

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16003

研究課題名(和文)キラルアミノ酸を用いた血管弾性を回復させる新規治療法の開発

研究課題名(英文)Chiral amino acids for vascular elasticity

研究代表者

橋本 展洋 (Hashimoto, Nobuhiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50791589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の構成成分であるアミノ酸は、生体においてはL体の形で存在している。以前の報告にて、我々はアミノ酸の一種であるL-リジンに血管中膜石灰化抑制作用があることを見出した。本研究では、L-リジンの光学異性体であるD-リジンが血管石灰化に与える影響を検討した。その結果、アデニン誘導性腎不全ラットにおいて、D-リジンにはL-リジンと同等以上の血管石灰化抑制作用がある事が確認された。D-リジンにはL-リジンに認められないアデニン腎不全モデルの腎機能改善効果や血管中膜平滑筋細胞のアポトーシス(細胞の自然死)抑制作用がある事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管の弾性の保持は心血管病抑制に重要である。血管の弾性は、「第二の心臓」とも呼ばれる胸腹部大動脈などの弾性動脈が主に担っており、血管中膜石灰化は血管の弾性を失わせる重要な原因である。しかしながら、血管中膜石灰化に対する有効な治療法は確立されていない。今回の我々の研究結果から、アミノ酸を用いた新たな心血管病抑制治療開発の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We previously found that L-lysine, an amino acid, suppresses vascular medial calcification. In this study, we examined whether D-lysine, an optical isomer of L-lysine, had inhibitory effects on vascular calcification. In adenine-induced chronic kidney disease rats, D-lysine successfully suppressed vascular calcification. We found that D-lysine, but not L-lysine, suppressed tubulointerstitial injuries in adenine-induced uremic rats and effectively inhibited apoptosis of vascular smooth muscle cells.

研究分野：骨ミネラル代謝

キーワード：血管石灰化 アミノ酸 腎不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界全体の死亡原因第1位は心血管病(cardiovascular disease: CVD)であり、CVDによる死亡者数は今後も増加すると予想されている(WHO統計: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistic)。これまでに、CVD患者に対する内科的治療としてi) renin-angiotensin-aldosterone系抑制薬を中心とした血圧管理や心筋リモデリング抑制、ii) スタチン製剤を中心とした粥状動脈硬化抑制、iii) 抗血小板薬・抗凝固剤を用いた血栓抑制、iv) カテーテル治療、といった種々のアプローチが進歩を遂げてきたが、全世界的にCVDによる死亡者数が増加の一途をたどっているという事実は、上記i) ~ iv)と異なる新たな視点(例えばvascular elasticity)からCVD治療アプローチを再考する必要があることを示している。またWHO統計では、高所得国のみならず中所得国でもCVDが死因第一位、低所得国でも感染性3疾患に続きCVDが死因第4位となっており、新たな視点からのCVD治療アプローチとして、より「安価」で「使いやすい」「効果的」な方法が望まれる。

Vascular elasticityの保持は心血管病(CVD)抑制に重要である。弾性動脈は、そのelasticityにより、(1)心収縮期に拡張することで心後負荷を軽減し、(2)心拡張期に収縮することで心拡張期の血流、特に冠動脈の血流を維持し、(3)血圧のpulsatilityを軽減することで末梢臓器を保護する働きを持つ(Circ J. 74:24-33, 2010)。内膜・中膜・外膜という動脈3層構造のうち、動脈壁にelasticityを付与する最も重要な構造は血管中膜であり、中膜石灰化はvascular elasticityを失わせる重要な原因である(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25:932-943, 2005)。血管中膜石灰化によるelasticity喪失がCVD発症および死亡の危険因子であることは、最近のメタ解析でも明らかにされているが、血管中膜石灰化に対する有効な治療法は確立されていない(Vascular Health and Risk Managemnet 5:185-197, 2009)。

