

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390033

研究課題名(和文)トランスポーターを介した腎不全悪性サイクルの遮断と治療

研究課題名(英文)Blockade of renal malignant cycle by transcriptional regulation of SLC0 transporter

研究代表者

阿部 高明 (ABE, Takaaki)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：80292209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：CKDにおいて体内に蓄積する尿毒症物質は炎症や酸化ストレスなどを惹起し腎障害を悪化させまた尿細管に発現するトランスポーターの発現にも影響を与え尿細管分泌を介した薬物や代謝物質の排泄を障害する可能性が示唆されている。我々は尿毒症物質インドキシル硫酸が濃度依存性にSLC04C1の発現を低下させることを明らかにした。一方、インドキシル硫酸は腎エリスロポエチン遺伝子の転写を有意に低下させ、このEpo転写抑制作用はSLC04C1と同じGATA阻害剤にてキャンセルされることが明らかになった。この結果は尿毒症物質の蓄積がトランスポーターの発現抑制と腎性貧血の原因と治療ターゲットになることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The accumulated uremic toxins inhibit the expression of various renal transporters and this inhibition may further reduce renal function and subsequently cause the accumulation of uremic toxins. Indoxyl sulfate, one of the potent uremic toxins, directly suppresses the renal-specific organic anion transporter SLC04C1 expression through a transcription factor GATA3. Administration of indoxyl sulfate in rats reduced renal expression of slco4c1 and under this condition, plasma level of guanidinosuccinate, one of the preferable substrates of slco4c1, was significantly increased without changing plasma creatinine. Furthermore, in 5/6 nephrectomized rats, treatment with oral adsorbent AST-120 significantly decreased plasma indoxyl sulfate level and conversely increased the expression of slco4c1. These data suggest that the removal of indoxyl sulfate and blocking its signal pathway may help to restore the SLC04C1-mediated renal excretion of uremic toxins in CKD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：トランスポーター 尿毒症物質 GATA AhR

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)は心血管疾患の強力な独立した危険因子であり、日本も含め世界中で人口の10%以上が罹患していると言われている。CKDでは腎機能の低下とともに腎不全物質が体内に蓄積してくるが、その中で生体に対し毒性を発揮するものを特に尿毒症物質という。尿毒症物質は炎症や酸化ストレスなどを惹起し腎障害を悪化させ、さらにその腎障害が尿毒症物質の蓄積を促進するという悪循環が存在する。さらに尿毒症物質の蓄積は糸球体濾過の低下を招くだけでなく、尿細管に発現するトランスポーターの発現にも影響を与え、尿細管分泌を介した薬物や代謝物質の排泄を障害する可能性が示唆されている。しかしながらCKD時における尿毒症物質によるトランスポーターの発現制御機構はこれまで明らかにされていない。

今日までに我々はヒト近位尿細管血管側に発現するSLC04C1トランスポーターを単離し、SLC04C1が尿毒症物質の排泄を行うトランスポーターであり、SLC04C1の発現を増強させることにより血圧や腎内の炎症が改善することを報告した。一方CKDにおいてはSLC04C1の発現が低下することが明らかとなり、腎機能低下時には十分な尿毒症物質の排泄が行われていない可能性が考えられたが、このSLC04C1抑制のメカニズムはいまだ不明であった。SLC04C1の発現増強をCKDの新たな治療法として確立するためには、CKDにおいてSLC04C1が抑制されるメカニズムの詳細を明らかにする必要があると考えられた。加えて貧血はCKDの最も重要な合併症の一つである。CKDにおける貧血の主要な原因の一つは適切なエリスロポエチン(EPO)の産生が障害されることであるが、このメカニズムはほとんど明らかにされていない。腎機能が低下に伴い腎臓のトランスポーターの発現が低下する。その低下と共に尿毒症物質の体内への蓄積が増え腎臓を悪化させ、腎障害が尿毒症物質の蓄積を促進する悪性サイクルが起きる。申請者は有機アニオントランスポーターSLC04C1が尿毒症物質の排泄に重要な蛋白であり、抗高脂血症スタチンがSLC04C1の発現を上昇させ腎不全物質の排泄を促すことを見いだした。さらにCE-MSを用いたメタボローム解析から腎不全患者には20以上の新たな腎不全物質の存在を明らかにした。それら物質はSLC04C1の発現を抑制し同時に腎性貧血を惹起することが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究はSLC04C1を腎不全治療の中心的なターゲット蛋白と位置づけその転写を介した誘導薬剤の探索と検証SOC04C1並びにエリスロポエチン産生抑制解除法の検討を行い、悪性サイクルの遮断と新たな腎不全の診断法、治療薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞培養

