yoneki, Wanjun Zhu, Yue Jiang, Satoshi Endo, Keisuke Nakayama, Susumu Ogawa, Masaaki Nakayama, Toshio Miyata, Sadayoshi Ito.

Carbonyl stress induces hypertension and cardio-renal vascular injury in Dahl salt sensitive rats.

Hypertens Res. 2013 Apr;36(4):361-7. doi: 10.1038/hr.2012.204. (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 大場郁子、森建文、大崎雄介、高橋知香、伊藤貞嘉  
ブドウ糖分解産物による腹膜傷害と腹膜中皮細胞の移植の検討  
第 5 回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会, 2015 年 3 月 21 日、都市センターホテル(東京)(口演)
2. 大場郁子、森建文、植木有理子、高橋知香、廣瀬卓男、小泉賢治、千田真貴子、倉澤菜穂、永沼絵里、伊藤貞嘉  
腹膜透析排液における可溶性(プロ)レニン受容体のバイオマーカーとしての意義  
第 20 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会, 2014 年 9 月 6 日、山形国際ホテル(山形)(口演)
3. 大場郁子、森建文、大崎雄介、宮田敏男、伊藤貞嘉  
腹膜透析における Glyoxalase 1 を介した腹膜保護戦略  
第 59 回日本透析医学会学術集会・総会, 2014 年 6 月 13 日、神戸国際会議場(神戸)(口演)
4. Ikuko Oba, Takefumi Mori, Chika Takahashi, Yusuke Ohsaki, Emiko Sato, Kenji Koizumi, Masahide Furusho, Makiko Chida, Eri Naganuma and Sadayoshi Ito.  
Soluble form of (pro)renin receptor is excreted from mesothelial cells to peritoneal dialysis effluent of peritoneal dialysis patients.  
EB2014, 2014/4/30, San Diego, CA (USA)(poster)
5. 大場郁子、森建文、高橋知香、大崎雄介、鳴海かほり、佐藤恵美子、千田真貴子、小泉賢治、古庄正英、丹野瑞穂、永沼絵理、伊藤貞嘉

腹膜透析排液における(プロ)レニン受容体の検討

第 4 回腎不全研究会, 2013 年 12 月 14 日、全社協灘尾ホール(東京)

6. 大場郁子、森建文、大崎雄介、佐藤恵美子、中道淑美、福土武、宮田敏男、伊藤貞嘉  
腹膜透析におけるカルボニルストレス抑制による腹膜保持メカニズムの解明  
第 13 回日本抗加齢医学会総会, 2013 年 6 月 27 日、パシフィコ横浜(横浜)
7. 大場郁子、森建文、大崎雄介、鳴海かほり、佐藤恵美子、小泉賢治、丹野瑞穂、島貫美和子、千田真貴子、堀内孝、伊藤貞嘉  
腹膜透析排液における(プロ)レニン受容体の検討  
第 58 回日本透析医学会, 2013 年 6 月 21 日、福岡国際会議場(福岡)
8. Kaori Narumi, Takuo Hirose, Emiko Sato, Takefumi Mori, Yusuke Ohsaki, Kiyomi Kisu, Mayuko Ishikawa, Tomonori Ishii, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito  
Functional (pro)renin receptor in human lymphocytes and monocytes  
World congress of Nephrology 2013, 2013/06/02, Hong Kong(China)
9. Ikuko Oba, Takefumi Mori, Yusuke Ohsaki, Emiko Sato, Yoshimi Yoneki, Toshio Miyata, Sadayoshi Ito  
Specific role of carbonyl stress on peritoneal neovascularization and function in Wistar rats.  
World congress of Nephrology 2013, 2013/06/01, Hong Kong(China)
10. 大場郁子、森建文、大崎雄介、佐藤恵美子、中道淑美、赤尾研人、宮田敏男、伊藤貞嘉  
腹膜透析における上皮間葉形質転換を介した腹膜傷害機序の解明  
第 56 回日本腎臓学会学術総会, 2013 年 5 月 12 日、東京国際フォーラム(東京)口演(O-210)
11. 鳴海かほり、廣瀬卓男、森建文、佐藤恵美子、石井智徳、伊藤貞嘉  
ヒトリンパ球および単球に存在する(プロ)レニン受容体の機能について  
第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013 年 4 月 26 日、国際センター(仙台)(ポスター)
12. Ikuko Oba, Takefumi Mori, Yusuke Ohsaki, Emiko Sato, Yoshimi Nakamichi, Toshio Miyata, and Sadayoshi Ito  
Overexpression of glyoxalase 1 attenuate methylglyoxal-induced peritoneal injury with suppression of epithelial mesenchymal transition pathway and neovascularization in Wistar rats.  
EB2013, 2013/4/22, Boston, MA(USA) (Poster)
13. Kaori Narumi, Takuo Hirose, Emiko Sato, Mayuko Ishikawa, Kiyomi Kisu, Takefumi

Mori, Sadayoshi Ito.

Functional (pro)renin receptor in human lymphocytes and monocytes.

PRR meeting, 2012/12/6, Berlin (Germany)  
(Oral)

14. 大場郁子、森建文、佐藤恵美子、中道淑美、赤尾研人、宮田敏男、伊藤貞嘉  
腹膜透析におけるカルボニルストレスによる腹膜障害機序の解明  
第 18 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会(口演)2012 年 9 月 22 日、あわぎんホール(徳島)
15. Ikuko Oba, Takefumi Mori, Emiko Sato, Yoshimi Yoneki, Mai Saito, Hideyasu Kiyomoto, Mariko Miyazaki, Toshio Miyata, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito.  
Carbonyl Stress Mediated Peritoneal Thickness is Reduced in Glyoxalase Transgenic Rats.  
14th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis, 2012/9/9-12, Kuala Lumpur (Malaysia) (Poster)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 貞嘉 (SADAYOSHI ITO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40271613

### (2) 研究分担者

森 建文 (TAKEFUMI MORI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40375001

庭野 吉己 (YOSHIMI NIWANO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40375184

佐藤 恵美子 (EMIKO SATO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20466543