

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02729

研究課題名(和文)尿毒素によるNotchシグナルと代謝リプログラミングを介した血管障害の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of vascular injury via Notch signaling and metabolic reprogramming by urea toxins.

研究代表者

竹下 享典 (Takeshita, Kyosuke)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70444403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病患者(CKD)において腹部大動脈石灰化は心血管事故の規定因子である。尿毒素インドキシル硫酸負荷ラットモデルにおいて、大動脈はMoenckeberg型動脈硬化を呈し、Notchシグナルの低下がみられた。大動脈のメタボローム解析では、一酸化窒素、フリーラジカルの産生が亢進し、低酸素への反応性が低下していた。同モデルの心臓では心肥大とインフラマソームの活性化を認めた。Notch1ヘテロ欠損マウスにおいて、Notchシグナルの低下は脂肪細胞の分化促進とメタボリック症候群発症と関連した。インドキシル硫酸はNotchシグナルと炎症、代謝シグナルを変化させてCKDに独特な心血管病変を形成する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、慢性腎臓病における心血管病の原因となるインドキシル硫酸による血管壁細胞のNotchシグナルへの影響と、それによって誘導される血管平滑筋細胞の代謝変化を詳細に解明し治療標的を明らかにすることであり臨床の面で重要である。

炎症、低酸素に関わる細胞内シグナルとこれに基づく代謝異常は、癌、そして糖尿病、非アルコール性肝障害などの代謝性疾患においても注目される分野である。インドキシル硫酸に起因する炎症と代謝の連関に関わるNotchシグナルの挙動を詳細に検討することは、学問的な観点からも重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic calcification is a determinant of cardiovascular events in patients with chronic kidney disease (CKD). In a rat model of indoxyl sulfate (IS) loading, the aorta exhibited Moenckeberg-type atherosclerosis and decreased Notch signaling. Metabolomic analysis of the aorta showed increased production of nitric oxide and free radicals and decreased responsiveness to hypoxia. In the same heart model, cardiac hypertrophy and inflammasome activation were observed. In Notch1 heterozygous deficient mice, decreased Notch signaling was associated with accelerated adipocyte differentiation and the development of metabolic syndrome. IS alters Notch signaling and inflammatory and metabolic signals to form cardiovascular lesions unique to CKD.

研究分野：血管生物学

キーワード：インドキシル硫酸 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

日本の人口の 12.9%が罹患する慢性腎臓病(以下 CKD)は、心血管疾患の強力な独立した危険因子である。主要な尿毒素であるインドキシル硫酸は、腎機能低下とともに体内に蓄積して動脈硬化を促進する。一方インドキシル硫酸は血液透析をもってしても除去は困難であるため、その下流で有害な細胞シグナルを抑制する必要があるインドキシル硫酸は OAT1,3 を介して細胞内に取り込まれ、アリルヒドロカーボン受容体(AhR)と NF- κ B の活性化、酸化ストレスの誘導などの炎症シグナルを活性化する (*Plos One* 2014)。一方、臨床的検討において拡張型心筋症、狭心症患者において、インドキシル硫酸の血中濃度が、生命予後、動脈硬化の進行の独立した危険因子であることを報告した (*Int J Cardiol.* 2013, *Am J Cardiol.* 2013, *Circ J.*2013, 2014)。

Notch 受容体は種を超えて保存された 1 回膜貫通型受容体である。Notch シグナルは発生期において、細胞間相互作用を介して、細胞運命の決定を行い、殊に神経形成、幹細胞の維持、がん細胞における生理活性の制御に必須であるため、神経発生学、腫瘍生物学の分野で注目されてきた。申請者は心血管系における作用に目を向け、血管内皮細胞の Notch1 受容体が、血管リモデリング、細胞生存、分化状態、血管内皮前駆細胞の維持を制御し、発生期と低酸素状態に反応した血管新生に必須であることを示した(*Circulation* 2005 *Circ Res* 2007 *Circulation* 2010 *Lab Invest.* 2011 *Nat Commun.* 2014 *eLife* 2017)。Notch シグナルは動脈硬化病変においても重要であり、血管平滑筋 Notch1 受容体が動脈硬化初期病変である、新生内膜増殖に関与する (*Circulation* 2009)。逆に、動脈硬化モデルマウスに、Notch シグナル阻害薬を投与すると、炎症細胞の Notch シグナルが抑制された結果、炎症反応と動脈硬化の進展を抑制された(*Biochem Biophys Res Commun.* 2009)。実際ヒトの動脈硬化病理標本において Notch シグナルの活性化が認められた(*Surg Today.* 2014)。さらに Notch1 の活性化は脂肪細胞の分化に関与し、脂肪細胞の代謝を低酸素様状態に変化させることを最近明らかにした(*Sci Rep.* 2021)。Notch シグナルは HIF と相互作用があり、低酸素状態は Notch1 シグナルを逆に活性化する相乗効果がある (*Nat Commun.* 2014)。インドキシル硫酸の生理作用、そして血管の石灰化病変に関わる現象は Notch シグナルの作用点と共通である。そこで Notch シグナルはインドキシル硫酸の重要な作用点であると仮定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インドキシル硫酸による血管壁細胞の Notch シグナルへの影響と、それによって誘導される血管平滑筋細胞の代謝変化を詳細に解明し治療標的を明らかにすることである。

