

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590177

研究課題名(和文)尿毒症物質排泄機構の制御による腎不全治療

研究課題名(英文)Therapeutics for renal failure by regulation of uremic toxin excretion

研究代表者

鈴木 健弘 (SUZUKI, Takehiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50396438

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)：慢性腎臓病(CKD)および急性腎傷害(AKI)で体内に蓄積する尿毒症物質(尿毒素)による腎組織障害、腎臓の尿毒素排泄トランスポーターSLC04C1や腎臓由来造血ホルモンのエリスロポイエチン(Epo)の発現の抑制が腎不全を進行させるため、申請者らはEpo産生培養細胞や腎臓由来培養細胞を用いたスクリーニングで腎疾患治療薬候補化合物として新規のインドール系化合物を見いだした。インドール系化合物は虚血再灌流とシスプラチンのマウスAKIモデルで腎機能と腎組織障害所見を改善した。尿細管由来培養細胞ではインドール系化合物は細胞内ATP量を増加させた。インドール系化合物は新規の腎疾患治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In patients with chronic kidney disease(CKD) and acute kidney injury(AKI), the uremic toxins might promote renal damages and anemia by cytotoxicities and repression of the expression of renal uremic toxin transporter SLC04C1 and hematopoietic hormone erythropoietin (Epo) produce in the kidney. We explored the new drugs for kidney disease by screening compounds library with Epo producing cells and kidney derived cells. We identified newly synthesized indole compounds and those compounds improved the renal functions and the kidney pathological scores in two mice AKI models, ischemic reperfusion injury-model and cisplatin nephropathy. The indole compounds increased the intra cellular ATP content in kidney derived culture cells. The indole derivatives could be the new therapeutic agents for kidney diseases.

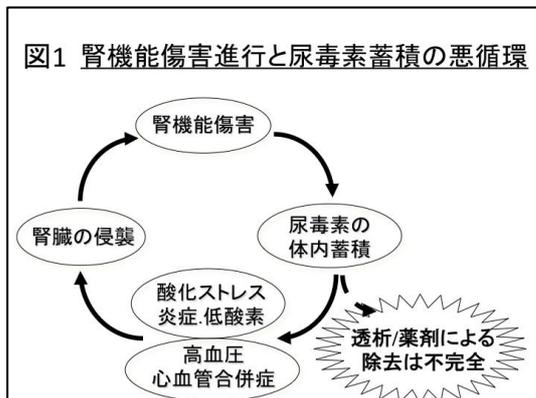
研究分野：腎臓内科

キーワード：尿毒素 慢性腎臓病 急性腎傷害 ミトコンドリア トランスポーター エリスロポイエチン シスプラチン 虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性腎傷害(AKI)と慢性腎臓病(CKD)は末期腎不全/透析導入の原因となり、心血管疾患の高率な合併により患者の高い死亡率と高額な医療費が世界的な課題である。AKIは腎臓の虚血や腎毒性物質により惹起される急性尿細管傷害及び尿細管・間質領域の炎症が主要な病態であるが、有効な治療法は確立されていない。AKIからの慢性化や生活習慣病(高血圧、糖尿病)、慢性腎炎を原因とするCKDにおいては尿細管細胞の萎縮/減少と尿細管・間質領域の線維化が病態の共通した進行像である。

AKI・CKDによる腎機能低下で患者体内に蓄積する尿毒素は尿毒症の原因物質群であり、酸化ストレスを惹起して組織の炎症や虚血・低酸素をもたらし、さらなる腎傷害と尿毒素蓄積を来すという悪循環を形成する(図1)。



(2) 尿毒素の蓄積は糸球体濾過率の低下のみならず、尿細管のトランスポーターの発現を低下させて尿細管分泌を介した腎排泄機能を障害する。我々は尿毒素によるトランスポーターの発現制御機構を解析し、尿毒素排泄トランスポーターであるSLCO4C1遺伝子の5'上流領域のGATA配列に注目した。GATA転写因子はIL-1やTNF-などの炎症性サイトカインによっても制御されており、炎症性サイトカインがGATAを介し炎症時に腎臓由来の造血ホルモンであるエリスロポイエチン(Erythropoietin:Epo)の発現を抑制することも報告されている(FASEB J.2002 16:1811)。腎不全進行時に腎臓からのEpo産生/分泌が低下することで腎性貧血が進行し、さらに腎不全にともなう全身症状と臓器傷害(尿毒症)を進行させる悪循環がここにも存在している。