ヒト腎由来細胞株 ACHN 細胞、近位尿細管由来細胞株 HK-2 細胞、肝細胞由来細胞株 Hep3B 細胞はいずれも ATCC より購入した。

### (2)ウエスタンブロッティング

細胞抽出液は RIPA バッファーを用いて作製した。20  $\mu$ g の蛋白質を等量のサンプルバッファーと混合し、10%ポリアクリルアミドゲルにて泳動を行った。一次抗体は抗 GATA3 抗体 (H-48, Santa Cruz) あるいは抗 SLC04C1 抗体 (E-13) を PBS-T で 200 倍希釈し 4 で一晩反応させた。二次抗体は Anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (PIERCE) を PBS-T で 1000 倍希釈して使用した。発色は ECL plus (GE Healthcare) を用い LAS-4000 mini (FUJI FILM) にて撮影を行った。

### (3)ACHN 細胞における GATA3 の過剰発現

ヒト GATA3 cDNA (pF1KB8362) をかずさ DNA 研究所より購入し、open reading frame を哺乳動物細胞用発現ベクター (pFC14K, Promega) にサブクローニングした。ACHN 細胞に GATA3 発現プラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を添付文書に沿って用いトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で細胞を回収し定量リアルタイム PCR を行った。

### (4)GATA3 のノックダウン

ACHN 細胞に対し GATA3 特異的 siRNA (HSS142154, Invitrogen) またはネガティブコントロール siRNA (12935-112, Invitrogen) を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い Reverse transfection 法で siRNA の最終濃度が 33 nM になるようトランスフェクションした。その後再度培養を 36 時間から 72 時間まで 4 種類に振って行い、細胞を回収し定量リアルタイム PCR もしくはウエスタンブロッティングを行った。

### (5)定量リアルタイム PCR

total RNA を Tripure Isolation Reagent (Roche) にて添付文書に沿って抽出し、逆転写を Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) にて添付文書に沿って行った。定量リアルタイム PCR はプライマーに TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用い、Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を添付文書に沿って使用し行った。

### (6)ルシフェラーゼアッセイによる SLC04C1 プロモーター活性の測定

ヒト SLC04C1 遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片 (129 bp, 504 bp, 3886 bp の 3 種類) を PCR にて増幅し、増幅した断片を pGL3 basic luciferase expression vector (Promega) に挿入した。24 穴細胞培養用プレートを用い、ACHN 細胞に 2  $\mu$ g の上記コンストラクトと 100 ng の Renilla Luciferase

Reporter Vector pRL-TK (Promega) を ACHN 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用い活性を測定した。

(7)SD ラットにインドキシル硫酸投与  
6 週齢の SD ラットを日本チャールズリバーより購入した。7 週齢の時点でラットを 2 群に無作為に振り分け (コントロール群 5 匹, IS 群 5 匹)、インドキシル硫酸カリウム (BIOSYNTH CHEMISTRY & BIOLOGY) を飲水に 0.1% で溶解し自由飲水にて投与した。4 週間投与の後、麻酔下に安楽死させ血漿と組織を採取した。

(8)腎不全ラットに対する AST-120 投与  
8 週齢の Wistar ラットを 9 週齢の時点で Sham 手術または 5/6 腎摘を施行した。術後 10 週間経過観察し病態を安定させた後、クレアチニンクリアランス (Ccr) を測定し 5/6 腎摘を施行したラットのうち Ccr が 1.0-2.5 ml/min のものを 2 群に振り分けた (コントロール群 17, AST-120 群 15)。AST-120 は粉餌 (CE-2, 日本クレア) に 8% (w/w) で混合し投与した。Sham 群 (n=6) とコントロール群には粉餌のみを与えた。4 週間投与の後、麻酔下に安楽死させ血漿と組織を採取した。全ての動物実験は東北大学動物実験センターの承認を受け、東北大学における動物実験等に関する規程を遵守し行った。

#### 4. 研究成果

(1)尿毒症物質の SLC04C1 発現に対する効果の検討

CKD において SLC04C1 の発現を直接低下させる尿毒症物質を同定するため、まず腎細胞由来培養細胞株である ACHN 細胞を、各種腎不全物質を含んだ培地で培養し SLC04C1 mRNA の発現が低下するかを定量リアルタイム PCR で検討した。スクリーニングには、我々が以前 CKD 患者の血清をキャピラリー電気泳動質量分析系 (CE-MS) にて解析し同定した、eGFR の低下とともに血中に蓄積する腎不全物質を主に用いた。検討した物質の中で、インドキシル硫酸が有意に SLC04C1 mRNA の発現を低下させることが明らかとなった。その他の腎不全物質では明らかな変化は認められなかった。次に SLC04C1 の発現する近位尿細管の細胞環境により近い条件でも確認するため、近位尿細管由来培養細胞株である HK-2 を用いてインドキシル硫酸の SLC04C1 mRNA に与える影響を検討した。HK-2 細胞においてもインドキシル硫酸は SLC04C1 mRNA の発現量を有意に低下させ、この効果は濃度依存性を示した。

