

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23591212

研究課題名(和文) アニオン型尿毒症性物質群を除去するハイブリッド型人工腎臓の開発

研究課題名(英文) Development of artificial kidney for removal of anionic uremic toxins

研究代表者

鶴岡 秀一 (TSURUOKA, Shuichi)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50285798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はアニオン型尿毒症性物質の中でも、インドキシル硫酸のみならずp-cresyl sulphate、3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acidにもそれ以上に、培養平滑筋細胞増殖作用のあること、さらにその機序の一つとして細胞内情報伝達系分子のリン酸化を介することを明らかにし、これらの体内蓄積が腎不全患者の動脈硬化・血管イベントの発生に寄与する可能性を示した。またアニオン型尿毒症性物質を高率に分泌する培養尿管細胞を作成しこれをハイブリッド型人工腎臓に組み込むことで、これら毒素を除去できることも示した。

研究成果の概要(英文)：We found that anionic uremic toxins such as indoxyl sulfate, p-cresyl sulphate, and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid stimulated proliferation of cultured smooth vascular cells via phosphorylation of proteins related to cell signaling (such as MAP kinase). We also established cultured renal tubular cells with high transport rate of these toxins. We further established the systems of artificial kidney with high capacity to remove these toxins.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：尿毒症性物質 インドキシル硫酸 バイオ人工腎臓 尿管輸送

## 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全患者の予後は以前に比して改善してきたが、未だ非腎不全患者に比べ格段に不良である。これは、現行の透析療法では除去できず、腎臓のみならず心血管系など多くの臓器に悪影響を与える、蛋白結合型尿毒症性物質の存在による。このため、生体に必要な蛋白を除去することなく、かつこれらの蛋白結合型尿毒症性物質をも選択的に排泄できる血液浄化システムの開発が、今後の腎不全治療にとって必要とされている。これらの毒素の多くは有機アニオントランスポーター(OAT)を介して尿中へ排泄されることも判明しつつある。

## 2. 研究の目的

そこで本研究は研究期間終了までに(1)p-cresyl sulphate、3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan propionate(以下CMPF)など各種のアニオン型尿毒症性物質の中からインドキシル硫酸(IS)以上に腎不全患者の動脈硬化・血管イベントの発生に与関するものを明らかにすること、(2)さらにそれらおよびISをも除去できるハイブリッド型人工腎臓の作成すること、(3)さらにこれにより腎不全モデル動物体内から効率的に除去できる新しい血液浄化システムを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)培養血管細胞の増殖作用を指標とした各種蛋白結合型尿毒症性物質のスクリーニング:

培養血管平滑筋初代細胞(ラット、ヒト)に各種蛋白結合型尿毒症性物質(p-cresyl sulphate、CMPF、インドール酢酸、Guadinoacetic acid、ISなど)を添加し24時間時点で3H-チミジン取り込み能およびWST-1アッセイを用いて細胞増殖能を測定し、溶媒群と比較した。さらに増殖に伴うMAPキナーゼ、MEK、Aktなど細胞内情報伝達系活性化もウェスタンブロットで評価した。

(2)アニオン輸送体を発現した培養尿細管細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓の作成:

アニオン輸送体の代表としてアニオン交換輸送体を高発現させた培養尿細管細胞を用いて、p-cresyl sulphate、CMPFが輸送体基質か否かを明らかにした。基質か否かの指標としては尿毒素添加時の細胞内pH変化を用いた。

(3)アニオン輸送体を発現した培養尿細

管細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓による尿毒素の除去:

更にこの細胞を用いて申請者らが、これまで開発してきたハイブリッド型人工腎臓システム(図1参照)に上記細胞を大量、単層培養し、ISおよびCMPF輸送能を指標として有効性、好中球エラスターゼ遊離能と白血球数を指標として安全性を評価した。

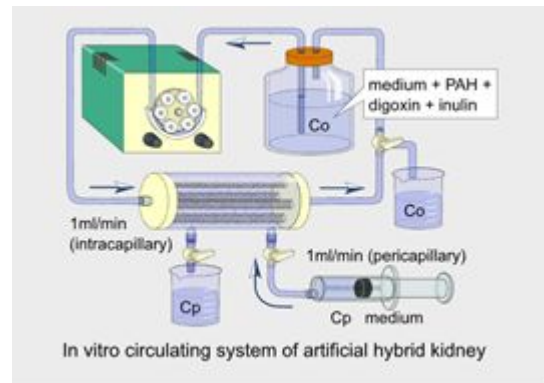


図1 ハイブリッド型人工腎臓システム

## 4. 研究成果

(1)培養血管細胞の増殖作用を指標とした各種蛋白結合型尿毒症性物質のスクリーニング:

ISのみならずp-cresyl sulphate、CMPF、ISなどで有意な細胞増殖効果を認めた(図2参照)。特にCMPFとp-cresyl sulphateでは、IS以上に著しい効果であった。さらに増殖に伴いMAPキナーゼ、MEK、Aktなど細胞内情報伝達系のリン酸化も有意に亢進していた。