(3) 我々は尿毒素であるインドキシル硫酸(indoxyl sulfate: IS)がGATAを介してSLCO4C1の発現を低下させることを示し、さらにEpo産生培養細胞株であるHep3B細胞を用いてISがEpo産生を抑制することも示した。すなわち、尿毒素の蓄積はトランスポーターの発現低下を介してさらなる蓄積を招き、Epo産生低下による腎性貧血の直接の原因ともなることが示唆された。尿毒素排泄トランスポーターの発現増強及び尿毒素

によるGATAを介したトランスポーター発現やEpo産生の抑制を解除する治療戦略は腎臓特異的かつ包括的な新規の腎疾患治療法となる可能性があった。

2. 研究の目的

本研究ではAKI/CKDにおいてSLCO4C1トランスポーターの発現が低下するメカニズムを解明し、AhR-XRE系リガンドによる発現増強作用と尿毒素による発現抑制の解除という2つの相補的な機序に基づく治療戦略により、効果的に尿毒素蓄積の悪循環を断ち切る新たなCKD治療法の開発を目指す。また、Epo産生培養細胞及び腎臓尿細管上皮細胞傷害モデルを用いたスクリーニングで同定されたEpo産生促進と細胞傷害抑制作用のある新規の化合物をマウス急性腎傷害モデルで検討し、AKI治療薬の探索を行う。

3. 研究の方法

(1)SLCO4C1/Epoの発現増強薬の探索:化合物ライブラリーを1)SLCO4C1及びEpoのプロモーターアッセイ、2)培養細胞株でのmRNA発現促進作用を指標にスクリーニングし、SLCO4C1及びEpoの発現促進薬候補化合物を選別して腎由来培養細胞で3)化合物単体の発現亢進効果と4)尿毒素の共投与による発現抑制解除効果を検証する。

(2)5/6腎摘ラット腎不全モデル、急性腎傷害モデルとしてマウス虚血再灌流(IRI)モデルやシスプラチン腎症モデルに候補薬剤を投与して、腎機能、腎組織病理による腎保護効果と尿毒素排泄促進効果を評価し、CKD/AKI治療薬としての生体内での作用を検証する。

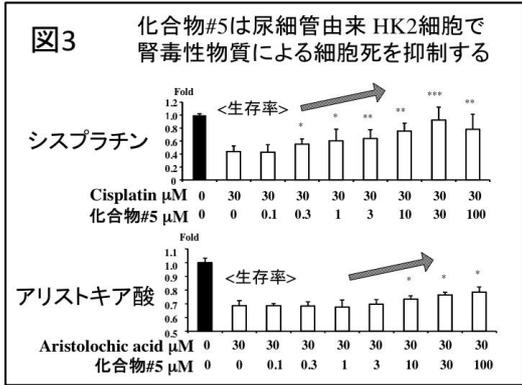
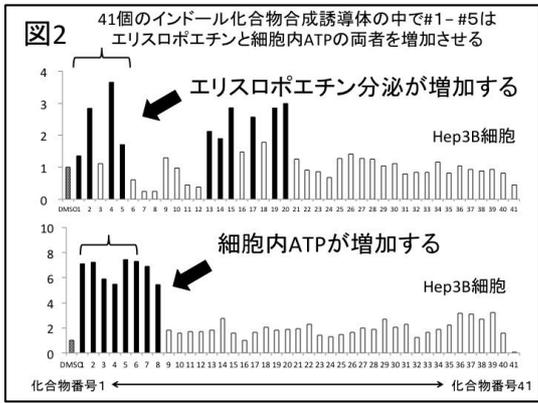
(3)腎臓由来培養細胞(ACHN, HK2, LLC-PK1)及びEpo産生細胞(Hep3B)を用いた腎疾患治療薬候補化合物単体投与及び腎毒性物質投与や虚血再灌流モデルなど病態細胞モデルへの化合物投与により化合物の細胞保護作用とそのメカニズムの解析を行う。

4. 研究成果

(1)申請者らはAKI/CKD進行の原因となる病態の解明のため腎不全患者と健常人の血清をメタボローム解析し腎不全患者に貯留する110種の物質を同定してその生体活性をスクリーニングした。

