

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08050

研究課題名（和文）芳香族炭化水素受容体経路遮断による心腎連関新規治療戦略の研究

研究課題名（英文）Investigation of effectiveness of Aryl hydrocarbon receptor blockade on cardiorenal syndrome

研究代表者

盛田 俊介（Morita, Toshisuke）

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：60286094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト大動脈血管内皮細胞を用いて、インドキシル硫酸（indoxyl sulfate：IS）による血管内皮細胞の障害に及ぼす各種ポリフェノールの効果を検討した。その結果、ケルセチンがISによる芳香族炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon receptor：AhR）の活性化を抑制し、MCP-1の分泌を減少させたことを確認した。そこで、IS投与5/6腎摘腎不全モデルマウスを用いて、ケルセチン投与の心血管系への効果を解析した。その結果、ケルセチン混餌食は、ISによるAhRの活性化を介した大動脈の炎症、心筋線維化と心拡張能の低下を抑制したことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ISの血中濃度は慢性腎臓病のステージ進行とともに上昇するが、血中ではISの90%以上がアルブミンと結合しており、現在でも血液透析での除去は困難である。また、慢性腎臓病に対する薬剤であるAST-120は、その副作用等により服薬アドヒアランスが悪い。今回の研究から、食品由来のケルセチンがIS-AhR経路遮断による心腎連関抑制に有効である可能性が示唆された。これらの結果は、ISの作用点をターゲットとした慢性腎臓病患者の心血管病の発症進展を抑制する新しい治療手段に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effects of various polyphenols on indoxyl sulfate (IS)-induced endothelial cell injury were investigated in human aortic endothelial cells. Quercetin suppressed the activation of the IS-Aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway and reduced the secretion of MCP-1. Based on these findings, IS-treated 5/6 nephrectomized mice with renal failure were created to investigate the effect of quercetin administration on the cardiovascular system in the IS-administered group. Our results demonstrated that quercetin protected against aortic injury mediated by IS-induced AhR activation, and inhibited the progression of myocardial fibrosis and cardiac diastolic dysfunction.

研究分野：循環器内科

キーワード：心腎連関 インドキシル硫酸 芳香族炭化水素受容体

1. 研究開始当初の背景

受容体型転写因子、芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor : AhR)は、TCDDなどのダイオキシン類をリガンドとしてその毒性を仲介し、チトクローム P4501A1 (CYP1A1)などの薬物代謝酵素のほか、サイトカインやシグナル伝達物質などの多くの遺伝子の発現を誘導する。また、ApoE ノックアウトマウスを用いた研究により、AhRの活性化が血管の炎症を誘導し動脈硬化を進展させることが報告されている。

慢性腎臓病(CKD)は、心血管病(CVD)の独立した危険因子であり両者の関連は心腎連関として捉えられている。したがってCKD患者では、心血管事故を未然に防ぐ治療戦略が重要である。これまでに電解質異常、貧血などが心腎連関形成に関与していることが明らかになっているが、その全貌が解明されているわけではない。一方近年、腎機能障害の進行に伴って体内に貯留する尿毒症物質が、「心血管毒性」を有することが明らかにされつつある。我々はこれまでの研究で、尿毒症物質であるインドキシル硫酸(indoxyl sulfate : IS)によるAhRの活性化が活性酸素種(ROS)の産生を介して血管内皮細胞の障害に関わることを報告した。一方、ISが心筋細胞の線維化を惹起することが動物モデルで報告されているが、心筋線維化へのIS-AhR経路の影響については明らかではない。

AhRはリガンドに対する特異性が低く、植物性食品からもリガンドとなる化合物が多く見いだされている。いくつかのポリフェノールはリガンドとして作用することで、AhRによる転写調節に影響を与えること、これらを経口摂取した場合の生理的濃度(10^{-9} ~ 10^{-6} M)では基本的にアンタゴニスト作用を示すことが報告されている。また、ケラチノサイトを用いた実験では、ケトコナゾールによるAhR-Nrf2経路の活性化が抗酸化作用を発揮することが明らかとなっている。これらのことから、AhRは生体内の障害を増強する方向にも抑制する方向にも働くことが示唆されている。

