

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700830
 研究課題名（和文） 食品由来タンパク質代謝物インドキシル硫酸による腎不全進行促進メカニズムの解析
 研究課題名（英文） The effects of food protein-derived metabolite, indoxyl sulfate, on progression of renal disease.
 研究代表者
 清水 英寿（SHIMIZU HIDEHISA）
 北海道大学・大学院農学研究院・特任講師
 研究者番号：10547532

研究成果の概要（和文）：慢性腎不全患者の血中において濃度上昇が観察されるインドキシル硫酸について、どのような分子を活性化させ、また発現誘導を導くか。そしてその結果として、どのようにして腎障害を導くのか解析を行った。インドキシル硫酸は、ERK、p38、JNK、NF- κ B、p53、Stat3、CREB を活性化させた。また、NADPH oxidase の 1 つである NOX4、TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、MCP-1、ICAM-1、アンジオテンシノーゲンといった分子の発現増加も確認し、インドキシル硫酸によるこれら分子の発現上昇に関わるシグナル経路についても同定を行った。上記の様な分子を介して、インドキシル硫酸は慢性腎不全時において観察されるマクロファージの浸潤、細胞老化、線維化を導く事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In patients with chronic kidney disease (CKD), serum indoxyl sulfate is elevated. Therefore, the present study examined what molecules are activated and expressed by indoxyl sulfate, and how indoxyl sulfate promotes CKD. Indoxyl sulfate activated ERK, p38, JNK, NF- κ B, p53, Stat3, and CREB in proximal tubular cells. In addition, the expression of NOX4, TGF- β 1, Smad3, α -SMA, MCP-1, ICAM-1, and angiotensinogen was upregulated. Current study demonstrated that indoxyl sulfate induced macrophage infiltration, cellular senescence, and fibrosis through activation and expression of above-mentioned factors in process of CKD progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用健康科学

科研費の分科・細目：生活習慣病

キーワード：慢性腎不全、尿毒症物質、トリプトファン代謝物、インドキシル硫酸、細胞老化、線維化、炎症反応

1. 研究開始当初の背景

日本には約 1300 万人の慢性腎不全患者がいるとされており、高齢化社会を迎える事でさらなる慢性腎不全患者の増加が予想され、それに伴う透析患者数も上昇すると考えられている。透析の医療費は国の完全負担であるため、このままだと国民医療費の破綻という社会問題を導きかねない。

よって、腎不全進行を遅延させる事で透析患者数の増加を抑える事は、透析導入による腎不全患者の QOL の低下を防ぐだけでなく、すでに世界第 1 位の透析大国である日本の国民医療費の増加に対する社会問題を解決する重要な手段と成り得る。

近年、日常生活を送る上で一般的に摂取している食品タンパク質から、腎不全の進行を促進する

物質が体内で生成されている事が明らかとなっている。この物質の1つが、食品タンパク質由来トリプトファン代謝物インドキシル硫酸である。インドキシル硫酸は、食品タンパク質中に含まれるトリプトファンが、俗に言う「悪玉細菌」によってインドールに置換され体内に吸収され、肝臓においてインドールがインドキシル硫酸へと代謝される。インドキシル硫酸は、腎臓が正常に機能している際は、尿として体外へ排泄されるが、腎機能に障害が起こると血中に蓄積され、さらなる腎機能の低下を導く事が知られている。現在、腎不全の進行遅延のための薬物療法として球形吸着炭が用いられており、この主な役割は血中インドキシル硫酸量の減少である。このようにすでにインドキシル硫酸が腎不全の進行に大きく関与している事が臨床面からも証明されている。球形吸着炭は、腎不全の進行遅延に対して大きな効果を持っているが、欠点としては、極度の便秘が副作用としてあり、加えて他の疾患に対する薬剤や各種ビタミンを除去してしまうため、腎不全患者のQuality of Life (QOL) を低下させてしまう事である。だが球形吸着炭の効果から、インドキシル硫酸の作用メカニズムを解明し、その作用機序を標的とする薬剤の開発や食品成分を発見する事は、腎不全患者のQOLの低下防止と腎不全の進行遅延に対して非常に有効な手段になる事は明らかである。しかし、インドキシル硫酸がどのようなメカニズムで腎不全の進行促進を導いているのか、その詳細は未解明の部分が非常に多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、インドキシル硫酸がターゲットとしている細胞の1つである腎臓近位尿細管細胞を用いて、その作用メカニズムの解析を行い、その結果がラットを用いた個体の腎臓、特に近位尿細管細胞が存在する腎皮質においても反映されているのか明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