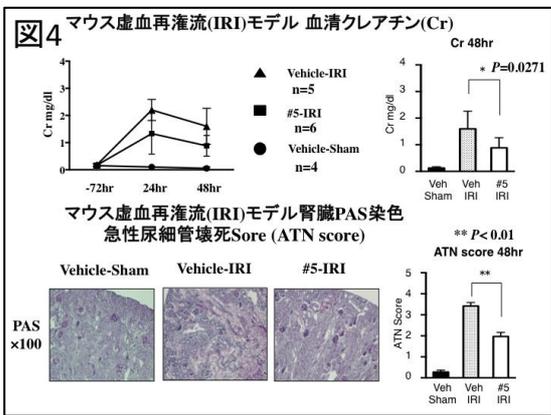
その結果、腎不全患者に貯留する物質のうち、あるインドール系化合物にエリスロポイエチン(Epo)産生を促進する作用があり、逆に腎不全進行を抑制する可能性があることを見出した。

そこでこのインドール化合物をリード物質として側鎖を改変し、新たに41種類の新規インドール化合物を合成してHep3B細胞によるEpo産生と細胞内ATP量によるスクリーニングを行ったところ、より強力なエリスロポイエチン産生増進とともに細胞内ATPを増加させる複数の化合物を見出した(図2)。



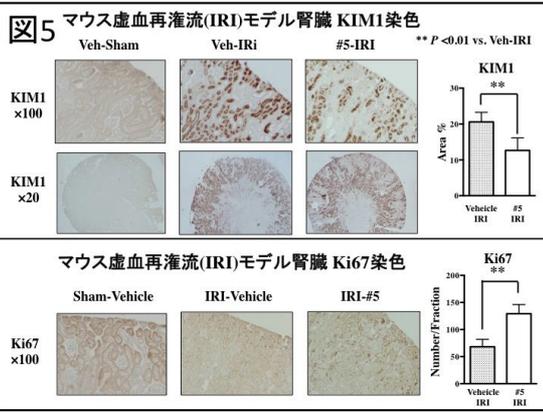
(2)このうちインドール化合物 No.5 (以後化合物#5)は尿管由来HK2細胞での腎毒性物質(抗癌剤のシスプラチン、薬剤性腎症の原因物質のアリストキア酸)による傷害モデルで尿管細胞死を濃度依存性に抑制した(図3)。

(3) *In vivo* ではマウス虚血再灌流(IRI)モデルに化合物#5を虚血手術前3時間、50mg/kg BWでマウスへの経口投与することより、再灌流後48時間で血清Cr値は有意に低下し腎機能の改善効果が認められ(図4上)、腎組織病理では尿管急性壊死像の減少を認めAcute tubular necrosis (ATN) scoreによる定量法で有意な改善を認めた(図4下)。



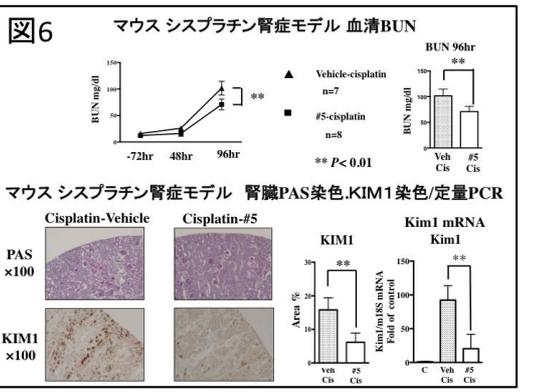
IRIモデルの腎免疫染色により急性尿管傷害マーカーであるKIM1陽性領域の有意な減少と尿管上皮再生を示すKi67核内蛋白

質陽性尿管上皮の有意な増加を認め、尿管上皮傷害細胞の減少と再生細胞の増加による機能的尿管細胞の維持が腎機能改善の原因となっていることが示唆された(図5)。



抗酸化ストレス遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子の発現はIRIモデルにおいて化合物#5投与群と対象群間で有意な差は認められなかった。シスプラチン腎症モデル(CIS-N)ではシスプラチン20mg/Kg BWの腹腔内投与後96時間に腎組織を評価した。化合物#5をシスプラチン投与3時間前に50mg/kg BWでマウスへの経口投与することより、シスプラチン投与後96時間の血清BUN値の有意な低下とともに急性尿管壊死像とKIM1陽性尿管領域の有意な減少を認め、シスプラチンモデルでもAKI所見の改善を認めた(図6)。

