

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08129

研究課題名(和文)細胞骨格制御に着目した尿毒症物質による心血管障害の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of Cardiovascular Injury Caused by Uremic Toxins Focusing on Cytoskeletal Regulation

研究代表者

牧田 愛祐 (Makita, Ayu)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70837038

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)：IS依存的な心血管系障害モデルマウスは、正常腎機能下ではISの高い血中濃度の維持が困難で、ヒト病態で見られる心肥大などの合併症の再現に至らなかったため、腎不全患者を模倣した病態モデルを検討した。その結果、腎不全モデルにより高いIS血中濃度を維持が可能となったが、解析期間において心肥大の発症は認められなかった。In vitroの検証では、IS処理後の心筋細胞において心筋細胞面積の増加・アクチン骨格の明らかな変化が認められ、ISが心筋障害に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病・透析患者では心血管疾患による死亡リスクが高く、インドキシル硫酸(IS)はその原因とされている。ISは健康人において腎臓から排泄されるが、腎不全患者では体内で高濃度に蓄積する。ISは透析では除去困難であり、心血管疾患の発症機序についても明らかでなく、予防治療法の開発が急務である。我々のin vitroの検証では、ISによる心筋細胞面積増加ならびにアクチン骨格変化が認められ、網羅的遺伝子発現解析からISの心筋細胞に対する細胞傷害性誘発に関わる候補遺伝子も明らかになった。In vivoでの更なる検証は必要であるが、本結果はISが心血管障害をもたらす分子機構解明の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the roles of indoxyl sulfate (IS) in cardiac hypertrophy, we injected IS into mice. However, IS-dependent cardiovascular disease mimicking human pathology was not observed due to the difficulty of maintaining high blood levels of IS under normal renal function. Further investigations using renal failure mice successfully achieved models with higher IS concentrations in the blood, but these mice did not show cardiac hypertrophy during the analysis period. In vitro experiments demonstrated an increase in cardiomyocyte area and morphological changes with an abnormal actin skeleton in cardiomyocytes after IS treatment, suggesting that IS may contribute to myocardial injury.

研究分野：腎臓内科

キーワード：インドキシル硫酸 心肥大 細胞骨格 腎不全

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) 患者のうち約 30%は心血管疾患を合併する。透析患者では心血管疾患による死亡数が全死亡数の約 40~50%を占め (National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2007) 本邦では透析患者の 5 人に 1 人が心不全により死亡しており極めて深刻な状況である。近年、CKD 患者の心筋障害を呈する病態の総称として、尿毒症性心筋症という概念が提唱されている (Xiaoliang W et al., *Vis Exp.* 2017)。特に、CKD ではアテローム性動脈硬化以外にも尿毒症物質そのものが直接的に血管障害を引き起こすことが報告されている (Gulinuer M et al., *Nephrol Dial Transplant.* 2009)。インドキシル硫酸 (IS) はトリプトファン由来のインドールが肝臓で硫酸抱合されることで産生される尿毒症性心筋症の原因候補分子として着目されている。IS は健常人において腎臓から排泄されるが、腎不全を罹患した患者では体内で高濃度に蓄積する。また、IS の血漿蛋白結合率は約 95%と高く、透析による除去も期待できないのが現状である (Itoh Y et al., *Anal Bioanal Chem.* 2012)。

2010 年、IS の受容体として Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) が同定された (Schroeder JC et al., *Biochemistry* 2010)。また、AhR はリガンドとの結合依存的に核内移行し、細胞増殖・薬物代謝関連タンパク質の発現を制御する転写因子であることも報告された。しかし、心血管系における AhR の発現パターンや IS/AhR シグナルによる転写制御、病態における機能解析についてはほとんど報告がなく今後の研究が期待されている。