<細胞を用いた解析>

ヒト近位尿細管細胞株であるHK-2細胞を用いた。インドキシル硫酸が活性化する、または発現誘導する分子について、各種阻害剤やsiRNAを用いて解析を行った。

<個体を用いた解析>

病態でのインドキシル硫酸の作用を確かめるために、正常ラット、慢性腎不全モデルである5/6腎摘出ラット、血中インドキシル硫酸濃度を低下させるAST-120を投与した5/6腎摘出ラットの3群を用いて、腎機能及び組織学的な解析を行った。また、インドキシル硫酸そのものが個体に与える影響を解析するために、食塩抵抗性ラット、インドキシル硫酸投与食塩抵抗性ラット、食塩感受性高血圧ラット、インドキシル硫酸投与食塩感受性高血圧ラットの4群で、腎機能及び組織学的な解

析、加えて各種遺伝子の発現レベルについて検討を行った。

4. 研究成果

<インドキシル硫酸によるマクロファージの浸潤メカニズム>

HK-2細胞において、インドキシル硫酸は、ERK、p38、JNK、NF- κ B、p53、Stat3を活性化する事で、MCP-1の発現を増加させた。また、インドキシル硫酸によるNF- κ Bとp53の活性化と活性酸素の産生は、ICAM-1の発現を誘導した。ラットにインドキシル硫酸を長期投与する事で、腎皮質において、MCP-1とICAM-1の発現が増加し、マクロファージの浸潤が観察された。以上の結果から、慢性腎不全における腎臓でのマクロファージの浸潤には、インドキシル硫酸が関与している事が確かめられた。

<インドキシル硫酸による細胞老化機構>

慢性腎不全モデルの腎臓においてStat3のリン酸化レベルは上昇しており、血中インドキシル硫酸濃度を低下させるAST-120を投与した慢性腎不全モデルラットでは、そのリン酸化レベルが低かった事から、インドキシル硫酸はStat3のリン酸化を導く事が示唆された。HK-2細胞でも同様に、インドキシル硫酸刺激によってStat3のリン酸化が観察された。すでにインドキシル硫酸によるNF- κ Bの活性化が、細胞老化を誘導する事を明らかにしていたため、NF- κ Bの発現と細胞老化に対するStat3の関与を調べたところ、Stat3をノックダウンする事で、NF- κ Bの発現増加と細胞老化の誘導が抑制された。以上の結果から、慢性腎不全時において観察される腎臓の細胞老化に、インドキシル硫酸が関与している事が確認された。

<インドキシル硫酸による線維化誘導>

HK-2細胞において、インドキシル硫酸によるp53の活性化はTGF- β 1の発現増加を導き、加えてERKの活性化はSmad3の発現も増加させた。インドキシル硫酸をHK-2細胞に48時間前処理後TGF- β 1刺激を行ったところ、Smad3のリン酸化の亢進が観察され、加えて線維化マーカー遺伝子の1つである α -SMAの発現が、TGF- β 1単独で刺激した際と比較して上昇していた。また、インドキシル硫酸長期投与したラットの腎臓において、TGF- β 1とSmad3の発現が増加していた。 α -SMAの発現増加がインドキシル硫酸長期投与によって導かれる事はすでに明らかにしている事から、HK-2細胞で得られたメカニズムは、個体においても機能している事が示唆された。以上の結果から、慢性腎不全での線維化の進行に、インドキシル硫酸が関与している事が明らかとなった。