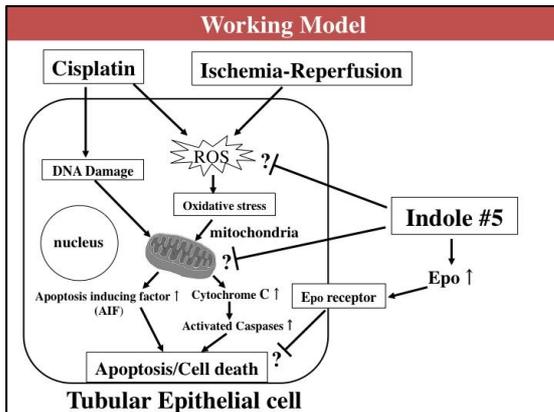
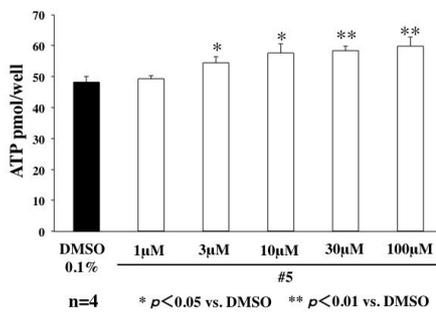
シスプラチン腎症モデルではKi67陽性細胞数と抗酸化ストレス遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子の発現では化合物#5投与群と対象群間で有意な差はなかった。



IRIとCIS-Nの異なる2つの急性腎傷害モデルで腎機能改善と腎組織傷害病理の改善を認め、化合物#5が急性腎傷害の治療薬として有効であることが示唆された。

(4)尿管上皮由来LLC-PK1細胞においては化合物添加(10 μM 24時間)で細胞内ATP量の有意な増加を認め、急性尿管傷害時の細胞保護作用のひとつにミトコンドリアATP産生の維持による細胞内ATP量の増加が示唆された(図7)。

図7 化合物#5は腎尿管由来LLC-PK1細胞で細胞内ATPを増加させる。



[今後の研究の展開]

本研究化合物#5による腎保護効果をIRIとCIS-Nの2つのAKIモデルにおいて検証した。化合物#5により細胞内ATP量が維持されることが示され、急性尿管傷を軽減する機序の1つとして細胞内ATP産生の90%以上を担うミトコンドリアの虚血/細胞毒素投与下での機能低下とアポトーシスシグナルを抑制することが示唆される。

また、腎臓で腎系球体濾過の選択的バリア機能を担う糸球体上皮細胞(podocyte)は尿管上皮と同様に豊富なミトコンドリアを有しており、その特異な細胞構造と機能を維持する為に活発な代謝を行う。糸球体濾過バリアの破綻により多量の蛋白尿が出現する治療抵抗性ネフローゼ症候群患者においてATP産生を担うミトコンドリア関連遺伝子異常が多数報告されている(*PDDS2*, *COQ2*, *COQ6*, *ADCK4*, Imasawa T. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013)。

今後は化合物#5のより広い適応を目指して、当初の研究計画で予定していた尿管結紮モデル(CKD, 線維化)やネフローゼモデルとしてPeuromycin/Adrimamycinによる薬剤性ネフローゼモデルでの有効性の検討と*in vivo*での腎保護メカニズムの検討を行っていく。

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 11件)

Takehiro Suzuki (11人中6番目). Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in

Gitelman Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015;26:271-279. 10.1681/asn.2013091013 査読有り

Takehiro Suzuki (15人中8番目).

Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014. Dec 18. [Epub ahead of print]. 10.1681/asn.2014060530

Takehiro Suzuki (36人中14番目).

Conformational change in transfer RNA is an early indicator of acute cellular damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014;25:2316-2326. 10.1681/asn.2013091001 査読有り

鈴木健弘, 伊藤貞嘉, 阿部高明 高血圧をめぐると最新の話題 臨床 二次性高血圧 1.腎血管性高血圧 最新医学 2014年11月増刊号 2014. Vol69.No11. 2377-2388 査読なし

Takehiro Suzuki (11人中4番目). Indoxyl sulfate down-regulates SLC4C1 transporter through up-regulation of GATA3. *PLoS One.* 2013;8:e66518. 10.1371/journal.pone.0066518 査読あり

鈴木健弘, 阿部高明

腎血管性高血圧症の診断と治療 特集: 治療抵抗性高血圧-原因と対策のキーワード Current Therapy 2013.Vol.31. No.2: 162-167 査読なし

Takehiro Suzuki (11人中8番目).

