

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15320

研究課題名(和文) 1-酸性糖蛋白質によるTLR4・マクロファージ制御を基盤とした腎疾患治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy for kidney disease based on TLR4-macrophage control by alfa1-acid glycoprotein

研究代表者

渡邊 博志 (Watanabe, Hiroshi)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Alfa1-酸性糖蛋白質(AGP)は急性相反応物質として知られており、近年、我々はAGPの抗炎症作用を新たに見出してきた。本研究では、アドリアマイシン腎症マウスに対するAGPの腎保護効果を検討した。その結果、AGPの投与は、蛋白尿を減少させ、腎組織障害を改善した。その際、腎臓におけるTNF- α とマクロファージマーカーF4/80の発現量が減少した。また、マクロファージにAGPを添加したところIL-10の増加とiNOS発現減少が観察された。同時にCD163の発現も増大した。AGPはマクロファージに起因する炎症反応の沈静化を介して腎保護効果を発揮することを初めて見出した。

研究成果の概要(英文)：Human alfa1-acid glycoprotein (AGP) is known as an acute phase reactant, and we have recently found anti-inflammatory effects of AGP. In this study, the effect of AGP on renal protection on adriamycin-nephropathy (AN) mice was investigated. As a result, administration of AGP to AN mice reduced proteinuria and improved kidney tissue injury. At that time, the expression level of TNF- α and macrophage marker F4/80 in the kidney was decreased. Addition of AGP to macrophages resulted in an increase in IL-10 production and a decrease in iNOS expression. At the same time, gene expression of CD 163 also increased. In conclusion, we discovered for the first time that AGP exerts a renoprotective effect through the calming of the inflammatory response caused by macrophages.

研究分野：医療薬学

キーワード：alfa1-acid glycoprotein kidney disease TLR4 macrophage

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は、末期腎不全・透析導入の予備群となるだけでなく、心血管疾患の大きな危険因子でありその罹患者数は急増している。しかしながら、CKD に対する根本治療は未だ確立しておらずアンメットメディカルニーズの一つとされている。この克服は医療経済的にも大きな課題であり、新しい観点からの治療法の開発が急務の課題とされている。

2. 研究の目的

我々は、急性期蛋白質の一つであるα1-酸性糖蛋白質(AGP) が「内因性の炎症・免疫制御因子」として弱いTLR4 アゴニスト活性を有する一方で、強力な TLR4 リガンドであるLPS 存在下ではアンタゴニスト的に機能することを見出してきた。本研究では、AGP が有する TLR4 活性制御を基盤とした新規CKD 治療戦略開発のための基盤情報の獲得を到達目標とした。

3. 研究の方法

AGP はヒト血漿 (Fraction V) より単離・精製した。アドリマイシンをマウス尾静脈に投与後、5 日間に渡り AGP を連日腹腔内投与し、3 週間後に腎保護効果を評価した。マクロファージに対する作用は、PMA 分化THP-1 細胞に AGP を添加後、炎症関連遺伝子の発現変動を定量的 RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

アドリマイシン腎症 (Adriamycin nephropathy: AN)マウスに AGP を投与したところ、アドリマイシン投与によって増加した尿タンパクが AGP 投与により7日目から有意に減少した(Figure 1)。

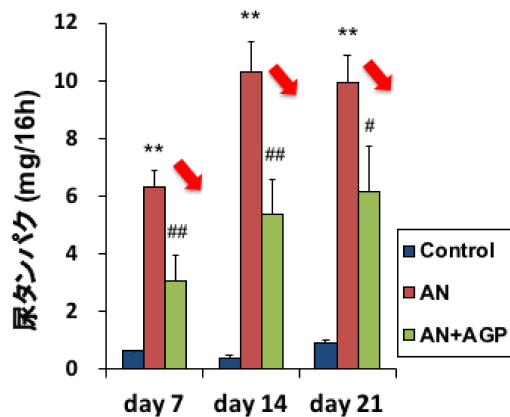


Figure 1 ANマウスの尿タンパクに及ぼすAGPの効果

さらに SDS-PAGE の結果、尿タンパクの主成分がアルブミンであり、AGP の投与は尿に

漏出するアルブミンを減少させることが明らかとなった。

アドリマイシン投与 21 日後の腎臓の組織障害を PAS 染色にて観察した。AN マウスでは全体に円柱が形成されているのに対し、AGP 投与群では円柱の形成が抑制されていた(Figure 2)。染色像を拡大すると、尿細管の変性や円柱の形成が AGP 投与によって明らかに改善されていることが分かった。従って、AGP の投与は腎組織障害を抑制することが示された。

