

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17268

研究課題名（和文）エリスロポエチン受容体を介した急性腎障害の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment method for acute kidney injury via erythropoietin receptor

研究代表者

中山 陽介（NAKAYAMA, YOSUKE）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：00748486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は腎不全時のエリスロポエチン低反応性にNO合成阻害物質であるADMAが関与することを明らかにしてきた。本研究では急性腎障害時の貧血や腎障害にもADMAによるエリスロポエチン低反応性が関与すると仮説をたて、急性腎障害のマーカーおよびエリスロポエチン低反応性を介した治療法の開発を目指した。結果、急性腎障害時は貧血と腎機能障害が相関し、ADMAの構造異性体であるSDMAが初期の腎不全予測の有用なマーカーになることを明らかにし、ADMA/SDMAのELISA用抗体を作成した。さらにADMAを抑制する化合物を探索するため2種類のHTSを構築し既知化合物1,234種類から9種類の化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の患者の超高齢化と医療技術の目覚ましい発展に伴い、侵襲度の高い医療行為がハイリスク症例に適応されるようになりそれとともに急性腎障害の頻度は増加している。申請者は尿毒素物質の1つであるADMAがエリスロポエチン受容体低下を引き起こしEPO低反応性を誘導することを見出した。術後の急性腎不全や腎移植から生じる急性腎障害は不可避な医原性腎疾患であるが、障害発症が予想できるため予防可能な急性腎障害ともいえる。腎虚血を予見し、急性腎障害時のADMA抑制による腎虚血保護は急性腎障害の新たな治療戦略となり腎臓分野へ貢献ができると考えている。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that ADMA, an NO synthesis inhibitor, is involved in erythropoietin hyporesponsiveness in renal failure. In this study, we hypothesized that ADMA-induced erythropoietin hyporesponsiveness is also involved in anemia and renal damage during acute kidney injury. We aimed to develop a marker for acute kidney injury and a treatment method that involves erythropoietin hyporesponsiveness. As a result, we demonstrated that anemia correlates with renal dysfunction during acute kidney injury, and that SDMA, a structural isomer of ADMA, is a useful marker for predicting early renal failure, and we created an antibody for ADMA/SDMA ELISA. Furthermore, we constructed two types of HTS to search for compounds that metabolize ADMA, and found nine compounds from 1,234 known compounds.

研究分野：医歯薬学

キーワード：急性腎障害 内皮障害 ADMA エリスロポエチン 虚血 HTS SDMA NO

## 1. 研究開始当初の背景

近年、急性腎障害は生命予後や多臓器不全、慢性腎不全に移行することが明らかとなり、この疾患の重要性が認識されている。これまで急性腎障害は尿細管細胞傷害が病態の主体と考えられていたが、申請者は NO 合成阻害物質である ADMA が、傍尿細管毛細血管における血流異常・内皮障害を介して急性腎障害・虚血に深く関与していることを明らかにしてきた。さらに ICU での急性腎障害時の予後予測に Hb が関与することが報告されていた。これより急性腎障害において虚血障害を治療することが重要と考えられるが、現時点では虚血の予測ならびに腎虚血保護に対して有効な薬剤は見出せていない。

エリスロポエチン (EPO) は動物実験では虚血障害に対して有効な薬剤である。一方、ヒトにおいて EPO は心腎血管系に対する保護効果は認めず、臓器障害は貧血より EPO 低反応性を引き起こす病態の方が大きいと考えられている。申請者は尿毒素物質の 1 つである ADMA がエリスロポエチン受容体低下を引き起こし EPO 低反応性を誘導することを見出した。術後の急性腎不全や腎移植から生じる急性腎障害は不可避な医原性腎疾患であるが、腎障害発症が予想できるため予防可能な急性腎障害ともいえる。急性腎障害の予測マーカーならびに急性腎障害時の ADMA-エリスロポエチン受容体を明らかにすることは、急性腎障害の新たな治療戦略となり腎臓分野へ貢献ができる。

## 2. 研究の目的

プレ実験にて虚血時に ADMA 代謝酵素である DDAH が有意に低下することを確認できた。本研究では急性腎障害時の ADMA 蓄積がエリスロポエチン受容体低下を介して虚血による腎障害を引き起こすと仮説をたて、エリスロポエチン受容体を標的とした腎障害のマーカー、治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) AKI 予期マーカーおよび ADMA/SDMA ELISA 作成に向けた基礎検討

ナイーブ VHH ファージライブラリーは、動物の免疫化や想定されるすべてのターゲットに対するライブラリー構築を必要としないため、短い所要時間で VHH を発見するための有効な代替手段である。ラクダ科動物のナイーブ VHH ライブラリーから、ADMA との交差反応を起こさない SDMA に対する VHH 単ドメイン抗体 (sdAb) を同定したいと考え、抗原の調製からファージディスプレイのパニング、および要件に基づくバインダーの検証までをカバーする 4 つのフェーズを検討した。異なる ELISA プレート、未修飾抗原 (SDMA および ADMA)、ビオチン化抗原、BSA 結合抗原という 4 つの異なるパニング戦略に基づいて、SDMA および ADMA に対するメガ多様なナイーブ VHH ライブラリーをスクリーニングする。

