

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08251

研究課題名(和文) 末梢動脈疾患合併CKD患者の新規治療標的としての終末糖化蛋白AGEs

研究課題名(英文) Involvements of advanced glycation end products on the developments of peripheral arterial disease in CKD patients

研究代表者

上田 誠二 (Seiji, Ueda)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80322593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病やCKDで蓄積するAGEsが末梢動脈疾患(PAD)の発症進展および治療抵抗性に強く関与するとの仮説を検証した。臨床研究においては、透析患者、特にPAD患者ではAGEsが著明に増加し、AGEsと動脈硬化指標(ABI, Agatston score)に関連するばかりでなく、明らかな大血管障害は認めないものの、AGEsの蓄積と腓腹筋における微小血管網の脱落、それに伴い筋萎縮が進展することを明らかとなった。現在、血管石灰化CKDモデルマウスを作成し、血管の石灰化およびPAD病態に如何に関与しているか検討を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、尿毒素物質であるAGEsの血管障害における役割を検討した。大血管障害に関する影響はまだ検討中ではあるが、末梢血管の内皮障害がサルコペニア・フレイルの発症に寄与していることをはじめ明らかとし、世界に先駆けて報告した。さらには、AGEsのアプタマーの治療薬としての可能性も見出している。CKDやまたサルコペニア患者で心血管病が多発し、その生命予後も不良であることはよく知られているが、本研究の知見により新たな病態があきらかとなり、また新たな治療戦略の確立にも寄与できる可能性が高く社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the roles of AGEs in the development of vascular injury especially focusing in CKD patients with peripheral vascular disease (PAD). Serum levels of AGEs were markedly higher in CKD patients with PAD. Further, elevated AGEs levels were significantly associated with surrogate makers for atherosclerosis such as ABI and vascular calcification index in these patients. Interestingly, AGEs levels were also corelated to the incidence of sarcopenia and the severity of frail in hemodialysis patients. AGE accumulated in the gastrocnemius muscle of 5/6 nephrectomy mice in association with morphological abnormalities, capillary rarefaction, and mitochondrial dysfunction, all of which were completely inhibited by DNA-aptamer raised against AGE. Our present findings may suggest the pathological role of AGE in sarcopenia and frailty in CKD. We are now investigating the impacts of AGEs on vascular calcification using adenine-induced nephropathy model.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病 動脈硬化 内皮障害 血管石灰化 糖化蛋白

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦では、およそ国民の400人に1人にあたる30万人以上が維持透析を受けており、その予備軍とされる慢性腎臓病(CKD)患者は400万人を超えると推察されている。この増加の背景には、高齢化、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病の蔓延などが考えられ、今後も増加の一途である可能性があることが懸念されている。CKDの存在下では心血管病の発症リスクが増加し、そのため予後不良であることが知られている。なかでも最近、CKDは独立した末梢動脈疾患(PAD)の発症の危険因子であることが明らかとなり(JASN 15: 1046-51, 2015)。特に透析患者においては導入時にはすでに10.5%が重症虚血肢(CLI)を有し、5年間の追跡調査では、8.9%の患者でCLIをあらたに発症することが報告された(NDT 19: 2547-2552, 2004)。また本邦においても、Okamotoらが、維持血液透析患者140名で、ABIおよび皮膚灌流圧(skin perfusion pressure: SPP)を用いて横断的に検討した結果、ABI 0.9未満を16.7%、SPP 50 mmHg未満を41.4%の下肢に認め、SPPの診断感度・特異度から血液透析患者の37.2%でPADを有すと推定され、その約半数が無症状であったことを報告した(AJKD 48: 269-276, 2006)。またPADを合併したCKD患者、維持透析患者では入院リスクも高く、たとえば下肢切断、血行術や血管内治療を行ったとしても生命予後は極めて不良であることが知られている(Arch Surg 139: 395-399, 2004)。以上のように、CKD患者においては、PAD罹患率は一般人口と比較し極めて高く、生命予後を規定する重要な因子であり、その発症進展の機序を解明し、早期に診断し適切な治療に行っていくことが重要であるが、現時点では、生活習慣の是正によるリスク因子の除去、運動療法、フットケア、抗血小板薬による薬物療法などの治療に限られており、十分に有効な治療法は確立されていないのが現状である。