(2) SLC04C1 発現に対する GATA 転写因子の関与の検討

次にこのインドキシル硫酸の作用のメカニズムを明らかにするため、SLC04C1 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。以前我々は SLC04C1 遺伝子のプロモーター領域 (-126) に xenobiotic-responsive element (XRE) 配列が 2 個並んで存在し、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンが aryl hydrocarbon receptor (AhR)-XRE 系を介して SLC04C1 の発現を亢進さ

せることを報告した。今回は XRE 配列のさらに上流に GATA 配列が複数存在することに着目した。GATA 配列は GATA 転写因子が作用するモチーフで、GATA 転写因子は標的遺伝子を負に制御していることが知られている。そこで GATA 転写因子が SLC04C1 の発現に影響するかを確認するため、特異的 GATA 阻害薬である K-7174 を用い SLC04C1 mRNA 発現の変化を検討した。その結果、K-7174 は濃度依存性に SLC04C1 mRNA の発現を増強させることが明らかとなった。さらに K-7174 は IS による SLC04C1 mRNA 発現の抑制効果を完全にキャンセルした。

次に GATA 転写因子が直接 GATA 配列を介して SLC04C1 遺伝子を制御するかを明らかにするため、3 種類の長さの SLC04C1 プロモーター領域をサブクローニングしたルシフェラーゼレポーターコンストラクトを ACHN 細胞にトランスフェクションし、K-7174 による GATA 阻害作用の効果を検討した。-3886 bp のコンストラクトと -504 bp のコンストラクトでは K-7174 添加によりプロモーター活性がコントロールに比較し有意に上昇したが、GATA 配列を持たない -129 bp のコンストラクトでは K-7174 による効果が消失した。

以上の結果より、GATA 転写因子が SLC04C1 遺伝子のプロモーター領域に存在する GATA 配列を介して SLC04C1 遺伝子の転写を負に調節することが示唆された。これまで GATA 転写因子群の中で GATA2 と GATA3 は腎に発現し、腎の発生に必須であることが報告されている。そこでインドキシル硫酸が GATA2 および GATA3 の発現に及ぼす影響を検討した。その結果 GATA2 mRNA は明らかな変化を認めなかったが、GATA3 mRNA は IS により濃度依存性に発現が亢進することが明らかとなった。

(3) GATA3 の SLC04C1 発現制御の検討

次に GATA3 が SLC04C1 の発現を制御するかを検討するため、GATA3 の過剰発現とノックダウンを行い SLC04C1 の発現の変化を確認した。ACHN 細胞に一過性に GATA3 を過剰発現させたところ、GATA3 mRNA はコントロールと比較し約 44,500 倍に増加し、SLC04C1 mRNA の発現はコントロールに比べ有意な減少を認めた。次に GATA3 の発現を GATA3 特異的 siRNA を用いノックダウンした。GATA3 siRNA のトランスフェクションにより GATA3 mRNA は 80% 以上のノックダウン効果が得られ、GATA3 ノックダウンにより SLC04C1 mRNA 発現量は時間依存性に増加していくことが明らかとなった。ノックダウン後 72 時間において GATA3 蛋白質はコントロールに比較し 52% まで減少し、逆に SLC04C1 蛋白質はコントロールに比較しおよそ 3 倍に増加した。以上の結果より GATA3 は SLC04C1 の発現を抑制的に制御していることが示唆された。

(4) *In vivo* におけるインドキシル硫酸の SLC04C1 発現抑制作用

次に *in vivo* におけるインドキシル硫酸の効果を検討するため、SD ラットに対し 4 週間インドキシル硫酸を飲水投与した。インドキシル硫酸投与によっても体重、腎重量はコントロールと比較し変化は認められなかった。また明らかな組織学的変化も認められなかった。実験終了時点で血中インドキシル硫酸濃度はコントロール群に比較し有意に上昇していた。腎の膜分画を用いたウエスタンブロッティングにおいて、インドキシル硫酸投与群では

slco4c1発現がコントロールと比較し有意に減少していた。さらにslco4c1の免疫染色においてもインドキシル硫酸投与群ではslco4c1の陽性面積の減少が認められた。加えて血漿のLC-MS分析により、slco4c1トランスポーターの基質の尿毒症物質のうち *trans*-aconinateとADMAは有意な変化が認められなかったものの、グアニジノコハク酸濃度がコントロールと比較し有意に上昇していることが明らかとなった。インドキシル硫酸投与により血中クレアチニン濃度は全く変化が見られておらず、この変化は糸球体濾過の低下によるものではなく、slco4c1による排泄が低下したためと考えられた。以上の結果よりインドキシル硫酸は生体において腎のslco4c1の発現を抑制し、腎における尿毒症物質の排泄を低下させることが示唆された。