<インドキシル硫酸によるアンジオテンシノーゲン発現上昇メカニズム>

慢性腎不全患者での近位尿細管において、アンジオテンシノーゲンの発現が上昇している事が知

られている。そこで、インドキシル硫酸を長期投与したラットの腎皮質でアンジオテンシノーゲンの発現を確認したところ、その増加が観察された。HK-2細胞においても同様に、アンジオテンシノーゲンの発現は増加していた。また、インドキシル硫酸は、CREBとNF- κ Bを活性化し、NADPH oxidaseの1つであるNOX4の発現増加を導いた。CREB、NF- κ B、NOX4をそれぞれの阻害剤やsiRNAを用いてノックダウンを行ったところ、これら3つの分子はお互いの発現を制御し合い、その結果として、それぞれがアンジオテンシノーゲンの発現増加に関わっている事が明らかとなった。以上の結果から、慢性腎不全時において観察される腎臓でのアンジオテンシノーゲンの増加に、インドキシル硫酸が関与している事が示唆された。

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6件)

1. Bolati D, Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- κ B. *BMC Nephrol.* 14: 56, 2013. (査読有)
2. Shimizu H, Saito S, Higashiyama Y, Nishijima F, Niwa T. CREB, NF- κ B, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304: C685-C692, 2013. (査読有)
3. Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate enhances p53-TGF- β 1-Smad3 pathway in proximal tubular cells. *Am J Nephrol.* 37: 97-103, 2013. (査読有)
4. Shimizu H, Yisireyili M, Higashiyama Y, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. *Life Sci.* 292: 143-148, 2013. (査読有)
5. Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Stat3 contributes to indoxyl sulfate-induced inflammatory and fibrotic gene expression and cellular senescence. *Am J Nephrol.* 36: 184-189, 2012. (査読有)
6. Shimizu H, Bolati D, Higashiyama Y, Nishijima F, Shimizu K, Niwa T. Indoxyl

sulfate upregulates renal expression of MCP-1 via production of ROS and activation of NF- κ B, p53, ERK, and JNK in proximal tubular cells. *Life Sci.* 90: 525-530, 2012. (査読有)

[学会発表] (計6件)

1. 清水英寿. 腎血管系の老化に対する尿毒症物質インドキシル硫酸の影響 創薬薬理フォーラム第20回シンポジウム 2012年09月27日~2012年09月28日 東京(日本薬学会 長井記念館)
 2. Niwa T, Nishijima F, Shimizu H. Stat3 is involved in indoxyl sulfate-induced inflammatory and fibrotic gene expression and cellular senescence in proximal tubular cells. American Society of Nephrology 2012年10月30日~2012年11月04日 San Diego, USA (San Diego Convention Center)
 3. Niwa T, Bolati D, Yisireyili M, Nishijima F, Shimizu H. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- κ B. American Society of Nephrology 2012年10月30日~2012年11月04日 San Diego, USA (San Diego Convention Center).
 4. Shimizu H, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. 16th International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease. 2012年06月26日~2012年06月30日 Honolulu, USA (Hilton Hawaiian Village).
 5. 清水英寿, デリナル ポラテ, ムテリフ グリヌル, アデリベキ イリシャテ, イスリ メメット, 下山泰彦, 東山幸弘, 西島冬彦, 丹羽利充. インドキシル硫酸によるMCP-1の発現メカニズムの解析 第55回日本腎臓学会 2012年06月01日~2012年06月03日 横浜(パシフィコ横浜)
 6. 清水英寿, デリナル ポラテ, ムテリフ グリヌル, アデリベキ イリシャテ, イスリ メメット, 下山泰彦, 東山幸弘, 西島冬彦, 丹羽利充. インドキシル硫酸によるTGF- β 1の発現制御機構及びTGF- β 1とのクロストークの検討 第55回日本腎臓学会 2012年06月01日~2012年06月03日 横浜(パシフィコ横浜)
6. 研究組織
(1)研究代表者

清水 英寿 (SHIMIZU HIDEHISA)
北海道大学・大学院農学研究院・特任講師
研究者番号：10547532