2. 研究の目的

これまでの研究で、血管内皮細胞においてISは、CYP1A1および1B1の発現を亢進し、AhRの核内移行を惹起し、内皮細胞の炎症を誘導することを報告した。そこで本研究では、我々がこれまでに得た研究結果をもとに、IS-AhR経路遮断による心腎連関抑制の可能性を検討する。具体的にはAhRのリガンドとして知られている食品由来のポリフェノール類による作用が、IS-AhR経路の活性化によって惹起される心血管系組織の障害を解除できる可能性を明らかにする。*in vitro*ではヒト血管内皮細胞を使用し、*in vivo*ではIS投与5/6腎摘腎不全モデルマウスを使用する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*の研究

細胞は、ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を使用した。ポリフェノールは、ケルセチン(Qu)、クリシン(Chr)、フラバノン(Fla)、ナリングニン(Nar)を使用し、AhRのアンタゴニストとしてCH-233191を使用した。各種ポリフェノールを添加30分後にIS(50 μ g/mL)で刺激した。IS刺激1時間後にISOGEN(ニッポンジーン)を使用してtotal RNAを抽出し、AhR活性化の指標としてCYP1A1、1B1のmRNAの発現をリアルタイムRT-PCR法で確認した。また、IS刺激24時間後に培

養上清を回収して、MCP-1 濃度を Quantikine Human MCP-1 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用して確認した。

(2) *in vivo* の研究

IS の心血管系への影響を検討するために、57BL/6j マウスを用いて IS 投与 5/6 腎摘腎不全モデルマウス (Nx) を作成し使用した。ポリフェノール類は *in vitro* の実験で効果が認められたケルセチン (Qu) を使用した。①コントロール群 (cont)、②コントロール+Qu 投与群 (cont+Qu)、③5/6 腎摘群 (Nx)、④5/6 腎摘+Qu 投与群 (Nx+Qu)、⑤5/6 腎摘+IS 投与群 (Nx+IS)、⑥5/6 腎摘+IS+Qu 投与群 (Nx+IS+Qu) の 6 群に分け実験を行った (図 1)。ケルセチンは、0.1% 混餌食として投与し、IS は 150mg/Kg/day を飲水投与した。

マウスは腎摘後、経時的に体重測定および食餌量の確認等を行い、実験終了時に心エコーによる心機能評価 (LVEF, E/A) を実施した。その後採血ならびに心臓と大動脈の摘出を行った。採取した血液から血清を遠心分離後 -80°C で保存した。血中 MCP-1 濃度は、Quantikine Mouse MCP-1 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で測定し、血中 BUN はウレアーゼ・LDGH 法で、血中 IS 濃度は HPLC 法で測定した。大動脈と心臓から ISOGEN (ニッポンジーン) を使用して total RNA を抽出し、AhR 活性化の指標として CYP1A1、1B1 の mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で確認した。また心臓からタンパクを抽出し心筋線維化の指標として α SMA と collagen Type III の発現をウェスタンブロット法で評価した。

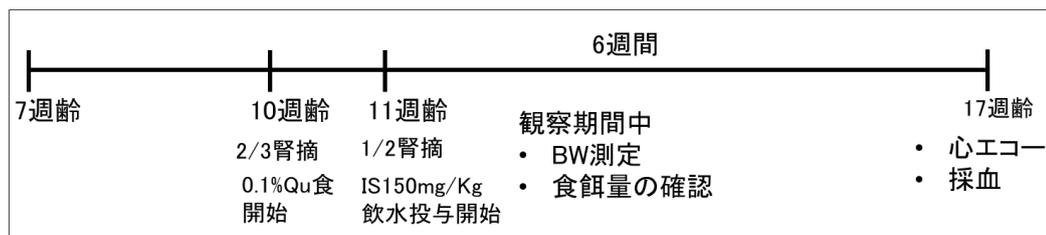


図1. Experiments with 5/6 nephrectomized mice

4. 研究成果

(1) *in vitro* の研究

各種ポリフェノールの影響

HAEC に各種ポリフェノールを添加 30 分後に IS を最終濃度 50 μ g/mL で刺激した。いずれのポリフェノール類も IS によって上昇した血管内皮障害の指標となる培養上清中の MCP-1 濃度と AhR の活性化で発現が増強する CYP1A1 と 1B1 の mRNA の発現を抑制した。なかでもケルセチンは AhR のアンタゴニストである CH-233191 とほぼ同等の抑制効果を示した (図 2, 3)。