A metabolomic approach to clarifying the effect of AST-120 on 5/6 nephrectomized rats by capillary electrophoresis with mass spectrometry (CE-MS). *Toxins (Basel).* 2012;4:1309-1322. 10.3390/toxins4111309 査読あり

鈴木健弘, 阿部高明

腎血管性高血圧の診断 特集腎性高血圧と動脈硬化 腎・高血圧の最新治療 2012. Vo.1.No.1: 26-32 査読なし

鈴木健弘, (8人中1番). 慢性腎臓病患者のスタチンによる腎保護効果の検討 Therapeutic Research 2012;33:1196-1199. 査読なし

鈴木健弘, 阿部高明

尿毒素と腎線維化 医学のあゆみ 2012;240: 309-314. 査読なし

鈴木健弘 (9人中1番)スタチンによる尿毒症物質排泄トランスポーター発現制御と腎不全治療 Therapeutic Research 2012;33:201-203. 査読なし

[学会発表](計 29件)

鈴木健弘 Indole derivatives evoke renoprotective effects on acute kidney injury Renal week 2014, ASN, 13 November 2014, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania(U.S.A.)

島久登, 鈴木健弘(共同演者) Identification and Clinical Implication of Indole Derivatives Having Anti-Inflammatory and Antifibrotic

Effects. Renal week 2014, ASN, 14 November 2014, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania(U.S.A.)
大庭悠貴、**鈴木健弘**(共同演者) Indole Derivatives Enhance Epo Production through AhR-XRE Pathway and Induces Cell Protective Gene NQO1. Renal week 2014, ASN, 14 November 2014, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania(U.S.A.)
三島英換、**鈴木健弘**(共同演者) tRNA Conformational Change Is the Early Marker of Ischemic Tissue Injury. Renal week 2013, ASN, 9 November 2013, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia(U.S.A.)
鈴木健弘 Indole Derivatives Enhance Erythropoietin Production and Have Cytoprotective Effects. Renal week 2013, ASN, 8 November 2013, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia(U.S.A.)
秋山泰利、**鈴木健弘**(共同演者) Indole-3-Acetate Inhibits Erythropoietin Receptor Expression and Erythropoietin Signaling In Vitro Renal week 2013, ASN, 8 November 2013, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia(U.S.A.)
竹内陽一、**鈴木健弘**(共同演者) Exon-Skipping in Gitelman's Syndrome Families Renal week 2013, ASN, 7 November 2013, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia(U.S.A.)
鈴木雄介、**鈴木健弘**(共同演者) 腎動脈狭窄症32名に対する治療とその予後 平成25年5月26日 第2回臨床高血圧フォーラム JPタワーホール&カンファランス (東京都)
佐原利人、**鈴木健弘**(共同演者) エリスロポイエチン産生を増強させる化合物群の探索と同定(その1) 平成25年5月12日 第56回日本腎臓学会学術総会 東京国際フォーラム (東京都)
鈴木雄介、**鈴木健弘**(共同演者) エリスロポイエチン産生を増強させる化合物群の探索と同定(その2) 平成25年5月12日 第56回日本腎臓学会学術総会 東京国際フォーラム(東京都)
秋山泰利、**鈴木健弘**(共同演者) CM-MS を用いた透析患者の病態に特異的な尿毒症物質の同定 平成 25 年 5 月 12 日 第 56 回日本腎臓学会学術総会 東京国際フォーラム(東京都)
三島英換、**鈴木健弘**(共同演者) tRNAの挙動検知はDNAダメージよりも早期の虚血組織傷害のマーカーとなる 平成25年5月10日 第56回日本腎臓学会学術総会 東京国際フォーラム(東京都)
Takehiro Suzuki Transcriptional regulation of uremic toxin transporter SLCO4C1 by angiotensin type1 receptor blockers and thiazolidinedione 平成 24 年 11 月 21 日 第 27 回薬物動態学会年会 タワーホール船堀 (東京都)

