

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591230

研究課題名(和文)尿毒素物質による異化亢進機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Evaluation of mechanisms of uremic toxin induced wasting and the therapeutic application

研究代表者

矢野 彰三 (YANO, SHOZO)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80403450

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)患者では、病期の進行に伴い「やせ」や骨格筋萎縮など異化亢進を認め、心血管病発症・死亡リスクが上昇する。この背景には、インスリン作用減弱の関与があり、原因として腎不全で蓄積する「尿毒素」が想定される。尿毒素には多数の物質が知られ、おもに腸内細菌叢で産生される。尿毒素はさまざまな機序でインスリン作用の減弱やCKDにおける異化亢進に関与していることが明らかになったため、効率的な除去法の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Patients with chronic kidney disease (CKD) are characterized by wasting or catabolic state in parallel with the disease progression, which may be associated with an increased risk of cardiovascular events and mortality. "Uremic toxin" accumulated in advanced CKD may be responsible for the disturbance of insulin action in this pathophysiology. Number of substances are known as a uremic toxin, most of which are produced by the gut microbiota. We showed that uremic toxins are involved in the disturbance of insulin action and catabolic state of CKD, and thus the development of an efficient removal technology is required.

研究分野：透析・腎臓、内分泌代謝

キーワード：尿毒素 蛋白エネルギー消費 インスリン抵抗性 腎不全

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎不全において生体に蓄積しかつ有害作用を持つ物質を総称して尿毒素(Uremic Toxin)と呼称し、尿毒素物質の同定・分類が進行している。しかし、その有害性について、個々の物質がいかなる臓器・細胞への傷害性を有するかに関する詳細は明らかでない。

(2) 慢性腎臓病(chronic kidney disease, CKD)患者は、病期の進行に伴い心血管病発症および総死亡リスクが上昇し、同時に「やせ」、protein energy wasting, PEWや骨格筋萎縮など異化亢進が認められる。この病態の背景には、CKD進行とともに尿毒素が蓄積し生体への有害性が増大することが挙げられる。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、特に脂肪組織および骨格筋に焦点を当て、尿毒素物質の有害性とそのメカニズムを細胞レベルで明らかにすることによって、将来のCKD治療戦略の一端を担う治療法の開発をめざした。

### 3. 研究の方法

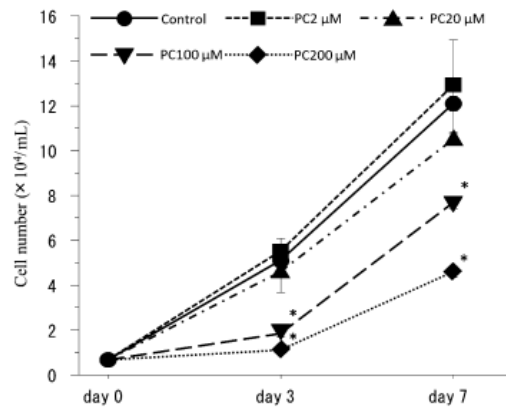
培養マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を培養し、尿毒素としてフェニル酢酸(PAA)・インドキシル硫酸(IS)・pクレゾール(PC)・pクレゾール硫酸(PCS)などを濃度、作用時間を変えて添加し、細胞反応を評価した。

(1) 細胞の viability を確認後、増殖能、アポトーシスを評価した。細胞の分化・成熟については、Oil Red 染色による脂肪蓄積を評価し、分化や細胞形質を示す遺伝子について定量的 real time RT-PCR 法、Western blot 法で、mRNA レベル、蛋白レベルでの発現を検討した。

(2) インスリン感受性に対する各尿毒素物質の影響を検討するため、細胞内へのグルコースの取り込みについて RI (<sup>3</sup>H-Labeled 2-deoxyglucose, 2-DOG)を用いたトレーサー実験をインスリン存在下、非存在下で行った。

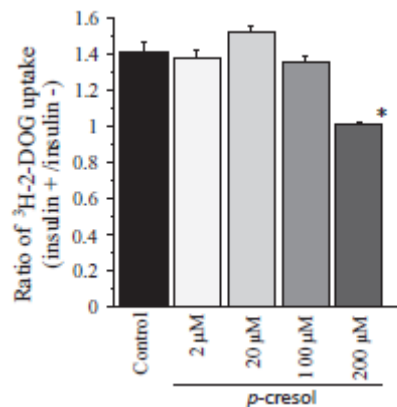
### 4. 研究成果

(1) 細胞培養開始後、経時的に細胞数の測定を行ったところ、3T3-L1 脂肪細胞の増殖は100μM以上の高濃度のPCによって抑制された。同様の結果はBrd-Uによっても確認しており、細胞周期が障害されたことが分かった(図1)。更に oil red-O 染色によって、PCが成熟脂肪細胞への分化を抑制することを見出した。このメカニズムとして PC の分化抑制作用ならびにアポトーシス誘導作用が考えられる。我々は実際に、100μM以上のPCが3T3-L1細胞をアポトーシスに導き、また分化のメインレギュレーターである PPAR の発現を低下させることを突き止めた。



(図1) 3T3-L1 細胞増殖に対する PC の影響

(2) 100μM以上のPC添加条件下において、インスリン存在下、非存在下で細胞内へのグルコース取り込みは有意に低下した(図2)。このことは、PC添加群における成熟脂肪細胞数の減少によっても説明されるが、それだけでなく、インスリン感受性に関して有意に低下することが明らかになった(図2)。すなわち、インスリン非存在下に対するインスリン存在下でのグルコースの取り込みは、PC200μMの添加により有意に低下していた。



(図2) インスリン感受性に対する PC の影響

(3) その他の尿毒素である PCS、IS、PAA では、少なくとも検討した濃度、作用時間において、細胞増殖、分化・成熟、などの機能障害を認めなかった。このことは、脂肪細胞に対する PC 特異的な傷害性を示している。

(4) 細胞内へのグルコース取り込み実験において、興味深い知見を得た。すなわち、インスリン非存在下に対するインスリン存在下でのグルコースの取り込みは、PCS200μMの添加により有意に低下していた(未発表)。PCSによる成熟脂肪細胞数の減少は認められなかったことから、高濃度のPCSは何らかの機序によりインスリン作用の減弱を惹起している可能性が示唆された。

### <引用文献>

Tanaka S, Yano S, et al. Artificial Organs 38(7):566-571, 2014.