これに関して、末梢血幹細胞移植がPADに有効である可能性がいくつかの基礎研究(Circulation. 103:897-903, 2001)や臨床研究(Am Heart J. 156:1010-8, 2008, Ther Apher Dial. 9:59-63, 2005)により示され、その臨床応用が期待されている。しかしながら、最新のメタ解析によると、CLI患者に対する末梢血幹細胞移植や内皮前駆細胞(EPC)移植では、下肢切断や生命予後に関して有益性を認めない結果が報告された(Eur J Vasc Endovasc Surg. 2015 50:775-83)。この理由のひとつとして、末梢血幹細胞やEPCの機能不全が存在することが想定されている(KI 89, 767-78, 2015)。特にCKD患者においては、慢性炎症、RAA系の亢進、酸化ストレスの亢進、内皮障害やその他CKDに関連した状態(e.g. erythropoietin deficiency, metabolic acidemia, hyperhomocysteinemia, uremic toxins)が末梢血幹細胞やEPCの機能不全を引き起こし治療抵抗性に関与することが示唆されている(KI 89, 767-78, 2015)。そのなかでも申請者らは、次のエビデンスより、AGEsに着目し、本申請研究を行うこととした。1) AGEsは糖尿病のみならずCKD患者でも上昇し、大血管障害、微小血管障害の発症進展に中心的な役割を果たし、心血管病の発症、生命予後にも密接に関与する(J Diabetes. 2017;9(2):141-148)。2) PAD患者でもAGEsは上昇することが観察され(Atherosclerosis. 2016;254:291-299)、重症度とも相関すること(Int J Angiol. 2016;25:44-53)が報告されており、PADの新規のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆されている。3)さらには、in vitroの検討で、AGEsが間葉系幹細胞の生存を源弱させ、血管新生を阻害する(Sci Rep. 2017 Sep 14;7(1):11593。)ことも報告された。以上の背景から「CKDで蓄積するAGEsは直接血管障害を引き起こすばかりでなく、末梢血幹細胞やEPCの機能不全も引き起こし、血管新生・修復不全を経て、PADの発症進展並びに治療抵抗性に強く関与するのでは？」との学術的「問い」をなすに至った。本申請ではこの仮説を検証するための検討を行っていく。

2. 研究の目的

本研究の目的はCKD患者における重要な予後規定因子であるAGEsの病態への関与を明らかとし、新たな治療手段の開発に寄与し、CKD患者のQOL/生命予後/健康寿命の改善をはかることである。

3. 研究の方法

課題 横断疫学的手法によるCKD患者におけるAGEsとPADの関連の分析。

目標 : CKD患者におけるPADとAGEsの相関関係を証明する。さらに培養EPCにAGEsを添加し、AGEsが直接EPCに及ぼす影響を解析。

方法 : 同意が得られた順天堂大学病院、および附属病院に通院及び入院の保存期CKD患者、維持血液透析中と年齢、性別をマッチさせた健常者対照群(ボランティア)の血液及び尿を回収し、以下の項目について調査及び測定を行う。

・ 患者背景(年齢、基礎疾患、血圧、脂質プロフィール、血糖、血圧、栄養状態指標(GNR1)、高感度CRP、投薬・治療内容)・腎機能(BUN、血清cr、eGFR、尿中alb/cr比)、MBD指標(Ca, P, iPTH)の評価、血清のAGEsはELISA法にて測定(Immuno Lett. 2015 Oct;167(2):141-6.)。さらに既知の心血管病のバイオマーカー(IMT, PWV, BNP, ADMA, 酸化ストレスマーカー)も同時に測

定する。

・ PAD 関連指標、PAD の診断は TASC II のアルゴリズムにより行い、CLI を有する患者では重症度を Wifi 分類と Wifi スコアで評価する。

課題 後ろ向き研究による AGEs と幹細胞治療抵抗性関連の分析

目標： 過去に幹細胞治療を行った CLI 患者を対象に治療効果と AGE の関連を検討し治療抵抗性への影響を証明する。本検討により、AGEs と治療抵抗性との関連性を示すことができる。また、培養 EPC へ AGEs を添加し、EPC の機能(proliferation, migration, tube formation assay, CDK inhibitors, eNOS, 上清中の angiopoietin2, NOx)を解析。また患者 EPC を単離(FASEB J. 25,1314-22,2011)し、数的評価、及び機能を解析する。また AGEs, RAGE に対する DNA-aptamer が AGEs の効果を抑制できるか否かを評価し、より効果が得られたものを以下の動物実験にて使用する。

