

令和 6 年 4 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19340

研究課題名（和文）急性相蛋白質オロソムコイドによる蛋白尿抑制の分子基盤解明と慢性腎臓病治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of proteinuria suppression by the acute phase protein orosomuroid and its application to the treatment of chronic kidney disease

研究代表者

渡邊 博志（Watanabe, Hiroshi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・教授

研究者番号：70398220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病（CKD）の病態進展阻止には「蛋白尿」の軽減が重要課題である。一方、「蛋白尿」の出現要因として、慢性炎症と糸球体内皮細胞のバリア機能低下の関与が示唆されており、これら2つの要素を効果的に制御する薬剤が開発できれば、革新的な腎疾患治療薬となる可能性が期待される。本研究では1) AKI to CKD、2) アドリアマイシン腎症、3) 敗血症におけるオロソムコイド（ $\alpha$ 1-酸性糖蛋白質：AGP）の病態生理学的役割について、AGP-KOマウスを用いて解明した。また、各種病態モデルに対する外因的AGP投与の結果から、AGPがCKDに対する新規治療薬になる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根本治療の無いCKD患者の増加が懸念される中で、AGPを利用した本腎疾患治療戦略は、CKDの予防と治療に貢献するものと考えられる。また、AGPによる蛋白尿抑制の分子機構解明は、今後のCKD治療薬開発のブレークスルーになると思われ、その学術的意義や社会的意義は高い。また、今回用いたAGPは、献血由来の血漿成分から血液製剤成分を分取した後の廃棄血漿を用いて、自施設で単離・精製したものである。すなわち、AGPの活用は貴重な献血成分を有効活用する観点からも大変意義深いと思われる。

研究成果の概要（英文）：Reducing proteinuria is an important issue in preventing the progression of chronic kidney disease (CKD). On the other hand, it has been suggested that chronic inflammation and a decline in the barrier function of glomerular endothelial cells are involved in the appearance of proteinuria. If a drug that effectively controls these two factors can be developed, it is expected to have the potential to become an innovative drug for the treatment of kidney disease. In this study, we used AGP-KO mice to elucidate the pathophysiological role of orosomuroid ( $\alpha$ 1-acid glycoprotein: AGP) in 1) AKI to CKD, 2) adriamycin nephropathy and 3) sepsis. In addition, the results of exogenous AGP administration to various disease models showed that AGP may be a new therapeutic agent for CKD.

研究分野：医療薬学

キーワード：オロソムコイド AGP 蛋白尿 糸球体バリア 炎症 AKI to CKD

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は、末期腎不全・透析導入の予備群となるだけでなく、心血管疾患(CVD)の大きな危険因子でありその罹患者数は増加している。しかしながら、その根本治療は未だ確立しておらずアンメットメディカルニーズの一つとされている。この克服は医療経済的にも大きな課題であり、新しい観点からの治療法の開発が急務の課題とされている。近年、複数の臨床試験より、CKD患者における「蛋白尿」の出現は、末期腎不全への進展とCVD発症の予測因子となることが報告されてきた。言い換えれば、CKD病態進展の阻止には「蛋白尿」の軽減が重要である。一方、「蛋白尿」の出現要因として、慢性炎症と糸球体内皮細胞のバリア機能低下の関与が示唆されており、これら2つの要素を効果的に制御する薬剤が開発できれば、従来にない革新的な腎疾患の治療薬となる可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究では1) 急性腎障害(AKI) to CKD、2) アドリアマイシン腎症における急性相反応物質オロソムコイド( $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質:AGP)の病態生理学的役割について明らかにすることに加え、各種病態モデルに対する外因的AGP投与を行い、AGPがCKDに対する新規治療薬になる可能性について評価することを目的とした。

3. 研究の方法

動物モデルとして、1) 腎虚血再灌流によるAKI to CKDモデルマウス、2) ネフローゼ様モデルであるアドリアマイシン腎症マウスを用いた。投与に用いたヒト血漿由来AGPは、献血由来の血漿成分から血液製剤成分を分取した後の廃棄血漿(厚労省の許可のもとKMバイオロジクス株式会社よりFraction V上清を譲渡)を用いて、自施設で単離・精製して使用した。