心血管病の原因となるインドキシル硫酸の治療標的とみなされる作用点の検討は臨床上的意義は大きい。一方、学術的には、炎症、低酸素に関わる細胞内シグナルとこれに基づく代謝異常は、癌、そして糖尿病、非アルコール性肝障害などの代謝性疾患においても注目される分野である。インドキシル硫酸に起因する炎症と代謝の連関に関わる Notch シグナルの挙動を詳細に検討することは、学問的にも臨床応用の観点からも重要と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 生体内におけるインドキシル硫酸に起因する血管における組織炎症、線維化、石灰化における Notch1 シグナルの役割を解析する。

Dahl 食塩感受性ラットに飲水中に 2% 食塩水負荷、さらにインドキシル硫酸 200 mg/kg/day を投与してインドキシル硫酸負荷モデルを作製した。対照に Dahl 食塩感受性ラット(塩分負荷なし) 2% 食塩水負荷した Dahl 食塩感受性ラットを準備した。2% 食塩水負荷した Dahl 食塩感受性ラットとインドキシル硫酸負荷モデルの間では体重、血圧腎機能に有意差はなかったが、インドキシル硫酸の血中濃度は 10 倍に増加していた。

(2) 血管平滑筋細胞内に対するインドキシル硫酸の作用における Notch1 シグナルの役割の解析

インドキシル硫酸で刺激をうけた平滑筋培養細胞において、それぞれ Notch シグナル活性は HIF、AhR-NFκB シグナルとの crosstalk を介しての形質転換・アポトーシスを詳細に検討する。

(3) インドキシル硫酸による組織代謝の変化の解析

上記インドキシル硫酸負荷モデルおよび対照の検体を用いて、これまでの経験を生かしてメタボローム解析を行う。サンプルの前処理(水溶性代謝物の抽出と誘導体化)を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)を用いてメタボロミクス解析を行う。同定された低分子代謝物について主成分分析を行い、特徴的な代謝産物を同定する。脂質・糖代謝の変化をモデルラットの大動脈においてトランスクリプトーム解析の結果も踏まえ解析する。

4. 研究成果

慢性腎臓病(CKD)患者において心不全に至る心腎症候群の主要な原因である左室拡張機能障害(LVDD)の臨床マーカーを見つけることに関心が持たれている。無症状の透析前CKD患者のLVDDと予後を予測するためのコンピュータ断層撮影(CT)ベースの腹部大動脈石灰化(AAC)の有用性を検討した。無症状の透析前CKD患者218名[推定糸球体濾過量(eGFR)中央値; 40.9mL/min/1.73m²]のLVDDと腹部大動脈石灰化(AAC)の関係を前向きに検討した。非造影CTスキャンと心エコー図を実施し、AACの半定量的な指標として大動脈石灰化指数(ACI)を測定した。結果ACI中央値は11.4であった。AACとLVDDはそれぞれ193人(89%)と75人(34%)で診断された。LVDDの推定に受信者動作特性曲線分析を用いると、ACI₂₀は最適な感度(52.0%)および特異度(62.8%)を示した(AUC = 0.664, p < .001)。高ACI群には、高齢、高血圧、糖尿病、より重度のCKDなどのLVDD関連因子を有する患者が多く含まれていた。LVDDは高ACI群の患者で有意に多かった[それぞれ39(50%)、36(26%)、p < 0.001]。多変量解析の結果、ACIはE/A(β = -0.993, p = 0.003)、E/e'(β = 0.077, p < 0.001)、心・足関節血管指数(β = 0.209, p = 0.001)と有意な相関があった。これに対応して、E/e'はlogBNPおよびlog(ACI+1)と相関し、ACI値の4分位に比例して有意に増加した。Cox比例ハザードモデルでは、ACIはCVアウトカムに独立した予測因子であることが示された(ハザード比1.03、95%信頼区間1.00-1.06, p = 0.029)。結論 無症状の透析前CKD患者における潜在的なLVDDと将来のCVリスクを予測するために、CTによるAAC評価の有用性を示唆する結果となった(Int J Med Sci. 2019 Jun 7;16(7):939-948.)。