(2)アニオン輸送体を発現した培養尿細管細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓の作成:

アニオン輸送体を発現した培養細胞では、各種尿毒素添加時の細胞内pHの変化は対照群に比べて有意に大きく、またその変化はアニオン輸送体阻害薬(フロセミド、プロベネシドなど)を添加することにより、有意に抑制された。これらの輸送能は対照細胞に比して有意に高いものであった(図2参照)。尚同時に測定したイヌリンのクリアランスはほとんどゼロであり、細胞間隙からのリークはないと考えられた。

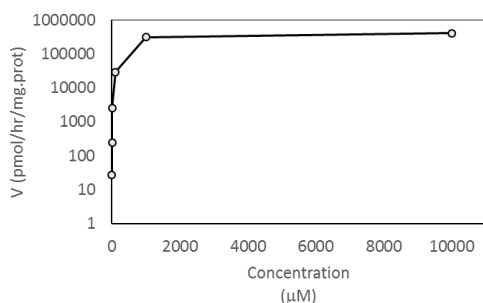


図 2 : IS による細胞増殖効果

(3) アニオン輸送体を発現した培養尿管細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓による尿毒素の除去:

またこの細胞をハイブリッド型人工腎臓システム上に、単層に隙間なく培養することが可能であった。更にモジュール上に培養した際の IS クリアランスは対照群に比して、有意に大であった(図 3 参照)。また安全性の指標においても特に重篤な変化は見られなかった。

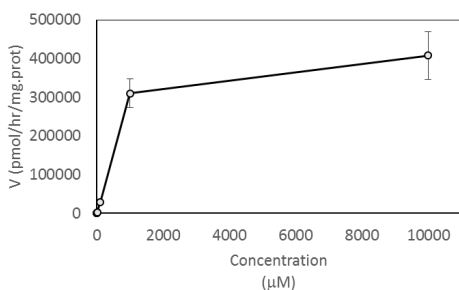


図 3 : IS クリアランス

以上をまとめると、p-cresyl sulphate、CMPF など各種のアニオン型尿毒症性物質には IS 以上の平滑筋細胞増殖刺激能があること、今回我々が作成したシステムには IS 以外の尿毒素も有意に除去可能であることが判明した。

## 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 5 件)

Schwartz GJ, Gao X, Tsuruoka S, Purkerson JM, Peng H, D'Agati V, Picard N, Eladari D, Al-Awqati Q. SDF1 induction by acidosis from principal cells regulates intercalated cell subtype distribution. *J Clin Invest.* 2015 Oct 26;125(12):4365-74.

Sakai Y, Otsuka T, Ohno D, Murasawa

T, Sakai S, Tsuruoka S. Clinical benefit of the change of dialysate calcium concentration from 3.0 to 2.75 mEq/L. *Ther Apher Dial.* 2014 Apr;18(2):181-4.

鶴岡秀一。腎臓における尿毒素排泄機構。日医大医会誌 9 : 235, 2013.

Tsuruoka S, Yokota N, Hayasaka T, Saito T, Yamagata K. Dialyzability and pharmacokinetics of sitafloxacin following multiple oral dosing in infected hemodialysis patients. *Ther Apher Dial.* 2013 Jun;17(3):319-24.

Araki N, Tsuruoka S, Hasegawa G, Yanagihara H, Omasa T, Enosawa S, Yamazoe Y, Fujimura A. Inhibition of CYP3A4 by 6',7'-dihydroxybergamottin in human CYP3A4 over-expressed hepG2 cells. *J Pharm Pharmacol.* 2012 Dec;64(12):1715-21.

〔学会発表〕(計 4 件)

鶴岡秀一、荒川裕輔、藤村昭夫。薬剤性腎障害に対する早期マーカー探索の試み。第 44 回日本腎臓学会東部学術大会。2014.10 東京。

鶴岡秀一、横田徳継、早坂常江、斎藤鉄男、山縣邦弘。維持透析患者におけるシタフロキサシンの透析性および薬物動態。第 58 回日本透析医学会学術集会・総会。2013.6 福岡。

Tsuruoka S, Hayasaka T, Yokota N, Saito, Yamagata K. Dialyzability and Pharmacokinetics of sitafloxacin following multiple oral dosing in infected hemodialysis patients. 2012 Renal Week. San Diego, CA, USA.

Tsuruoka S, Hayasaka T, Yokota N, Saito, Yamagata K. Dialyzability and Pharmacokinetics of oral levofloxacin in infected hemodialysis patients. 2011 Renal Week. Philadelphia, PA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴岡 秀一 (TSURUOKA, Shuichi)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50285798

(2)研究分担者

山縣 邦弘 (YAMAGATA, Kunihiro)  
筑波大学・医療医学系・教授  
研究者番号：90312850