4. 研究成果

(1) 腎虚血再灌流障害におけるAGPの病態生理学的役割に関する検討

近年、新たなCKD進展経路として着目され、持続的炎症を特徴とするAKI to CKD transitionにおける内因性AGPの役割について評価した。野生型(WT)マウスに腎虚血再灌流(IR)処置した結果、内因性AGPは腎IR8時間後から上昇し始め、1~2日後にピークに達し、7日後まで高いAGP濃度を維持した。そこで、WT及びAGP-KOに腎IR処置し、1日後の腎病態(AKI)を評価した結果、AGP-KOではWTと比較して腎機能マーカー(BUN, SCr)、尿管障害マーカー(Kim-1)発現、尿管障害スコアの上昇に加え、IL-6、TNF- $\alpha$ 発現が上昇した。続いて、腎IR処置14日後(CKDへの移行)の腎病態を評価した結果、腎機能はWTとAGP-KOともに腎IR前の値まで回復したにも関わらず、Kim-1発現、尿管障害スコア、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 発現はAGP-KOにおいて依然として高く、腎IR1日後では変化が認められなかったF4/80発現もAGP-KOで有意に上昇した。また、AGP-KOにおける腎病態の悪化は腎IR直後~7日後までのヒト由来AGP(hAGP)投与により抑制された。さらに、WTとAGP-KO由来の腹腔マクロファージにLPS炎症刺激を与えた結果、WTと比較しAGP-KO由来の細胞において24時間後のTNF- $\alpha$ 発現が有意に上昇した。マウスマクロファージ様細胞(RAW 264.7)に対するhAGPの前処置は、その後のLPS刺激によるIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 発現を有意に抑制した。従って、AKI後に上昇する内因性AGPは、炎症作用を介してAKI発症とAKI to CKD transitionに対して抑制的に機能することが明らかとなった(図1)。

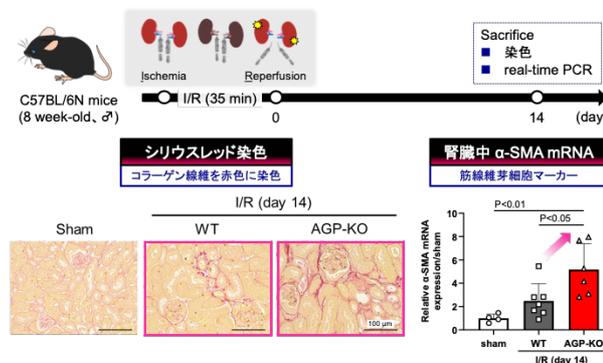


図1 AGP-KOマウスでは腎虚血再灌流による腎線維化が悪化する

(2) アルブミン尿に対する外因的hAGP投与の有用性及び腎保護機序の解明

アドリアマイシン(ADR)誘発ネフローゼ病態モデルを用いて、外因的hAGP投与の有用性を評

価した。BALB/c マウスに ADR を投与後、hAGP を 5 日間連日投与した。その結果、ADR 投与により上昇したアルブミン尿は、hAGP の投与により有意に抑制された。また、アルブミン尿の結果と対応するように、ADR 投与 21 日後における糸球体硬化及び尿細管障害は hAGP 投与によって有意に抑制された。さらに、ADR 投与 21 日後における糸球体中 AGP 量を免疫染色にて評価したところ、Control 群と比較して ADR 投与群では糸球体中 AGP が減少し、この減少は hAGP 投与により回復した。その際、ADR 投与により上昇した F4/80+細胞数、TGF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  発現は hAGP 投与により抑制された。この時、hAGP 投与によって、CD163 及び IL-10 発現が上昇し、iNOS 発現は抑制された。この結果から、hAGP の腎保護効果にはマクロファージの極性変化が関与している可能性を考え、ADR 投与 7 日後における腎組織を評価した。その結果、F4/80+細胞数は変化しないものの、腎マクロファージの CD163 発現は ADR 投与によって有意に抑制され、hAGP 投与によって回復する傾向が示された。そこで、PMA 分化 THP-1 細胞に hAGP を添加したところ、上記 in vivo の結果を支持するように、hAGP 濃度依存的に CD163 及び IL-10 発現が上昇し、CD206 及び iNOS 発現は有意に低下した。さらに、hAGP または IL-4/IL-13 誘導性のマクロファージに LPS を添加した結果、IL-4/IL-13 誘導性のマクロファージと比較して、hAGP 誘導性のマクロファージは有意に IL-10 発現を上昇させた。従って、AGP は高い抗炎症能を持つマクロファージを誘導することで腎保護的に働くことを明らかにした (図 2)。