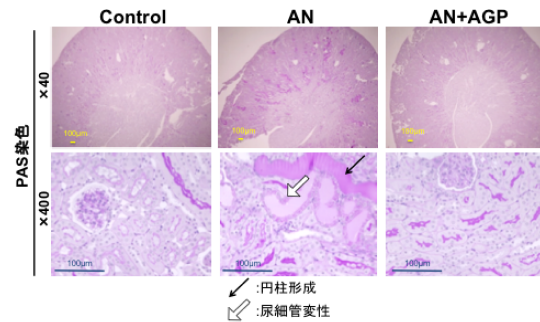


Figure 2 ANマウスの腎組織に及ぼすAGPの効果

次に炎症の評価としてマクロファージマーカーである F4/80 による免疫染色および腎臓の炎症関連因子の発現を評価した。免疫染色の結果、AN マウスにて糸球体や尿細管にマクロファージの浸潤がみられ、AGP の投与はマクロファージの浸潤を抑制した。また、炎症関連因子である iNOS、IL1-、TGF- の発現は AGP 投与で減少した (Figure 3)。従って、AGP はマクロファージの浸潤及び炎症を抑制することが示された。

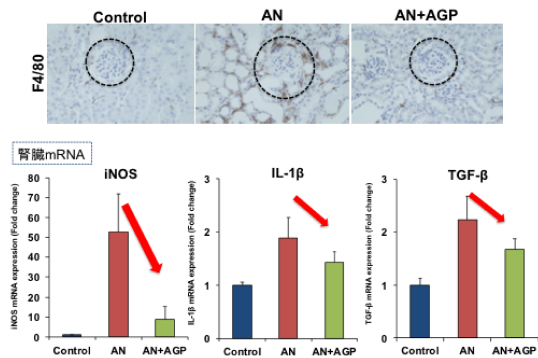


Figure 3 ANマウスの腎マクロファージ浸潤及び炎症に及ぼすAGPの効果

これまでの検討によりアドリマイシン投与 21 日での炎症抑制、組織障害の改善、7 日目から尿タンパクの抑制を確認した。そこで AGP による腎障害抑制機序について解明すべく、より早期の7日での腎組織評価を行った。

まず、腎臓の iNOS および CD163 の発現をみたところ、AGP 投与で iNOS の発現低下、CD163 の発現上昇が確認された(Figure 4)。

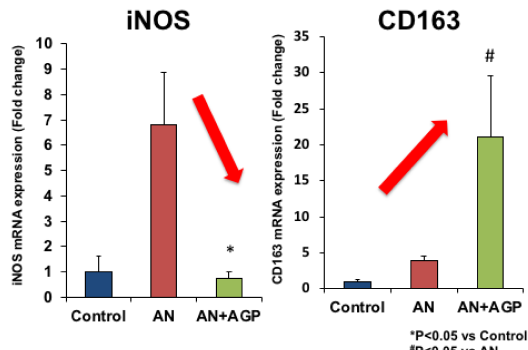


Figure 4 ANマウス腎iNOS及びCD163発現に及ぼすAGPの効果

そこで、AGPがマクロファージに影響を及ぼすという我々の過去の報告を基に、次にマクロファージのフェノタイプに着目した。

マクロファージは炎症性サイトカインを多く放出するM1マクロファージと抗炎症性サイトカインを多く放出するM2マクロファージに大きく分けることができる。このM1とM2は外部からの刺激によってフェノタイプ変換が起こることが知られている。AGPの投与によりiNOSの減少、CD163分子の発現上昇がみられたことからマクロファージのフェノタイプ変化の可能性を考え、次にin vitroにて検討した。

実験方法としてヒト単球細胞であるTHP-1細胞をPMAでマクロファージへと分化させ、血漿中の濃度を参考に、AGPを添加し、リアルタイムPCRで観察した。その結果、M1マーカーのiNOSの著しい減少、M2マーカーであるCD163の濃度依存的な上昇が観察された。加えて、CD163の上昇と同様に抗炎症性サイトカインであるIL-10の発現も濃度依存的に上昇した。従って、AGPは濃度依存的にマクロファージのフェノタイプを変えることが強く示唆された。

そこで、AGPによって変化したマクロファージの炎症に対する反応をみるために、AGPの添加後に炎症刺激としてLPSを添加した。その結果、LPS添加後においてもAGPによって変化したマクロファージのフェノタイプが維持され、抗炎症性のサイトカインであるIL-10の発現が促進していることが確認された。よって、AGPはマクロファージのフェノタイプを介して抗炎症性作用を示すことが示唆された。