2. 研究の目的

「効果的」で「安価」で「使いやすい」血管中膜石灰化治療法開発に資する学術的基盤を構築する。

3. 研究の方法

動物においてタンパク制限食が血管石灰化を促進することが知られているため、我々は蛋白質の構成成分であるアミノ酸の一部(特に第一制限アミノ酸となりやすいL-Lys)に血管石灰化抑制作用があるのではないかと考え、予備検討を行った。13週齢Sprague-Dawleyラットを無作為に「コントロール群(Cont)」「アデニン誘導血管石灰化群(Ade)」「アデニン誘導血管石灰化+グリシン経口投与群(Gly)」「アデニン誘導血管石灰化+L-リジン経口投与群(Lys)」の4群に分け、L-Lysが血管石灰化に与える影響を検討した。なお、Glyは最も単純なアミノ酸であり、本予備検討ではアミノ酸対照として用いた。その結果、Ade群・Gly群で認められた顕著な血管石灰化がL-Lys群において抑制される事が明らかとなった。しかしながら、血管石灰化に対するL-Lys経口投与療法には、克服すべき課題があることも同時に明らかになった。血管石灰化の発症・進展にはカルシウム・リン出納を担う「腎」の健康状態を維持する事が重要であるが、L-Lys経口投与はアデニン誘導性腎不全ラットの血管石灰化を抑制したものの、腎機能などは改善させなかったのである(J Am Soc Nephrol. 2014 Sep;25(9):1954-65)。本予備検討にて、L-Lysの光学異性体であるD-Lysを経口投与したところ、L-Lysには認められなかつ

た腎機能改善効果などが存在する事が示唆されたため、D-Lys が腎不全・血管石灰化病変に与える影響を本研究において動物モデルを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) D-Lys はアデニン誘導性腎不全ラットの血管石灰化抑制において L-Lys と同等以上に有用であった。

本研究では、13 週齢雄性 SD ラットに 0.75% アデニンを混餌投与しアデニン誘導性腎不全ラットを作成した。本ラットに 2.5% グリシン (Gly 群)、2.5% L-リジン (L-Lys 群)、2.5% D-リジン (D-Lys 群) を 5 週間混餌投与し、血管石灰化をアリザリンレッド染色で評価したところ、D-Lys は L-Lys と同等以上の血管石灰化抑制効果を示した (図 1)。なお、各群間に餌摂取量、飲水量、体重の差は認めなかった。

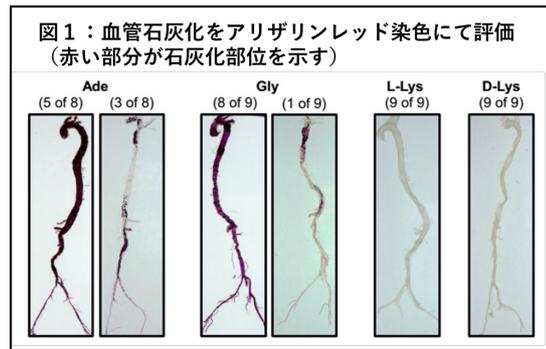


図1：血管石灰化をアリザリンレッド染色にて評価 (赤い部分が石灰化部位を示す)

(2) D-Lys はアデニン誘導性腎不全ラットの腎不全進行を抑制した。

上記ラットの血清クレアチニン (Cr) および尿素窒素 (UN) を測定したところ、L-Lys には無い腎不全進行抑制作用が D-Lys において認められた (図 2)。血清リン値も D-Lys 群において有意に低値を示していた。同ラットの血漿アミノ酸分析を行ったところ、腎機能の悪化と D アミノ酸に密接な関係が存在する事が示唆された (図 3 主成分分析：第一主成分が腎機能を反映する)。