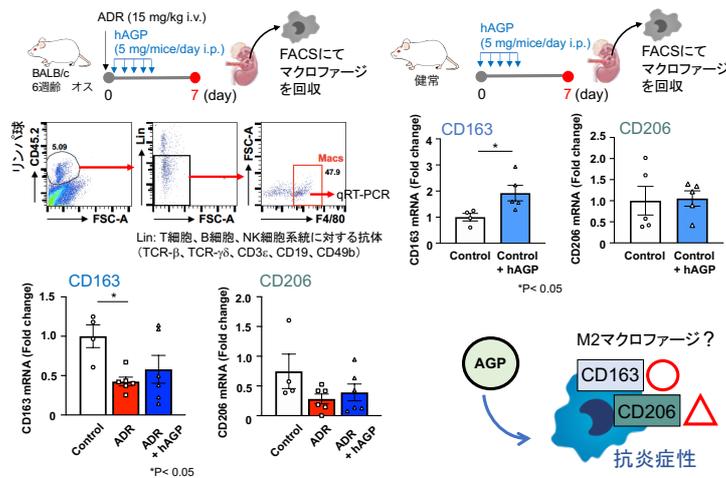


図 2 AGP は腎臓において CD163 陽性マクロファージを誘導する

### (3) 糸球体内皮バリア機能に対する AGP の保護効果

AGP の糸球体バリア機能における内因性 AGP の寄与を明らかにすべく、WT 及び AGP-KO の長期飼育を行なった。その結果、6 週齢から 60 週齢にかけて WT と AGP-KO の間に生存率、体重、アルブミン尿、血圧、ネフリン発現に差はなく、腎組織学的評価においても変化は観察されなかった。よって、内因性 AGP は健全状態(若年齢～中年齢)において糸球体バリア機能への影響は少ないことが示唆された。そこで、ADR 抵抗性である C57BL/6 系統マウスに対して ADR を投与した結果、WT ではアルブミン尿が生じなかったのに対し、AGP-KO においては ADR 投与 7 日後からアルブミン尿の上昇傾向が示され、ネフリン発現が健常の WT と比較し有意に低下した。さらに、ADR 投与 21 日後においては、WT+ADR 群と比較し、AGP KO+ADR 群で有意なアルブミン尿の上昇が観察