このように大動脈石灰化はCKD患者の予後を左右する因子でありその成因を精査するべ

く、主な尿毒素であるインドキシル硫酸負荷モデルについて以下の検討を行った。

Dahl 食塩感受性ラットに飲水中に 2% 食塩水負荷、さらにインドキシル硫酸 200 mg/kg/day を投与してインドキシル硫酸負荷モデルを作製した。対照に Dahl 食塩感受性ラット（塩分負荷なし）2% 食塩水負荷した Dahl 食塩感受性ラットを準備した。2% 食塩水負荷した Dahl 食塩感受性ラットとインドキシル硫酸負荷モデルの間では体重、血圧腎機能に有意差はなかったが、インドキシル硫酸の血中濃度（以下 IS）は 10 倍に増加していた。Dahl 食塩感受性（DS）、DS 高血圧（DH）、DH IS 処置ラット（DH+IS）において、血管と Notch 関連分子および骨形成分子の発現を調べた。Notch1、Notch3、Hes-1 はすべてのラットの大動脈 SMC で発現していたが、DH+IS ラットでは中膜の中心部と石灰化病変の周辺にのみ弱く発現していた。DH+IS ラットの大動脈の RT-PCR とウェスタンブロッティングでは、Notch リガンド、Notch1、Notch3、下流転写因子、SM22 の発現低下と、逆に骨形成マーカーの過剰発現がみられた。

培養大動脈平滑筋細胞において、Notch 受容体の発現、アポトーシス活性、石灰化に対する IS の影響を検討した。結果 DH+IS ラットの大動脈と冠動脈においてのみ、内側石灰化が認められた。大動脈平滑筋細胞における Notch1 と Notch3 の発現は、500 μ M の IS 下で 24 時間培養したときに最も高くなり、その後、時間および用量依存的に減少した。この低下と相まって、IS はカスパーゼ 3/7 活性と TUNEL 陽性大動脈 SMC を増加させた。さらに、DAPT による薬理的な Notch シグナル阻害は、大動脈 SMC のアポトーシスを誘導した。カスパーゼ阻害剤である ZVAD は、IS 誘発および DAPT 誘発の *in vitro* 血管石灰化を抑制した。Notch1 と Notch3 をノックダウンすると、骨形成転写因子の発現が協同して増加し、SM22 の発現が減少した。以上より IS による血管石灰化は、大動脈 SMC における Notch 活性の抑制、骨形成分化の誘導、アポトーシスを介するものであることが示唆された(Int J Med Sci. 2020 Sep 23;17(17):2703-2717)。

大動脈のメタボローム解析を行ったところ、Notch シグナルの低下した慢性期では、一酸化窒素、フリーラジカルの産生が亢進し、低酸素への反応性が低下していた（投稿準備中）。このように、Notch シグナルは、近年、代謝の重要な制御因子として認識されている。我々は、12 週間の普通食または高脂肪食を与えた野生型（WT）および Notch1 ヘテロ変異体（N1+/-）のマウスにおいて、脂肪形成における Notch1 の役割を明らかにした。Notch1 のハプロイン欠損は、同程度の摂餌量にもかかわらず、脂肪組織の蓄積と関連していた。N1+/- マウスの白色脂肪組織は、脂肪形成細胞（CD34+CD68+細胞）の蓄積、冠状構造、細胞増殖マーカー（サイクリン D1 および Ki67）の上昇を示した。8 週齢の WT マウスでは、脂肪蓄積と並行して WAT における Notch1 の発現がピークに達し、特に HF/HS-feeding 下ではその増加が抑制された。Notch1 ハプロ不全の下流では、Notch シグナルの下流転写因子（Hes-1、Pref-1、Sox9）の発現低下に伴い、脂肪形成因子 PPAR と C/EBP の過剰発現が認められた。Notch シグナルの薬理的阻害と Notch1 ノックダウンにより、3T3-L1 前脂肪細胞の脂肪形成が促進された。N1+/- マウスは、高脂肪食摂取後、グルコース耐性とインスリン耐性が低下し、IRS-1 と GLUT4 が WAT でダウンレギュレートされた。以上の結果から、Notch1 のハプロ不全は脂肪蓄積と脂肪形成を促進し、Notch シグナルとメタボリックシンドロームの発症との間に関連性があることが示唆された(Sci Rep. 2021 Aug 18;11(1))。

慢性腎臓病（CKD）患者において、血清インドキシル硫酸（IS）濃度の高さは、心筋線維化および心肥大と相関しており、心不全の重大な危険因子であることが示唆されている。本研