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)

Yano S, Nabika T, Nagai A, Hamano T, Yamasaki M, Isomura M, Shiwaku K, Yamaguchi S, Yamaguchi T, Sugimoto T: Interrelationship between glucose metabolism and undercarboxylated osteocalcin: a cross-sectional study in community-dwelling population. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. (in press). 査読有

Tabassum S, Sheikh AM, Yano S, Ikeue T, Handa M, Nagai A: A carboxylated Zn-phthalocyanine inhibits the fibril formation of Alzheimer's amyloid peptide. *FEBS J*. 282(3):463-76, 2015. 査読有

Notsu Y, Yano S, Shibata H, Nagai A, Nabika T: Plasma arginine/ADMA ratio as a sensitive risk marker for atherosclerosis: Shimane CoHRE Study. *Atherosclerosis*. 239(1): 61-66, 2014. 査読有

Tanaka KI, Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Kaji H, Sugimoto T: Active vitamin D possesses beneficial effects on the interaction between muscle and bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 450(1):482-487, 2014. 査読有

Morita M, Yano S, Ishibashi Y, Nakata N, Kurioka S, Sugimoto T: Close Relationship between Serum Hyaluronan

Levels and Vascular Function in Patients with Type 2 Diabetes. *Biomarkers*. 19(6):493-7, 2014. 査読有

[学会発表](計 5件)

Tanaka S, Yano S, Sugimoto T: Effects of uremic toxin *p*-cresylsulfate on insulin resistance in adipocytes. The 51<sup>st</sup> ERA-EDTA congress, Amsterdam, Holand, May 31-June 3, 2014

矢野彰三, 公受伸之, 鈴木恵子, 杉本利嗣: 透析患者の骨強度を維持するには~5年間の骨量計測結果からの考察~. 第59回日本透析医学会学術集会・総会. 神戸国際会議場, 神戸, 2014年6月15日

矢野彰三, 並河 徹, 長井 篤, 杉本利嗣: 動脈硬化症と骨代謝との関連: Shimane CoHRE Study. 第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪国際会議場, 大阪, 2014年7月24日

野津吉友, 矢野彰三, 長井 篤, 並河 徹: 腎・心血管障害進展指標としての Arginine/ADMA 比の有用性: Shimane CoHRE Study. 第54回日本臨床化学会年次学術集会. 東京大学本郷キャンパス, 東京, 2014年9月6日

長崎雅幸, 矢野彰三, 松本健一, 織田禎二, 原田祐治, 三島清司, 長井 篤: ヒト血管平滑筋細胞のアポトーシスと石灰化形成に関する検討. 第60回日本臨床検査医学会学術集会. 福岡国際会議場, 福岡, 2014年11月23日

[図書](計 9件)

矢野彰三, 杉本利嗣: 骨粗鬆症・骨代謝改善薬. *Pocket Drugs 2015*. 医学書院, 東京, p428-437

矢野彰三, 杉本利嗣: 【Chapter 3. 副甲状腺・骨代謝】Q42. 原発性副甲状腺機

能亢進症の内科的治療は？ 内分泌代謝疾患クリニカルクエスチョン 100. 成瀬光栄編集. 診断と治療社, 東京, 2014, p75

矢野彰三：毎日の食事と運動について～ドクトル矢野の癒しのマメ知識～. 島大病院ちょっと気になる健康講座. 監修・編集：島根大学医学部附属病院. 今井出版, 米子, 2015, p111-113.

矢野彰三, 杉本利嗣：【内分泌学的検査】骨吸収マーカー（DPD, NTX, CTX, TRACP-5b）. 日常診療のための検査値のみかた 初版. 編集：野村文夫, 村上正巳, 和田隆志, 末岡榮三郎. 中外医学社, 東京, 2015, p288-290

矢野彰三：【Chapter 7 Q&A（症例の実際）】糖尿病性腎症における骨代謝異常の特徴について教えてください. ファーマナビゲーターシリーズ/糖尿病と骨代謝編 松本俊夫, 杉本利嗣編. メディカルレビュー社, 東京, 2015, p338-344

矢野彰三：ミネラル代謝と代謝性骨疾患. 島根医学検査 43. 2015, p1-15

矢野彰三：【研修医が身につけるべき輸液の理論と実践のポイント】栄養も考えた輸液：経腸栄養・経口摂取にどうつなぐか. レジデント. 医学出版, 東京, Vol. 8, No.7. 2015, p34-39

矢野彰三：CKD-MBD. 今日の治療指針 2016 年度版 - 私はこう治療している. 医学書院, 東京, (in press)

Yano S: Bone fragility in hemodialysis patients. Hemodialysis. ISBN 978-953-51-4175-4 (in press)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 彰三 (YANO Shozo)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号：80403450

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：