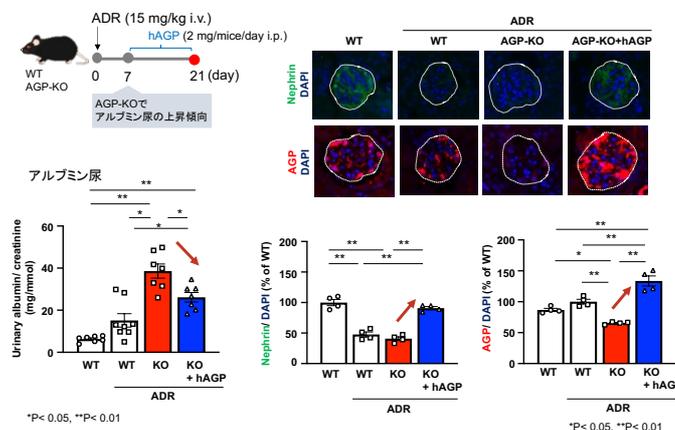


図 3 AGP は腎糸球体保護的に作用する

された。この時、F4/80 免疫染色、腎臓中 TGF- $\beta$  及び IL-1 $\beta$ 、CD163 発現は WT+ADR、AGP KO+ADR 群で変化は見られなかった。加えて、ADR 投与 21 日後において WT+ADR 群及び AGP-KO+ADR 群ともに健常 WT と比較し有意に糸球体ネフリン発現が減少した。これらの結果より、AGP-KO+ADR 群でアルブミン尿が上昇した機序には、炎症とネフリン発現は関与していない可能性が示唆された。そこで、糸球体中 AGP 局在を評価した結果、WT+ADR 群では AGP-KO+ADR 群と異なり糸球体に AGP の存在が認められた。また、AGP-KO+ADR 群に対し ADR 投与 7 日後から hAGP を投与することで、アルブミン尿、糸球体中ネフリン発現は回復し、糸球体中に hAGP の局在を確認した。すなわち、AGP は糸球体障害時には抗炎症作用とは独立して糸球体保護的に働くことが示された。従って、内因性 AGP は健常状態では寄与が少ないものの、糸球体障害時には糸球体保護的に働き、アルブミン尿抑制作用を有することを明らかにした (図 3)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Takano M, Toda S, Watanabe H, Fujimura R, Nishida K, Bi J, Minayoshi Y, Miyahisa M, Maeda H, Maruyama T	4. 巻 14
2. 論文標題 Engineering of a long-acting bone morphogenetic protein-7 by fusion with albumin for the treatment of renal injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14071334	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 Watanabe H, Fujimura R, Hiramoto Y, Murata R, Nishida K, Bi J, Imafuku T, Komori H, Maeda H, Tanaka M, Matsushita K, Fukagawa M, Maruyama T	4. 巻 11
2. 論文標題 alfa1-acid glycoprotein, an acute phase protein, mitigates AKI to CKD progression through its anti-inflammatory action	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87217-8	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 Arimura N, Watanabe H, Kato H, Imafuku T, Nakano T, Sueyoshi M, Chikamatsu M, Tokumaru K, Nagasaki T, Maeda H, Tanaka M, Matsushita K, Maruyama T	4. 巻 15
2. 論文標題 Advanced Oxidation protein products contribute to chronic-kidney-disease-induced adipose inflammation through macrophage Activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins15030179	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 Recombinant long-acting thioredoxin ameliorates AKI to CKD transition via modulating renal oxidative stress and inflammation	4. 巻 22
2. 論文標題 Nishida K, Watanabe H, Murata R, Tokumaru K, Fujimura R, Oshiro S, Nagasaki T, Miyahisa M, Hiramoto Y, Nosaki H, Imafuku T, Maeda H, Fukagawa M, Maruyama T	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 5600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22115600	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野武大、渡邊博志、今福匡司、田中元子、松下和孝、深川雅史、前田仁志、丸山徹
2. 発表標題 尿毒素インドキシル硫酸によるmTORC1を介した腎線維化作用
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊博志
2. 発表標題 腎病態を制御するアルブミン融合蛋白質の創製
3. 学会等名 第3回超分子薬剤学FGシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳丸碧海、今福匡司、渡邊博志、佐藤崇雄、稲住知明、前田仁志、杉本幸彦、丸山徹
2. 発表標題 AKI to CKD transition抑制効果に関する 3系脂肪酸代謝物の同定
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村菜々華、渡邊博志、加藤大雅、田中元子、松下和孝、前田仁志、丸山徹
2. 発表標題 蛋白質過酸化物質AOPPsによるCKD誘発サルコペニアの分子機構解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村侑加、渡邊博志、佐藤崇雄、我那覇悠人、湯本奈緒、松浦叶子、丸山徹
2. 発表標題 急性相反応物質 1-酸性糖タンパク質による脂質代謝と不安様行動との関係
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西野入 彩乃、渡邊 博志、前田 仁志、丸山 徹
2. 発表標題 糖・脂質代謝異常における急性相反応物質 1-酸性糖タンパク質の関与
3. 学会等名 第2回ダウン症基礎研究会熊本大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湯本奈緒、渡邊博志、藤村留衣、前田仁志、丸山徹
2. 発表標題 糸球体内皮バリア機能に対する 1-酸性糖タンパク質の保護効果
3. 学会等名 第2回ダウン症基礎研究会熊本大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Nakamura, Hiroshi Watanabe, Issei Fujita, Yuto Ganaha, Hitoshi Maeda, Toru Maruyama
2. 発表標題 Utility of AGP KO mice to assess the contribution of AGP in drug pharmacokinetics
3. 学会等名 日本薬物動態学会第38回年会/第23回シトクロムP450国際会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西野入 彩乃、渡邊 博志、前田 仁志、丸山 徹
2. 発表標題 肥満病態進展における急性相反応物質 1-酸性糖タンパク質の関与
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Nakamura, Hiroshi Watanabe, Issei Fujita, Yuto Ganaha, Hitoshi Maeda, Toru Maruyama
2. 発表標題 Utility of AGP-KO mice to assess the contribution of AGP in drug pharmacokinetics
3. 学会等名 Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nao Yumoto, Hiroshi Watanabe, Shunsuke Kamei, Takashi Minami, Hitoshi Maeda, Toru Maruyama
2. 発表標題 The pathophysiological role of 1-acid glycoprotein (AGP) in LPS-induced sepsis
3. 学会等名 Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西野入綾乃、渡邊博志、前田 仁志、丸山 徹
2. 発表標題 NAFLD病態進展における 1-酸性糖蛋白質の関与と分子機構解明
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

薬剤学分野HP  
<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

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	丸山 徹  (Maruyama Toru)  (90423657)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授    (17401)	

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