課題 下肢虚血 CKD モデル動物における血管新生への関与の分析

目標： CKD における血管新生や修復の過程における直接的な AGEs の役割、また幹細胞治療効果における AGEs の役割を明らかにする。

方法：実験モデルは、control mice (sham ope 群)、5/6 腎摘群を作成し、生食あるいは埋め込み型浸透圧ポンプにて AGEs あるいは RAGE に対する DNA-aptamers を投与する 4 群を作成、腎摘 4 週後に片側下肢虚血を作成し、さらに、その 1 週後に骨髓幹細胞を移植(対照群には生食を投与) (Circulation. 110: 1148-55, 2004)し、虚血及びその回復を経時的に Laser doppler 法にて観察、その 3 週後に安楽死させ、組織を回収、内転筋内の毛細血管密度および EPC 及び骨髓幹細胞を分析する。本検討においては、CKD で蓄積した AGEs の直接血管障害や修復への阻害因子であることが明らかとなり、また新規治療法の開発のための知見も得られると考える

4. 研究成果

課題 横断疫学的手法による CKD 患者における AGEs と PAD の関連の分析。

37 名の維持血液透析患者を対象にした臨床研究では、AGEs が高い CKD 患者ほど PAD の有病率、重症度が増すこと。AGEs と ABI, CAVI には密接な関連があること、また AGEs が高いほど腹部大動脈の石灰化が強いこと(CT で agaston score, aortic calcification index を測定)。また血管石灰化と PAD の有病率、重症度には強い相関があること、AGEs と石灰化の年次進行率には強い正の相関が存在すること(後ろ向き研究)が観察された。また興味深いことに、AGEs はフレイルを有する群で著明に高値であることが観察され、握力や timed up and go test で測定した身体能力と強い相関があることが観察された。また、wearable devise で測定した運動強度とも密接な関係が認められ、サルコペニア/フレイルの重要な進展因子である可能性を見出し報告した(Yabuuchi J, et al. Sci Rep 2020)。以上の結果より、AGEs は透析患者の動脈硬化、血管石灰化、PAD の発症進展に深く関与するだけでなく、患者 QOL や生命予後に密接に関連するとされるサルコペニアの病態にも深く関与する可能性が示唆された。

課題 後ろ向き研究による AGEs と幹細胞治療抵抗性関連の分析

経過の追えた 25 名の CLI 患者での検討においては、AGEs と治療効果の間には、明らかな関連を見出すことが出来なかった。サンプル数が 25 例と少ないこと、ヒトの検討においては交絡因子が多々存在することがその要因と考えられる。現在サンプル数を増やすための前向き検討を行いながら、以下の in vitro の検討を行っている。培養 EPC での実験に先立ち、HUVEC に AGEs を添加することで内皮細胞への影響を検討したところ、AGEs は濃度依存性に、MCP-1, ICAM, VCAM の遺伝子発現を誘導していることが見いだされた。これらの反応は RAGE aptamer により完全に抑制されることから、AGEs-RAGE を介した下流シグナルが内皮障害に重要な役割を果たしていると考えられる。現在、Rac-1 の活性化が誘発されることが確認されており、その役割を検証するとともに、培養 EPC 機能にも同様のシグナルが関与するか否か確認を行っている。これらの結果からは、臨床試験においては治療抵抗性との明らかな関連は認められないものの、AGE-RAGE シグナルが内皮障害に寄与していること、また RAGE aptamer の新たな治療薬としての可能性を示唆するものであり、現在も検証を継続している。

課題 下肢虚血 CKD モデル動物における血管新生への関与の分析

当初下肢虚血モデルでの検討を進めていたが、上記の結果から、AGEs と血管石灰化の間に強い関連が認められることから、現在、adenine 投与モデル(Am J Pathol. 2021;191:283)を作成し検討を行っているが、血管石灰化の程度の再現性が乏しく、プロトコール調整を行っている。本研究を行いながら、臨床研究で認められた AGEs とサルコペニアの検証を行った。その結果、5/6 腎摘マウスの骨格筋には AGEs が著明に沈着し、サルコペニア様の組織変化が認められた。また、骨格筋周囲の毛細血管内皮の脱落とともに骨格筋の虚血やミトコンドリア機能異常があることを見出した。さらには、AGEs aptamer の投与で、これらの変化は抑制され、AGEs が腎不全におけるサルコペニアの原因因子のひとつであることを明らかにし報告した(Yabuuchi J, et al. Sci Rep)。これらの結果は、AGEs による内皮障害が大血管障害や PAD のみならず、筋萎縮やフ