以上、AGPの投与は、マクロファージのフェノタイプを抗炎症側へ傾かせることで、アドリマイシンが誘発する炎症および尿蛋白を抑制することが示唆された。AGPは尿タンパクと炎症の両方を抑制する新規CKD治療薬となることが期待できる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. et al. (1番目、19番目、20番目) Parathyroid hormone contributes to the down-regulation of cytochrome P450 3A through the cAMP/PI3K/PKC/PKA/NF-κB signaling pathway in secondary hyperparathyroidism. *Biochem Pharmacol.* 145:192-201 (2017) doi: 10.1016/j.bcp.2017.08.016. (査読有)
2. Enoki Y, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. et al. (2番目、16番目、17番目) Potential therapeutic interventions for chronic kidney disease-associated sarcopenia via indoxyl sulfate-induced mitochondrial dysfunction. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 8:735-747 (2017) doi: 10.1002/jcsm.12202. (査読有)
3. Sugimoto R, Watanabe H, Otagiri M, Toru Maruyama. et al. (2番目、15番目、16番目) The down-regulation of ABCG2, a urate exporter, by parathyroid hormone enhances urate accumulation in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 91: 658-670 (2017) doi: 10.1016/j.kint.2016.09.041. (査読有)
4. Watanabe H, Imafuku T, Otagiri M, Maruyama T. Clinical implications associated with the posttranslational modification-induced functional impairment of albumin in oxidative stress related disease. *J Pharm Sci.* 106: 2295-2203 (2017) doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.002. (査読有)
5. Enoki Y, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. et al. (2番目、13番目、14番目) Indoxyl sulfate potentiates skeletal muscle atrophy by inducing the oxidative stress-mediated expression of myostatin and atrogin-1. *Sci Rep.* 6:32084 (2016) doi: 10.1038/srep32084. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

1. 渡邊博志、田中元子、深川雅史、丸山徹 腎機能低下に伴う薬物動態の臨床的意義～副甲状腺ホルモンによる新たな制御機構～医療薬学フォーラム2017 第25回クリニカルファーマシーシンポジウム2017/6/30-7/1(鹿児島市民文化ホール：鹿児島)
2. 丸山徹、渡邊博志、榎木裕紀、荒毛里歩、田中元子、松下和孝、深川雅史 慢性腎臓病が誘発する骨格筋萎縮における尿毒素の関与とその分子機構 第1回日本Uremic Toxin研究会学術集会2017/2/18(ベルサール八重洲：東京)
3. 石躍華奈、渡邊博志、中村照也、池鯉鮒麻美、小早川敬博、石井宏志、山縣ゆり子、森岡弘志、小田切優樹、丸山徹 1-酸性糖タンパク質バリエーション間の薬物結合選択性に寄与するアミノ酸残基の同定 第33回日本薬学会九州支部大会

- 2016/12/3-12/4 (鹿児島大学 群元キャンパス：鹿児島)
4. Bi Jing、西田健人、藤村留衣、今福匡司、富永結菜、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 腎線維化マウスに対するビタミン D 受容体活性化剤とビタミン A 誘導体の治療効果 第 23 回 日本血液代替物学会年次大会 2016/11/24-25 (早稲田大学・西早稲田キャンパス 55 号館：東京)
 5. 渡邊博志、榎木裕紀、荒毛里歩、田中元子、松下和孝、深川雅史、丸山徹 慢性腎臓病が誘発する骨格筋萎縮における尿毒素の関与とその分子機構 第 3 回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会 2016/11/6 (今池ガスビル、名古屋)
 6. 藤村留衣、西田健人、渡邊博志、異島優、小田切優樹、丸山徹 急性相蛋白質である 1-酸性糖蛋白質は抗炎症性作用によりアドリアマイシン腎症を改善する 第 59 回 日本腎臓学会学術総会 2016/6/17-19 (パシフィコ横浜、会議センター：横浜)
 7. 石躍華奈、渡邊博志、中村照也、池鯉鮒麻美、石井宏志、異島優、山縣ゆり子、小田切優樹、丸山徹 In silico 解析へ向けた 1-酸性糖タンパク質異型の薬物結合選択性に寄与するアミノ酸残基の同定 日本薬剤学会 第 31 回 年会 2016/5/19-21 (長良川国際会議場、岐阜都ホテル：岐阜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称： 1 - 酸性糖タンパク質の血中濃度の上昇をメカニズムとした慢性腎臓病治療薬
発明者：丸山徹、渡邊博志、異島優、藤村留衣、小田切優樹
権利者：同上
種類：特許
番号：特開 2017-186315(P2017-186315A)
出願年月日：平成 29 年 3 月 25 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 博志 (WATANABE, Hiroshi)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398220

(2) 研究分担者

丸山 徹 (MARUYAMA, Toru)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

(3) 研究分担者

小田切 優樹 (OTAGIRI, Masaki)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80120145