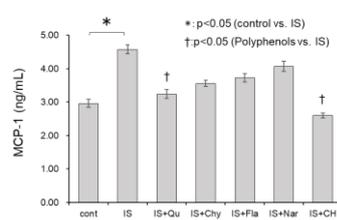


図2. MCP-1 production among each polyphenol

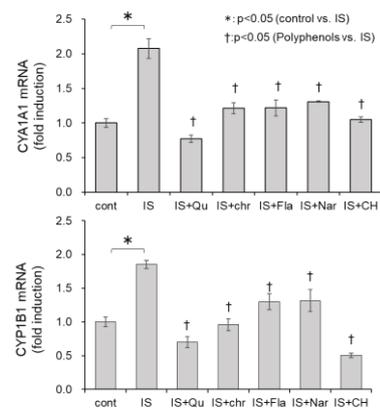


図3. Expression of CYP1A1 and 1B1 mRNA

(2) *in vivo* の研究

①腎機能と動脈硬化関連因子へのケルセチンの影響

HAEC を用いた実験結果から、ケルセチンを選択し、Nx マウスに IS (150mg/Kg/day) とケルセチ

ン(0.1%混餌食)を投与して、その影響を評価した。Nx 群と Nx+IS 群は、コントロール群と比べ血中 BUN 濃度が有意に高値となり腎障害が認められた。また、血中 IS 濃度は、コントロール群と比較して Nx で高値であり、さらに IS 投与群では Nx 群と比較して有意に高値であったが、Qu の投与は血中 BUN 濃度、IS 濃度のいずれにも影響を与えておらず、腎機能障害への影響は認められなかった。動脈硬化関連因子として測定した血中 MCP-1 値は、Nx と Nx+IS 群でコントロール群と比較して有意な上昇を示し、炎症反応が惹起されていることが示唆された。一方、Nx+IS+Qu 群では Nx+IS と比較して MCP-1 値は有意に減少しており、動脈硬化関連因子に対してケルセチンが効果を発揮していることが推察された(図 4)。

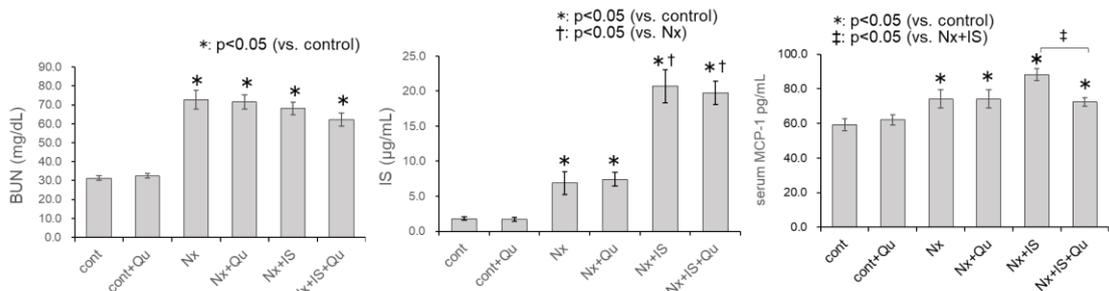


図4. Difference in serum IS, BUN, and MCP-1 levels between the groups

②大動脈におけるケルセチンの影響

マウス大動脈の AhR の活性化を確認するため mRNA 抽出し AhR 活性化の指標である CYP1A1 と 1B1 の発現を確認した。Nx+IS 群は、コントロール群と比較して CYP1A1 と 1B1 の発現が有意に上昇していたが、Nx+IS+Qu 群は