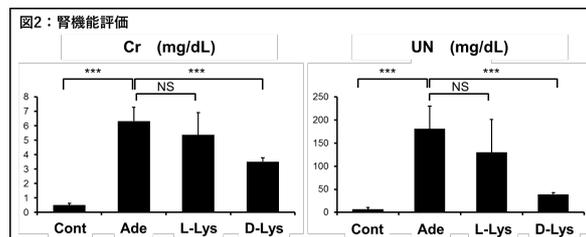


図2：腎機能評価

D-Lys 投与により、血管の健康状態を維持するのに必須の腎機能が保持されていたため、そのメカニズムにつき更なる検討を行った。アデニン誘導性腎不全ラットの腎組織を評価したところ、コラーゲン I 染色陽性領域は D-Lys 群において有意に低下していた。しかしながら、real time PCR にて collagen I の mRNA 発現量を評価したところ、L-Lys 群と D-Lys 群に有意差を認めなかった。このため、collagen I の分解機構に着目しマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 2/9 の発現量を検討したところ、D-Lys 投与により MMP2/9 の mRNA 発現量が有意に増加する事が明らかとなった。またザイモグラフィにより MMP 活性を測定

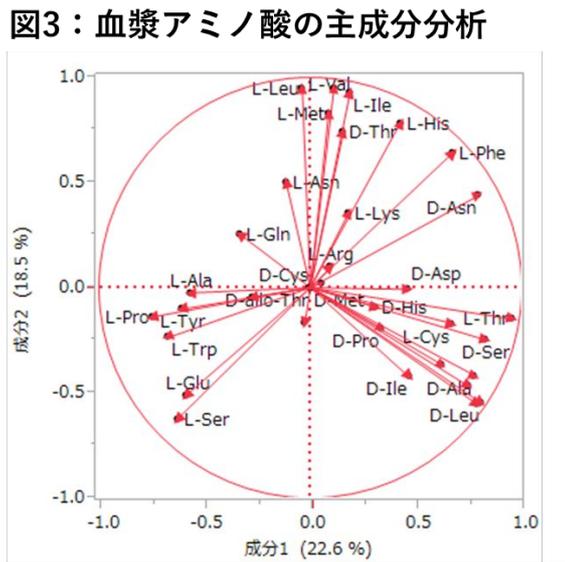


図3：血漿アミノ酸の主成分分析

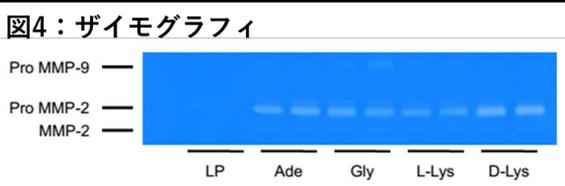


図4：ザイモグラフィ

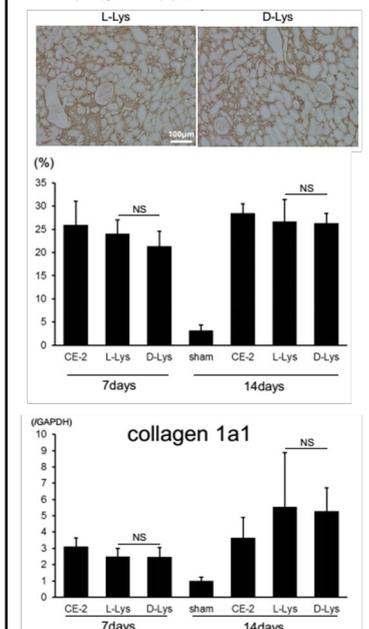
したところ、D-Lys 投与により MMP2 活性が上昇する事も確認した (図 4)。これらの結果より、D-Lys はアデニン誘導性腎不全ラットにおいて collagen 線維の分解を促進し、腎尿管間質線

維化抑制性に作用し、腎機能を保持する事が明らかとなった。

(3) D-Lys の腎保護作用はアデニン誘発性腎不全特有の現象であった。

アデニン誘導性腎不全ラットにおいて認められた D-Lys の腎保護作用が他のモデルにおいても成り立つのであれば、新たな腎不全・血管石灰化治療の開発に資する可能性がある。片側尿管結紮モデルおよび虚血再還流モデルを用いて、D-Lys の尿管間質線維化抑制作用を検討した。片側尿管結紮 7 日目、14 日目に評価を行ったが、いずれの時点においても腎組織 collagen I 陽性領域、real time PCR による線維化関連マーカーの発現量に、D-Lys による抑制効果を認めなかった。虚血再還流モデルにおいても同様の結果であった。このため、D-Lys の腎保護作用は検討の範囲内ではアデニン誘導性腎不全ラットに特有の現象であると考えられた。

