

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591111

研究課題名(和文)心腎連関の原因物質としての尿毒症毒素の血管傷害メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of vascular inflammation induced by uremic toxins

研究代表者

吉田 雅幸 (Yoshida, Masayuki)

東京医科歯科大学・生命倫理研究センター・教授

研究者番号：80282771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インドキシル硫酸により増加したLy6C陽性の炎症性単球はカフ障害による内膜肥厚部位に顕著に集積していた。また、これらの細胞表面でのCCR2の発現が更新しており、MCP-1の関与が示唆された。また、インドキシル硫酸投与後の骨髄ではLy6陽性細胞の増多はみられず、インドキシル硫酸は末梢への遊走に関与していることが示唆された。インドキシル硫酸の受容体と考えられているAhRという分子の血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスを用いた実験では、AhRの欠損により、大腿動脈への白血球の接着が有意に抑制されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Indoxyl sulfate, a member of uremic toxins, significantly induces Ly6C-high monocytes recruitment to cuff-injured mouse femoral artery. These monocytes strongly express CCR2, suggesting a role for MCP-1 and CCR2 dependent signaling. Endothelial specific knock out mouse of AhR, a receptor of indoxyl sulfate, failed to exhibit indoxyl sulfate-induced monocyte recruitment.

研究分野：循環器病学、血管細胞生物学

キーワード：血管内皮細胞 炎症反応 心腎連関

1. 研究開始当初の背景

心・腎連関という概念が提唱され、心血管と腎臓が相互に影響しあうことが明らかにされつつあるが、その病態機序は必ずしも明らかにされていない。代表的な尿毒症毒素のインドキシル硫酸は慢性腎臓病患者血中において健常者の数十倍の濃度で存在し、その血中濃度と心血管疾患の発症率・致死率が相関することが判明している。

申請者らはマウス大腿動脈における白血球遊走を生体化で可視化する蛍光顕微鏡システム (IVM) を開発した (Osaka, Yoshida et al. Am. J. Physiol. 2007)。さらに、IVM を用いることによりインドキシル硫酸が直接白血球と血管壁の相互作用を亢進させることを見出し、その原因として血管内皮細胞の接着分子 E-selectin の発現上昇を介していることを示した (Ito, Yoshida et al. J Biol Chem. 2010)。

本研究計画ではこれまでの知見を踏まえ、インドキシル硫酸が血球系に与える影響を明らかにし、インドキシル硫酸の心・腎連関における役割を明らかにするための基礎研究を行う。

2. 研究の目的

腎機能障害は心血管疾患の進展に寄与している。申請者は最近、代表的な尿毒症毒素であるインドキシル硫酸が白血球と血管内皮細胞との接着を亢進させ、血管障害を悪化させることを見出した。本研究はインドキシル硫酸による血管炎症増悪のメカニズム、特に炎症性単球の関与に的を絞って研究を進め、慢性腎臓病において高率に合併する心血管疾患発症の予防を目指した研究基盤を確立することが目的である。

計画している具体的な研究項目は

インドキシル硫酸が炎症性単球に与える影響の解明

インドキシル硫酸の特異的な受容体の同定および単球機能に与える影響の解析、である。

3. 研究の方法

インドキシル硫酸による骨髄からの炎症性単球の動員メカニズムの検討 インドキシル硫酸により増加した炎症性単球が実際

に血管壁への接着を増強させるかどうかを検討する。インドキシル硫酸を投与したマウスの大腿動脈にカフ傷害により血管炎症を惹起させる。蛍光標識した抗 Ly6C 抗体により炎症性単球を、ローダミン 6G により白血球全てを染色するためマウスに投与する。生体内可視化システム IVM により血管壁へ接着する炎症性単球数および白血球数を測定し、インドキシル硫酸の影響を検討する。同処置を施したマウスの大腿動脈の切片を作製し、炎症性単球マーカーである Ly6C 抗体を用いた染色により血管壁へ浸潤した炎症性単球細胞数を検討する。

CCR-2 は monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) の受容体である。インドキシル硫酸の投与によって発現が亢進することが確認できたため、CCR-2 欠損マウスないしは CCR-2 阻害剤を投与したマウスにインドキシル硫酸を投与し、末梢血での炎症性単球数をフローサイトメトリーにより解析する。同マウスにカフ傷害により血管炎症を惹起させ、病理切片を作製し血管内膜の肥厚度を定量化する。同様に免疫組織化学染色により血管壁へ浸潤した炎症性単球マーカーである Ly6C 発現細胞数を検討する。

インドキシル硫酸がどのようにして単球の活性化を促進するのか、*in vitro* の系で検討する。単球系細胞株である THP-1 をインドキシル硫酸で処理し、フローサイトメトリーおよびリアルタイム PCR 法により CCR-2 のタンパク質および mRNA 発現量を検討する。次に CCR-2 の発現を制御していると考えられる NFκB および JNK などの MAPK などの活性化をルシフェラーゼアッセイないしはウエスタンブロッティングにより解析する。活性化した分子に関しては阻害剤および siRNA を用い、CCR-2 発現を抑制するかどうか検討する。

インドキシル硫酸の受容体としてのアールハイドロカーボン受容体 (AhR) の機能解析

インドキシル硫酸の単球における受容体を同定し、その機能を明らかにする。インドキシル硫酸は肝細胞において、AhR に作用することで薬物代謝酵素発現に影響を与えることが報告されている (Schroeder JC et al. Biochemistry. 2010)。そこで AhR 欠損マウスにインドキシル硫酸を投与し、炎症性単球数および CCR-2 発現に与える影響を解析する。