レイルの発症など様々な病態に寄与している可能性を示唆するものであると考える。今回これらの研究の結果は新たな CKD 病態、治療戦略の確立に有用であると考えます。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taguchi Kensei, Elias Bertha C., Brooks Craig R., Ueda Seiji, Fukami Kei	4. 巻 84
2. 論文標題 Uremic Toxin-Targeting as a Therapeutic Strategy for Preventing Cardiorenal Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0872	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 該当する
1. 著者名 Gohda Tomohito, Kamei Nozomu, Koshida Takeo, Kubota Mitsunobu, Tanaka Kanako, Yamashita Yoshinori, Adachi Eri, Ichikawa Saki, Murakoshi Maki, Ueda Seiji, Suzuki Yusuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Circulating kidney injury molecule 1 as a biomarker of renal parameters in diabetic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 435~440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13139	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 Kaifu K, Ueda S, Nakamura N, Matsui T, Yamada-Obara N, Ando R, Kaida Y, Nakata M, Matsukuma-Toyonaga M, Higashimoto Y, Fukami K, Suzuki Y, Okuda S, Yamagishi SI.	4. 巻 120
2. 論文標題 Advanced glycation end products evoke inflammatory reactions in proximal tubular cells via autocrine production of dipeptidyl peptidase-4.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microvasc Res.	6. 最初と最後の頁 90-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mvr.2018.07.004.	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 Takahashi K, Ueda S, Kobayashi T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Sugaya T, Shiota S, Takahashi K, Gohda T, Horikoshi S, Suzuki Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 Chronic intermittent hypoxia-mediated renal sympathetic nerve activation in hypertension and cardiovascular disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36159-9.	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 Yabuuchi Junko, Ueda Seiji, Yamagishi Sho-ichi, Nohara Nao, Nagasawa Hajime, Wakabayashi Keiichi, Matsui Takanori, Yuichiro Higashimoto, Kadoguchi Tomoyasu, Otsuka Tomoyuki, Gohda Tomohito, Suzuki Yusuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Association of advanced glycation end products with sarcopenia and frailty in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74673-x	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 Li Zi, Murakoshi Maki, Ichikawa Saki, Koshida Takeo, Adachi Eri, Suzuki Chigure, Ueda Seiji, Gohda Tomohito, Suzuki Yusuke	4. 巻 10
2. 論文標題 The sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin prevents diabetic kidney disease progression in type 2 diabetic mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2761 ~ 2770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13014	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 Gohda Tomohito, Kamei Nozomu, Kubota Mitsunobu, Tanaka Kanako, Yamashita Yoshinori, Sakuma Hiroko, Kishida Chiaki, Adachi Eri, Koshida Takeo, Murakoshi Maki, Hagiwara Shinji, Funabiki Kazuhiko, Ueda Seiji, Suzuki Yusuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Fractional excretion of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in patients with type 2 diabetes and normal renal function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 382 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13351	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Otsuka T, Nagasawa H, Ueda S, Suzuki H, Yamagishi S, Suzuki Y
2. 発表標題 Roles of chronic inflammation and AGEs in the development of vascular calcification in chronic hemodialysis patients.
3. 学会等名 56th ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藪内純子、上田誠二、長澤肇、高橋敬子、大塚智之、鈴木祐介
2. 発表標題 透析患者におけるサルコペニア/フレイルの発症因子としてのADMA
3. 学会等名 第53回 日本成人病（生活習慣病）学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長澤 肇、上田 誠二、藪内 純子、小林 敬、金口 泰彦、高橋 敬子、合田 朋仁、山岸 昌一、鈴木 祐介
2. 発表標題 透析患者の血管石灰化における終末糖化産物（AGEs）、慢性炎症の役割の解明
3. 学会等名 第9回 日本腎臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田誠二
2. 発表標題 臓器連関機序としての内因性NO合成酵素阻害物質ADMAの役割
3. 学会等名 第19回 日本NO学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田誠二、藪内純子、長澤肇、大塚智之、小林敬、海部久美子、鈴木仁、合田朋仁、松井孝憲、山岸昌一、鈴木祐介
2. 発表標題 透析患者における終末糖化蛋白AGEsと心血管病、サルコペニアとの関連の解析
3. 学会等名 第42回 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagasawa H, Ueda S, Yabuuchi J, Kobayashi T, Kanaguchi Y, Takahashi K, Yamagishi S, Suzuki Y.
2. 発表標題 Involvements of AGEs on vascular calcification in hemodialysis patients.
3. 学会等名 American Society of Nephrology (Kidney week 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長澤 肇、上田誠二、小林敬、金口泰彦、高橋敬子、藪内純子、鈴木祐介
2. 発表標題 CKD患者において終末糖化産物 (AGEs) は血管石灰化の発症に関与する。
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会。
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藪内純子、上田誠二、野原奈緒、長澤肇、大塚智之、若林啓一、鈴木祐介
2. 発表標題 CKDにおけるサルコペニア/フレイルの発症因子としてのAGE
3. 学会等名 第63回 日本腎臓学会学術総会、
4. 発表年 2020年

〔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	山岸 昌一 (Yamagishi Sho-ichi) (40281026)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	

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