### 2) HTS 系の構築に向けた基礎検討

人工基質を用いた DDAH-1 活性測定系の検討を行う。従来の DDAH 活性測定法 (安定同位体を用いた方法、HPLC や LC-MS など分析機器を用いた方法、シトルリンの比色定量法) は、特別な施設、機器や処理時間の問題があり、ハイスループットスクリーニング系に応用するには不適であると考えられる。そこで、簡便に、速く、多検体検出可能な ADMA バイオセンサーを作製する。ヒト DDAH-1/pRSET A/BL21 を作製し大腸菌に発現させて調製した DDAH-1 を用いて、

人工基質 S-methyl-L-Thiocitrulline(SMTC)による蛍光を指標にした DDA H-1 活性測定法の構築を試みる (Thomas Linsky; Walter Fast; J Biomol Screen 16, 1089- 1097 )

#### 4 . 研究成果

##### 1)AKI 予期マーカーおよび ADMA/SDMA ELISA 作成に向けた基礎検討

初年度は ADMA の構造異性体である SDMA ( HPLC ) が初期の腎不全予測の有用なマーカーになることを見出した。次年度は治療法の確立と平行し予測マーカーの確立を目指し、SDMA の ELISA 作成を行ったが若干の抗体価上昇が見られるものの、血清希釈倍率 1/200 において、OD が>2.0 となっておらず、SDMA に対する抗原認識が弱いことが推測された。Linker-BSA にて免疫に変更しても抗体価上昇は KLH 時と同様であった。抗体は SDMA 特異的に結合する必要がある ELISA プレートの固体表面への特異的吸着を適用して、ファージディスプレイによる選択のために抗原を固定化した。プレート上で増殖するコロニーの数をモニタリングすることにより、抗原特異的 VHH によるファージ粒子の濃縮を評価する。結果、ADMA と SDMA の総量であれば測定可能となったが、単一アミノ酸の SDMA および ADMA の小さいサイズの特徴を考慮すると、特定の VHH バインダーを単離するのは非常に困難であった。2 つの抗原間にはメチル基の位置の違いが 1 つしかなく、非常に小さなエピトープが許容される必要がある。

##### 2)HTS 系の構築に向けた基礎検討

昨年構築した Linsky T らの方法 ( J Biomol Screen 2011; 16(9); 1089-97 ) に従った人工基質 S-methyl-L-Thiocitrulline(SMTC)を用いた蛍光測定法による DDAH-1 活性のアッセイ系を使用し、ヒト近位尿細管細胞(HRPTEC、Lonza、CC-2553)を用いて既知の 1,232 化合物 ( JST 戦略的創造研究推進事業;慶應義塾大学 ロット番号 : DE110207 ) の 10  $\mu$ M における DDAH-1 活性亢進作用の HTS を行った。なお本試験では尿細管細胞の内因性 DDAH-1 活性評価しているため、細胞の内因性 DDAH-1 活性だけを評価しているのではなく、DDAH-1 の発現増加や基質の取り込み亢進、細胞増殖のほか、作用メカニズムは多岐にわたる可能性がある。結果、ダルベポエチン ( ESA ) は低濃度では 1.5 倍ほどの活性をもち、HIF-PHD 阻害薬はコントロールと比較し約 3.5 倍~4.7 倍の DDAH 活性化効果をもつことが確認された。これら ESA、HIF-PHD 阻害薬を加え計 1,234 種の既知化合物から 9 種類 ( ポジティブコントロールを含む ) の hit を得た。これより DDAH 活性化薬を探索するための HTS 系の構築に向けた基礎検討は 100%達成できた。一方、DDAH 活性化薬は HIF-PHD 阻害薬で代替できる可能性も示唆された。なお既知の DDAH-1 阻害作用のある proton pump inhibitor の LANSOPRAZOLE は 0.9 倍であった。阻害活性を強く示す薬剤は無く、ratio をかなり高めめの 0.8 に設定して抽出した結果 DDAH-1 阻害作用を示した化合物として 8 化合物が抽出された。その他、本研究の蛍光測定法による DDAH-1 活性のアッセイ系は、平行した行った蛍光共鳴エネルギー移動 ( FRET ) システムを利用したバイオセンサーに加えた細胞内での変化を捉えるカウンターアッセイとして HTS で使用できると判断した。

これまで ADMA-DDAH 系は AKI の病態に深く関与していることを報告してきた。以上の結果より本研究ではさらに実践的なマーカー作成や HTS 系を確立できた。

#### 5 . 主な発表論文等

1. Nakayama Y, Ueda S, Yamagishi S, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine accumulated in the kidney during ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 85:570-8, 2014(査読有)
2. Yokoro M, Nakayama Y, Yamagishi S, Ueda S, Fukami K. Asymmetric Dimethylarginine

contributes to the impaired response to erythropoietin in CKD-Anemia. J Am Soc Nephrol.  
28:2670-2680,2017 (査読有)

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