鈴木健弘 Renoprotective effects of statin in patients with chronic kidney disease Renal week 2012, ASN, 3 November 2012, San Diego Convention Center, San Diego, California (U.S.A.)
秋山泰利、**鈴木健弘**(共同演者) Identifying the Uremic Compounds Specifically Involved in the Pathophysiology of Hemodialysis Patients by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Renal week 2012, ASN, 3 November 2012 San Diego Convention Center, San Diego, California, U.S.A.
秋山泰利、**鈴木健弘**(共同演者) Metabolomic Approach for clarifying the Effects of AST-120 in 5/6 Nephrectomized Rats by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. Renal week 2012, ASN, 2 November 2012, San Diego Convention Center, San Diego, California(U.S.A.)
青木靖子、**鈴木健弘**(共同演者) 慢性腎臓病患者のスタチンによる腎保護効果の検討 第 42 会日本腎臓学会頭部学術大会 平成 24 年 10 月 13 日 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター(新潟市)
池之内初、**鈴木健弘**(共同演者) ARB は慢性腎臓病患者において eGFR と相関せずメチルグリオキサールを減少させる 第 42 会日本腎臓学会頭部学術大会 平成 24 年 10 月 13 日朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター(新潟市)
鈴木健弘 アンジオテンシン type1 受容体ブロッカーは慢性腎臓病患者において eGFR と相関せずメチルグリオキサールを減少させる 第 35 回日本高血圧学会総会 平成 24 年 9 月 21 日 ウエスティンナゴヤキャッスル・名古屋能楽堂 (名古屋市)
鈴木健弘 アンジオテンシン type1 受容体ブロッカーとチアゾリジンは尿毒素排泄トランスポーターの発現を制御する 第 35 回日本高血圧学会総会 平成 24 年 9 月 21 日 ウエスティンナゴヤキャッスル・名古屋能楽堂 (名古屋市)
②**Takehiro Suzuki** Renoprotective effects of statin in patients with chronic kidney disease 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 平成 24 年 7 月 19 日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)
②**鈴木健弘** アンジオテンシン type1 受容体ブロッカーとチアゾリジンは尿毒素排泄トランスポーターの発現を制御する 第 7 回トランスポーター研究会年会平成 24 年 6 月 9 日京都大学農学部総合館 (京都市)
③**鈴木健弘** ARB は慢性腎臓病患者において eGFR と相関せずメチルグリオキサールを減少させる 第 55 回日本腎臓学会学術総会 平成 24 年 6 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜市)
④**鈴木健弘** ARB とチアゾリジンは尿毒素排泄トランスポーターの発現を制御する 第 55 回日本腎臓学会学術総会 平成 24 年 6 月 2 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

⑳秋山泰利、**鈴木健弘**(共同演者) SCLO4C1
トランスポーター発現低下による尿毒症物
質蓄積の悪循環の解明と新規治療法の開発
第 55 回日本腎臓学会学術総会 平成 24 年 6
月 2 日 パシフィコ横浜(横浜市)

㉑一條貞満、**鈴木健弘**(共同演者) 5-アミノレ
プリン酸は炎症時の Epo 産生能低下を改善
する 第 55 回日本腎臓学会学術総会平成 24
年 6 月 2 日パシフィコ横浜(横浜市)

㉒**鈴木健弘** アンジオテンシン type1 受容体
ブロッカーとチアゾリジンは尿毒素排泄ト
ランスポーターの発現を制御する第 1 回臨
床高血圧フォーラム 平成 24 年 5 月 13 日
千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中
市)

㉓**鈴木健弘** アンジオテンシン type1 受容体
ブロッカーは慢性腎臓病患者において eGFR
と相関せずメチルグリオキサールを減少さ
せる 第 1 回臨床高血圧フォーラム 平成 24
年 5 月 12 日 千里ライフサイエンスセンタ
ー(大阪府豊中市)

㉔秋山泰利、**鈴木健弘**(共同演者) 尿毒症物質
によるエリスロポイエチン産生低下の発症
機序の解明 第 85 回日本内分泌学会学術総
会 平成 24 年 4 月 21 日 名古屋国際会議場
(名古屋市)

〔図書〕(計 3 件)

鈴木健弘 日本医事新報社

CASE 27 腎血管性高血圧による腎傷害
若年性高血圧症と低カリウム血症をとも
なった 3 2 才女性 New 専門医を目指す
ケース・メソッド・アプローチ

腎臓疾患 第 2 版 pp223-pp234. 2013

秋山泰利、**鈴木健弘**、阿部高明 中外医
学社 CKD におけるトランスポーター
発現変化メカニズム Annual Review 腎
臓 2013 pp109-pp117. 2013

鈴木健弘 文光堂

腎血管性高血圧 治療 (内科的,外科的)
臨床に直結する腎疾患治療のエビデンス
第 2 版 pp352-pp358. 2012

〔その他〕

ホームページ等

東北大学医学系研究科 若手研究者の独創
的研究シーズの発展を目指した医学研究シ
ーディング・プログラム

<http://www.seedling.med.tohoku.ac.jp/index.php>

東北大学医学系研究科 腎・高血圧・内分泌
学分野

<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木健弘 (SUZUKI,Takehiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：5 0 3 9 6 4 3 8