#### (5)慢性腎不全におけるインドキシル硫酸除去の効果

CKDにおいて血中インドキシル硫酸濃度を低下させることでSLCO4C1の発現が増加するかを明らかにするため、Wistarラットに対し5/6腎摘を施行した上でAST-120を4週間投与しslco4c1発現に与える効果を検討した。5/6腎摘ラットにおいて血中インドキシル硫酸濃度はSham手術群と比較し有意に上昇し、AST-120の投与により血中のインドキシル硫酸濃度はSham手術群未満にまで低下した。4週間のAST-120投与により、AST-120投与群の腎slco4c1 mRNA発現量はコントロール群と比較し有意に高値を示した。

さらに血漿のLC-MS分析により、slco4c1トランスポーターの基質の尿毒症物質のうちグアニジノコハク酸濃度がコントロール群と比較し有意な低下を認めた。腎機能(Cr, Ccr)は両群で差は認めておらず、この結果は糸球体濾過の影響ではなく、slco4c1の発現が増加したことによる排泄促進効果によるものと考えられた。この結果は腎不全時においては尿毒症物質の蓄積はトランスポーターの発現抑制を起し尿毒症物質の更なる蓄積が進行し、同時に貧血を惹起するという2つの作用があること、そしてそのどちらの作用も転写因子という共通のメカニズムを介していることを明らかにしたものであり、転写因子GATAの阻害剤K-7174やAhR刺激剤がトランスポーターの発現増強作用と貧血改善作用を併せ持ち、新たな慢性腎臓病の治療のストラテジーになり得ることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計3件)

1. Mishima E., Inoue C., Saigusa D., Inoue R., Ito K., Ito S., Tomioka Y., Itoh K. and Abe T. Conformational Change in tRNA is an Early Indicator of Acute Cellular Damage with Prognostic Significance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014 May 15. pii: ASN. 2013091001. [Epub ahead of print](査読有り)

2. Akiyama Y., Kikuchi K., Saigusa D., Suzuki T., Takeuchi Y., Mishima E., Yamamoto Y., Ishida A., Sugawara D., Shima H., Toyohara T., Suzuki C., Souma T., Moriguchi T., Tomioka Y., Ito S. and Abe T. Indoxyl sulfate down-regulates SLCO4C1 transporter through up-regulation of GATA. *PLoS One* 8: e66518, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0066518. (査読有り)
3. Hurd TW, Edgar A. Otto EA, Mishima E, Gee HY, Inoue H., Inazu M., Yamada H., Halbritter J., Seki, G., Konishi M., Zhou W., Yamane T., Murakami S., Caridi G., Ghiggeri G., Abe T. and Hildebrandt F. Mutation of the Mg<sup>2+</sup> Transporter SLC41A1 Results in a Nephronophthisis-Like Phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24: 967-977, 2013 doi: 10.1681/ASN.2012101034 (査読有り)

##### [学会発表](計4件)

1. 秋山 泰利  
CE-MS を用いた透析患者の病態に特有な尿毒症物質の同定  
第56回日本腎臓学会学術総会  
2013年05月12日  
東京国際フォーラム
2. 佐原 利人  
エリスロポエチン産生を増強させる化合物群の探索と同定(その1)  
第56回日本腎臓学会学術総会  
2013年05月12日  
東京国際フォーラム
3. 鈴木 雄介  
エリスロポエチン産生を増強させる化合物群の探索と同定(その2)  
第56回日本腎臓学会学術総会  
2013年05月12日  
東京国際フォーラム
4. 三島 英換  
tRNAの挙動検知はDNAダメージよりも早期の虚血組織障害マーカーとなる  
第56回日本腎臓学会学術総会  
2013年05月10日  
東京国際フォーラム

##### [産業財産権]

- 出願状況(計2件)  
名称:腎機能障害の予防又は改善剤  
発明者:阿部 高明  
権利者:同上  
種類:特許、  
番号:2013-209539  
出願年月日:2013年10月04日  
国内外の別:国内
- 名称:エリスロポエチン産生促進剤  
発明者:阿部 高明

権利者：同上  
種類：特許  
番号：JP2013/006916  
出願年月日：2013年11月25日  
国内外の別：外国

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://plaza.umin.ac.jp/~takaabe/>

## 6．研究組織

(1)研究代表者  
阿部 高明 (ABE, TAKAAKI)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：80292209