2. 研究の目的

慢性腎臓病・透析患者では心血管疾患による死亡リスクが高く、予防治療法の開発が急務である。IS は原因候補分子として着目されている尿毒症物質であるが、透析では除去困難であり、心血管疾患惹起の作用機序が不明であるため、治療分子標的としての応用には分子機構解明が必須である。そこで、本研究では心血管系を構成する細胞群に対する IS の毒性について、細胞生物学的・分子生物学的手法を用いて明らかにすることとした。

また、IS の受容体は AhR であることが報告されているが、AhR 受容体を介した細胞骨格制御に関する報告はこれまで全くなく、AhR を臓器特異的に欠失させた遺伝子改変マウスを用いて、心筋障害における IS/AhR シグナルの役割を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vivo

IS 持続投与による心筋障害モデルの作製

C57BL/6 マウスの腹腔内に Alzet 浸透圧ポンプを埋め込み、IS 1170 $\mu\text{g}/\text{day}$ を 8 週間持続投与した。この IS 投与量・期間は、マウスへの侵襲や費用面から Alzet 浸透圧ポンプを用いて投与可能な最大量であった。

CKD モデルマウスに IS を持続投与することによる心筋障害モデルの作製

C57BL/6 マウスを正常食餌または 0.2%アデニン食にて 6 週間飼育し、0.2%アデニン食群では CKD を発症することを確認した。その後、C57BL/6 マウスを 0.2%アデニン食で飼育しながら IS の持続投与を 6 週間行うことで、心筋障害の誘導を試みた。

心筋障害については、心重量・心臓超音波検査・病理組織 (Masson-Trichrome 染色) での評価を行った。

(2) In vitro

野生型マウス心筋細胞への IS 処理

C57BL/6 新生仔マウスから心筋細胞を単離・培養し、IS 処理 (IS 1.0 mM, 6 日間) を行った。そして、これらの心筋細胞を用い、心筋細胞面積・細胞形態を解析し、溶媒対照群のものと比較した。

心筋特異的 AhR ノックアウトマウス心筋細胞への IS 処理

心筋特異的 AhR ノックアウトマウスの新生仔から心筋細胞を単離・培養し、IS 処理 (IS 1.0 mM, 6 日間) を行った。その後、と同様に、これらの心筋細胞の心筋細胞面積・細胞形態について解析し、溶媒対照群のものと比較した。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスに IS を持続投与することによる心筋障害モデルの作製

IS 依存的な心筋障害モデルマウスは、正常腎機能下で IS の高い血中濃度の維持が困難で、心肥大などの合併症を伴うヒト病態の再現には至らなかった。

(1) CKD モデルマウスに IS を持続投与することによる心筋障害モデルの作製

CKD モデルにより IS の高い血中濃度を維持できる個体が得られることを見出したが、解析した期間において心肥大の発症は認められなかった。

今回モデルとして用いたマウスモデルは急性腎障害モデルであるが、今後慢性腎不全モデルを含めた病態マウスを用いた更なる追加検討が必要である。

(2) 野生型マウス心筋細胞への IS 処理

野生型マウス心筋細胞において IS 処理により心筋細胞面積の増加ならびにアクチン骨格の著明な変化が認められ。IS 処理群および溶媒対照群の心筋細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、IS の心筋細胞に対する細胞傷害性誘発に関わる候補遺伝子を特定することに成功した (S100 ファミリー遺伝子や電位依存性カリウムチャンネル遺伝子)。

(2) 心筋特異的 AhR ノックアウトマウス心筋細胞への IS 処理

心筋特異的 AhR ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較し、IS 処理に伴う心筋細胞面積の変化が抑制される傾向があった。

(3) 結論

In vivo 実験においては、ヒト病態を再現できる IS 依存的な心毒性モデル評価系の更なる検証が必要であるが、*in vitro* の実験結果からは IS が心筋障害に寄与する可能性が考えられた。

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
研究分担者	坂上 倫久 (Sakaue Tomohisa) (20709266)	愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員) (16301)	
研究分担者	山口 修 (Yamaguchi Osamu) (90467580)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

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