インドキシル硫酸による単球活性化に AhR がどのように関与するのか明らかにする。単球系細胞株である THP-1 に AhR の受容体拮抗薬ないしは siRNA で処理した後、

インドキシル硫酸で刺激する。CCR-2 などの活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーないしリアルタイム PCR により検討を行う。また、インドキシル硫酸が AhR の転写調節に及ぼす影響を検討するため、CCR-2 プロモーターのリポーターコンストラクトや AhR 結合配列を標的とした CHIP アッセイと行い、その分子機構の詳細を解明する。

4. 研究成果

インドキシル硫酸により増加した Ly6C 陽性の炎症性単球はカフ障害による内膜肥厚部位に顕著に集積していた。また、これらの細胞表面での CCR2 の発現が更新しており、MCP-1 の関与が示唆された。また、インドキシル硫酸投与後の骨髄では Ly6 陽性細胞の増多はみられず、インドキシル硫酸は末梢への遊走に参与していることが示唆された。インドキシル硫酸の受容体と考えられている AhR という分子の血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスを用いた実験では、AhR の欠損により、大腿動脈への白血球の接着が有意に抑制されることが明らかになった。

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)

Matsue Y, Yoshida M. et al. Clinical features and prognosis of type 2 myocardial infarction in vasospastic angina. *Am J Med.* 128:389-95. (2015) 【査読有り】

S. Ito, M. Yoshida Protein-Bound Uremic Toxins: New Culprits of Cardiovascular Events in Chronic Kidney Disease Patients. *Toxins* 20:665-78 (2014) 【査読有り】

K. Hamada, M. Osaka, M. Yoshida Cell Density Impacts Epigenetic Regulation of Cytokine-Induced E-selectin Gene Expression in Vascular Endothelium *PLoS ONE* 9:e90502 (2014) 【査読有り】

E. Kanda, M. Yoshida et al. Dietary Acid Intake and Kidney Disease Progression in the Elderly. *Am J Nephrol* 39:145-152 (2014) 【査読有り】

Y. Matsue, M. Yoshida et al. Peripheral microvascular dysfunction predicts residual risk in coronary artery disease patients on statin

therapy. *Atherosclerosis* :232 186-190 (2014) 【査読有り】

Y. Matsue, A. Matsumura, M. Suzuki, Y. Hashimoto, M. Yoshida Differences in action of atorvastatin and ezetimibe in lowering low-density lipoprotein cholesterol and effect on endothelial function: randomized controlled trial. *Circ J* 77:1791-8 (2013) 【査読有り】

R. Nohara, H. Daida, T. Yamazaki, H. Yokoi, M. Yoshida et al. Effect of Long-Term Intensive Lipid-Lowering Therapy With Rosuvastatin on Progression of Carotid Intima-Media Thickness. *Circ J* 77:1526-33 (2013) 【査読有り】

Y. Matsue, M. Suzuki, W. Nagahori, M. Yoshida et al. Endothelial dysfunction measured by peripheral arterial tonometry predicts prognosis in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* 168:36-40 (2013) 【査読有り】

M. Osaka, S. Hagita, M. Yoshida In vivo imaging of leukocyte recruitment to the atheroprone femoral artery reveals anti-inflammatory effects of rosuvastatin. *Biomed Res Int* doi: 10.1155/2013/962369. (2013) 【査読有り】

S. Ito, Y. Higuchi, Y. Yagi, F. Nishijima, H. Yamato, M. Osaka, H. Ishii, M. Yoshida. AST-120 attenuates Chronic Kidney Disease-related Monocyte Inflammation through Reduction of Indoxyl Sulfate *J Leukocyte Biol* 93(6):837-45 (2013) 【査読有り】

T. Yamazaki, R. Nohara, M. Yoshida et al. Justification for Atherosclerosis Regression Treatment (JART) Investigators. Intensive lipid-lowering therapy for slowing progression as well as inducing regression of atherosclerosis in Japanese patients. *Int Heart J* 54(1):33-39. (2013) 【査読有り】

[学会発表](計5件)

M Osaka, S Ito, M Yoshida Critical role of neutrophil-derived MCP-1 in the initial phase of high fat diet-induced vascular inflammation in mouse femoral artery 第78回日本循環器学会学術集会 2014年3月(東京・有楽町)

S Ito, M Osaka, K Hamada, Y Ito, M

Yoshida Uremic Toxin-induced Vascular Inflammation is Mediated by Aryl Hydrocarbon Receptor 第78回日本循環器学会学術集会 2014年3月(東京・有楽町)

M Osaka, S Ito, M Yoshida 高脂肪食が引き起こす好中球活性化には MCP-1/CCR2 シグナルが関与する 第46回日本動脈硬化学会総会 2014年7月(東京・新宿)

S Ito, M Osaka, K Hamada, Y Ito, M Yoshida 尿毒症毒素インドキシル硫酸は Aryl hydrocarbon receptor を介して血管炎症を増強する 第37回日本高血圧学会総会 2014年10月(神奈川県・横浜市)

S Ito, M Osaka, K Hamada, Y Ito, M Yoshida Critical Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in Uremic Toxin-induced Vascular Inflammation in Vivo and in Vitro AHA Scientific Sessions2014 2014年11月(米国・シカゴ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 雅幸 (YOSHIDA MASAYUKI)

東京医科歯科大学・生命倫理研究センター・教授

研究者番号：80282771

(2)研究分担者

大坂瑞子 (OSAKA MIZUKO)

東京医科歯科大学・生命倫理研究センター・助教

研究者番号：00581711