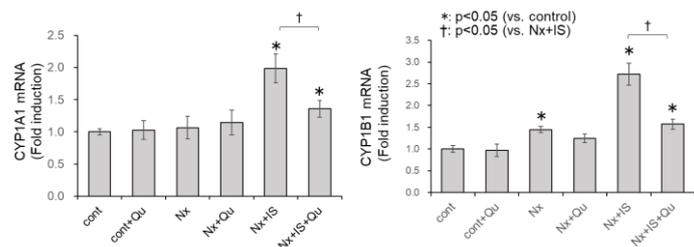


図5. Effect of Quercetin on CYP1A1 and CYP1B1 mRNA

Nx+IS 群と比較して CYP1A1 と 1B1 の発現は有意に低下していた(図 5)。このことから、大動脈では、血中 IS の上昇によって増強した AhR の活性化は、ケルセチンの投与により抑制されており、血中 MCP-1 値の低下が認められたことから、ケルセチンは IS による AhR 活性化を介した大動脈の動脈硬化性病変を抑制する可能性が示唆された。

③心臓組織におけるケルセチンの影響

ケルセチンと IS は心臓組織における CYP1A1 と 1B1 の発現に影響を示さなかった(データは未掲載)。一方、IS の投与により心筋線維化の指標である α -SMA と Type III collagen のタンパク発現は増強したが、ケルセチンの投与により有意に抑制された(図 6)。

④心機能へのケルセチンの影響

心収縮能の指標である LVEF は各群において有意な差は認めなかった。一方、心拡張能の指標である E/A は、Nx+IS 群はコントロール群と比較し

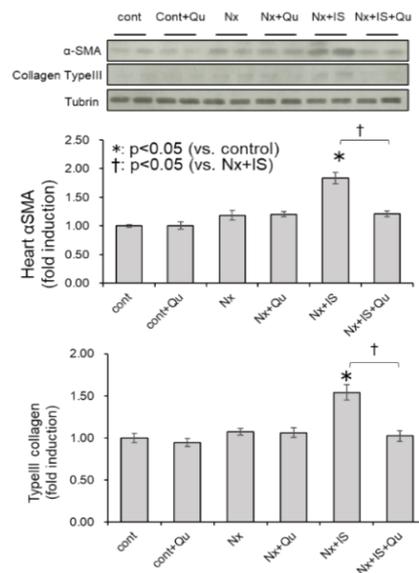


図6. Effect of Quercetin on fibrosis in myocardium

て有意に低下していたが、Nx+IS+Qu 群はコントロール群と有意差を認めなかった(図7)。

以上より、IS は心筋の線維化と拡張障害を助長する一方、ケルセチンにより心筋線維化の抑制と拡張障害の進行を阻止できる可能性が示唆された。

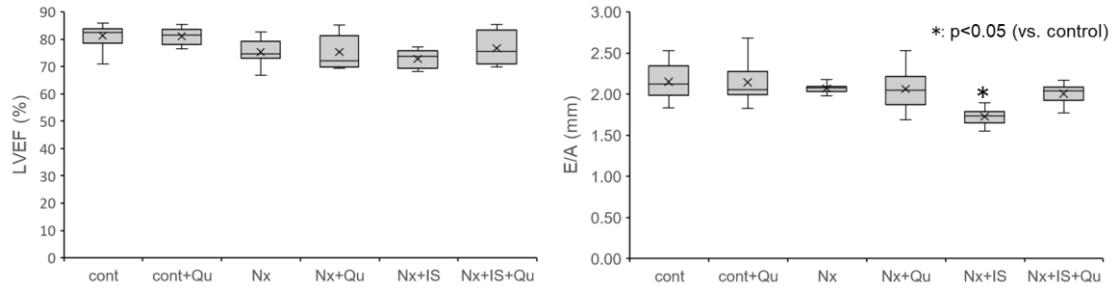


図7. Evaluation of cardiac function

まとめ

ケルセチンは細胞レベルにおいて、IS による AhR の活性化を抑制し、MCP-1 の分泌を減少させた。IS 血中濃度を高値に維持した腎不全モデルマウスにおいても、ケルセチンは、IS を介した AhR の活性化を阻害し、大動脈や心筋における炎症や線維化を抑制しうることを示された。また、IS は心拡張能を低下させたが、ケルセチン投与により拡張障害の発症を抑制した。これらのことからケルセチンが、IS-AhR 経路の活性化によって惹起される心血管系組織の障害を解除できる可能性が示唆され、心腎連関の新たな治療戦略となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------