究の目的は、CKDのラットモデルにおいて、ISが心機能およびインフラマソーム経路に及ぼす影響を明らかにすることであった。Dahl食塩感受性(DS)、DS高血圧(DH)、DH+IS投与ラット(DH+IS)の心臓における生理的・病理的变化を評価し、線維化と肥大のバイオマーカーを測定した。DH+ISでは、左室駆出率の低下、LVの拡張、心筋の線維化と肥大の進行が観察され、これらは尿毒症性心筋症に見られる変化と類似していた。これらの変化は、腎機能および血圧とは無関係であった。RT-PCRおよびウェスタンブロット解析により、DH+ISラットの心臓では、線維化および肥大に関連するバイオマーカーと接着分子の発現が増加した。ISは、DH+ISラットの心筋において、アリール炭化水素受容体(AHR)経路、核因子Bp65(NF- Bp65)、およびインフラマソームを活性化した。さらに、ISはNLRP3インフラマソームの重要な構成要素(NLRP3、ASC、procaspase-1)の発現を上昇させ、IL-1とIL-18の産生を増加させた。最後に、ISは心筋においてMCP-1、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1などの様々な炎症性サイトカインを発現上昇させた。これらの結果から、ISはAHR/NF- B経路を介した心筋NLRP3インフラマソームの活性化により、心筋線維化・肥大を誘導し、LV機能を低下させることが示唆された(Cardiovasc Toxicol. 2022 Apr;22(4):365-377.)。

以上の検討より、インドキシル硫酸は心臓・血管における一酸化窒素、フリーラジカルの産生、組織呼吸を変化させ、その結果、AHR経路、NF- Bp65、およびインフラマソームを活性化、Notchシグナルを変化させて慢性腎臓病に独特な病変を形成する可能性が示唆された。インドキシル硫酸によるNotchシグナルを介した炎症シグナルと代謝シグナルのクロストークの存在の可能性が注目される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamaguchi Kazutoshi, Yisireyili Maimaiti, Goto Sumie, Kato Katsuhiro, Cheng Xian Wu, Nakayama Takayuki, Matsushita Tadashi, Niwa Toshimitsu, Murohara Toyooki, Takeshita Kyosuke	4. 巻 17
2. 論文標題 Indoxyl Sulfate-induced Vascular Calcification is mediated through Altered Notch Signaling Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 2703 ~ 2717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.43184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeshita Kyosuke	4. 巻 65
2. 論文標題 Sharpening the Focus: Acupuncture Interrupts the Brain?Gut Vicious Cycle Underlying Functional Dyspepsia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1578 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06080-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sawano Makoto, Takeshita Kyosuke, Ohno Hideaki, Oka Hideaki	4. 巻 14
2. 論文標題 A short perspective on a COVID-19 clinical study: 'diagnosis of COVID-19 by RT-PCR using exhale breath condensate samples'	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Breath Research	6. 最初と最後の頁 042003 ~ 042003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1752-7163/abb99b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiwaki Satoshi, Saito Shigeki, Takeshita Kyosuke, Kato Hidefumi, Ueda Ryuzo, Takami Akiyoshi, Naoe Tomoki, Ogawa Mika, Nakayama Takayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 In vivo tracking of transplanted macrophages with near infrared fluorescent dye reveals temporal distribution and specific homing in the liver that can be perturbed by clodronate liposomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furusawa Kenji, Takeshita Kyosuke, Suzuki Susumu, Tatami Yosuke, Morimoto Ryota, Okumura Takahiro, Yasuda Yoshinari, Murohara Toyoaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Assessment of abdominal aortic calcification by computed tomography for prediction of latent left ventricular stiffness and future cardiovascular risk in pre-dialysis patients with chronic kidney disease: A single center cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 939 - 948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.32629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazutoshi Yamaguchi, Motoharu Hayashi, Yasuhiro Uchida, Xian Wu Cheng, Takayuki Nakayama, Tadashi Matsushita, Toyoaki Murohara, Kyosuke Takeshita	4. 巻 11
2. 論文標題 Notch1 haploinsufficiency in mice accelerates adipogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96017-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazutoshi Yamaguchi, Maimaiti Yisireyili, Sumie Goto, Xian Wu Cheng, Takayuki Nakayama 5, Tadashi Matsushita, Toshimitsu Niwa, Toyoaki Murohara, Kyosuke Takeshita	4. 巻 4
2. 論文標題 Indoxyl Sulfate Activates NLRP3 Inflammasome to Induce Cardiac Contractile Dysfunction Accompanied by Myocardial Fibrosis and Hypertrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovasc Toxicol .	6. 最初と最後の頁 365-377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.32629.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	片岡 浩巳 (Kataoka Hiromi) (80398049)	川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授 (35309)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中山 享之 (Nakayama Takayuki) (00456659)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	丹羽 利充 (Niwa Toshimitsu) (20208268)	修文大学・医療科学部・教授 (33942)	
研究分担者	佐藤 稔 (Satoh Minoru) (70449891)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	削除：2020年2月10日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関