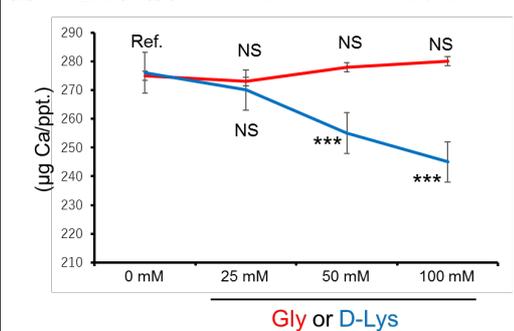
図5：片側尿管結紮モデルの線維化評価



(4) D-Lys には直接的な血管石灰化抑制作用がある。

D-Lys には腎機能改善に依存しない直接的な血管石灰化抑制作用があるか否かをさらに検討した。血管組織培養系において、リン負荷血管石灰化モデルを作成したところ、Gly は石灰化を抑制しなかったが D-Lys は石灰化を抑制した。血管石灰化の発症進展プロセスには血管平滑筋細胞のアポトーシスなどの能動的プロセスとカルシウム・リン沈着の受動的プロセスが存在することが知られている。能動的プロセスとして D-Lys が培養血管平滑筋細胞のアポトーシスに与える影響を caspase 3 に対する western blot にて評価したところ、D-Lys には L-Lys に認められないアポトーシス抑制作用がある事が判明した。また受動的プロセスとして D-Lys がカルシウム・リン過飽和溶液の沈殿形成に与える影響を評価したところ、D-Lys は濃度依存性に沈殿形成を抑制することが判明した (図6)。これらの結果から、D-Lys にはアデニン誘導性腎不全ラットにおいて認められた腎機能改善効果以外に、直接的な血管石灰化抑制作用がある事が判明した。

図6：過飽和溶液におけるカルシウム沈殿形成



(5) 蛋白カルバミル化修飾に D-Lys が与える影響の評価

蛋白カルバミル化修飾は尿素による蛋白質リジン残基の不可逆的修飾であり、リジン残基のプラスチャージを除去する事により蛋白質の機能に影響を与えうる。我々は、尿素がミトコンドリア構成タンパク質をカルバミル化して酸化ストレスを誘導し、血管石灰化促進性に作用する事を見出し、D-Lys が蛋白カルバミル化修飾に与える影響を検討した。その結果、D-Lys は蛋白カルバミル化修飾を抑制する事が判明した。D-リジンは -および -アミノ基を有しており、これらが尿素により生じたシアン酸・イソシアン酸に対するデコイとして作用し、蛋白カルバミル化が抑制されたと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Protein carbamylation exacerbates vascular calcification.
Mori D, Matsui I, Shimomura A, Hashimoto N, et al.
Kidney International 2018;94(1):72-90. doi: 10.1016/j.kint.2018.01.033 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1, 蛋白カルバミル化は血管石灰化の増悪因子である
森大輔、松井功、橋本展洋、松本あゆみ 等
第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018 年
- 2, 経口蛋白摂取によるリン腎毒性の解除
島田果林、松井功、橋本展洋、松本あゆみ 等
第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018 年
- 3, リトコール酸は血漿 FGF23 濃度を上昇させる
橋本展洋、松井功、松本あゆみ、森大輔 等
第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018 年
- 4, Protein carbamylation exacerbates vascular calcification
Mori D, Matsui I, Hashimoto N, Matsumoto A et al.
American Society of Nephrology Kidney Week 2017 年
- 5, 蛋白カルバミル化は血管石灰化の増悪因子である
森大輔、松井功、橋本展洋、松本あゆみ 等
第 60 回日本腎臓学会学術総会 2017 年
- 6, 心腎連関と血管石灰化
松井功、橋本展洋
心腎連関を考える会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

所属研究機関名：該当なし

部局名：該当なし

職名：該当なし

研究者番号(8桁)：該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。