

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790837

研究課題名(和文)腎臓病によって増悪する動脈硬化病変におけるHDLとマクロファージの機能と治療

研究課題名(英文) Dysfunction of HDL and macrophages in kidney disease-accelerated atherosclerosis and the therapeutic strategy

研究代表者

山本 卓 (YAMAMOTO, Suguru)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：70444156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓病で増悪する動脈硬化症のメカニズムを解明するためマクロファージとHDLコレステロールの機能異常と尿毒素物質の一つであるインドキシル硫酸(IS)の関連について調査した。ISはマクロファージに作用することにより、マクロファージの機能異常を示すことを明らかにした。腎臓病患者HDLはマクロファージの炎症反応を促進し、cholesterol effluxを減少することを明らかにした。以上からISは動脈硬化病変内におけるマクロファージとHDLの機能異常に関与しており、腎臓病患者の動脈硬化増悪の原因の一つであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Purpose of the study is to elucidate the mechanism of dysfunction of macrophage and HDL cholesterol in kidney disease-accelerated atherosclerosis. HDL isolated from kidney disease patients induced macrophage inflammation and abnormal lipid metabolism. Indoxyl sulfate also induced macrophage inflammation and abnormal lipid metabolism. Those results indicate that indoxyl sulfate may induce dysfunctions of macrophage and HDL, and the intervention to them will be an attractive therapeutic strategy for kidney disease-accelerated atherosclerosis.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 動脈硬化 心血管病 HDLコレステロール マクロファージ インドキシル硫酸

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性腎臓病 (CKD) と心血管系イベント

CKD 患者では心血管系イベントを高頻度に合併。末期腎不全患者では健常者と比較して約 20 倍も増加する (Go AS. *N Engl J Med* 2004)。その原因に動脈硬化病変内マクロファージと HDL の機能異常が考えられる。

(2)末期腎不全患者の HDL の機能異常

申請者らは、維持血液透析患者から精製した HDL を THP-1 細胞と反応させたところ、HDL による細胞内脂質の取り込み (cholesterol efflux) が減少し、マクロファージの IL-1 β (5.1 \pm 3.8 vs 3.2 \pm 2.2 mg/dl, $p=0.03$) など炎症性サイトカインの発現が増加した。

(3) 腎臓病モデルマウスのマクロファージの機能異常

申請者らは、骨髄移植によるマクロファージアンジオテンシン II 受容体のノックアウトは、腎障害による動脈硬化の増悪を抑制した (Yamamoto S. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011)。同研究でマクロファージアンジオテンシン II 受容体は、腎障害によって誘導されるマクロファージの M1 フェノタイプへの移行、およびアポトーシスの促進に重要であることを明らかにした。また申請者らは腎不全において尿毒素物質を経腸的に吸着する AST-120 が腎障害により増悪した動脈硬化病変を軽快し、さらにマクロファージ/泡沫細胞などからなる壊死病変、および炎症性サイトカインの発現を改善することを示した (Yamamoto S. *Nephrol Dial Transplant* 2011)。その際、蛋白結合尿毒素物質である動脈硬化病変のインドキシル硫酸 (IS) の沈着が減少することを確認した。

2. 研究の目的

CKD 患者のマクロファージおよび HDL の機能異常を評価することを目的とした。

(1) CKD 患者 HDL のマクロファージ機能に対する効果

CKD ステージ 4 (eGFR 15-30 ml/min) あるいは 5D (血液透析療法施行中) 由来の HDL (CKD-HDL あるいは HD-HDL) の機能障害を調べるため、CKD-HDL あるいは HD-HDL と正常マクロファージを反応させ、cholesterol efflux あるいは炎症反応を明らかにする。

(2) マクロファージの機能障害に対するインドキシル硫酸の影響

マクロファージに IS を反応させ cholesterol efflux および炎症反応を解析する。

3. 研究の方法

(1) CKD 患者 HDL の機能評価

リポ蛋白質の精製

血漿から HDL を密度勾配遠心法にて精製する (Sulistiyani *et al. Atherosclerosis* 1991)。

CKD-HDL の酸化アルブミン

HDL の酸化アルブミンを測定した。

CKD-HDL と正常マクロファージの反応

Cholesterol efflux

THP-1 を分化させたマクロファージにアセチル化 LDL を添加し泡沫細胞化させる。そこに CKD-HDL を添加し HDL による脂質引き抜き能を定量する。

炎症反応

THP-1 マクロファージに CKD-HDL および LPS を反応させる。反応後、リアルタイム PCR あるいはウェスタンブロットングで IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 を測定する。また反応時のマクロファージの ABC トランスポーターの変化を観察する。

(2) インドキシル硫酸によるマクロファージの機能障害

Cholesterol efflux

IS と反応した THP-1 マクロファージにアセチル化 LDL を添加し、泡沫細胞化させる。泡沫細胞に非 CKD-HDL を添加し、細胞から脂質を取り込む反応を観察する。上記に LXR agonist, T0901317 を加え効果を検討する。

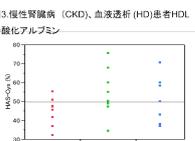
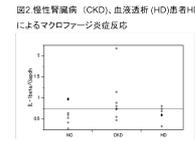
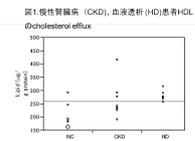
炎症反応

マクロファージに IS を反応させる。反応後、リアルタイム PCR あるいはウェスタンブロットングで IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 の炎症性サイトカイン、および ABC トランスポーター (ABCA-1、ABCG-1) を測定する。上記反応に T0901317 を加え治療効果を検討する。

4. 研究成果

(1) CKD 患者 HDL の機能評価

腎機能正常患者 HDL、CKD 患者 HDL、血液透析患者 HDL それぞれを THP-1 マクロファージに反応させた。CKD-HDL、HD-HDL は健常者 HDL と比較してマクロファージ細胞内脂質量の増加、すなわち cholesterol efflux の減少を示した (図 1)。また CKD-HDL は健常者 HDL と比較してマクロファージ IL-1 β の発現を増強した (図 2)。これら CKD-HDL、HD-HDL の機能異常の原因を評価するため HDL 中の酸化アルブミンの割合を評価した。CKD-HDL、HD-HDL は健常者 HDL と比較してアルブミンの酸化率が増加する傾向にあった (図 3)。上記いずれの反応においても CKD-HDL と HD-HDL の明らかな違いは指摘されなかった。以上から CKD-HDL、HD-HDL のマクロファージに対する機能異常を明らかにした。今後は CKD-HDL に影響を及ぼす治療効果について同様の実験システムを用いて検討する。



(2) インドキシル硫酸によるマクロファージの機能障害

IS は代表的な蛋白結合尿毒物質である。IS とマクロファージの反応を観察することにより腎臓病環境でのマクロファージの機能を観察できると考えた。

MTS アッセイを用いた IS によるマクロファージの細胞障害を観察した。2.5mM 以上の高濃度の IS は THP-1 マクロファージの MTS 吸光度を減少させた (図 4)。IS による細胞障害は明らかであり、以後 IS 1.0 mM を中心に反応を進める。IS は加えた濃度に依存して THP-1 マクロファージの IL-1 β 産生を亢進し (図 5)、ROS の産生を亢進し (図 6)、さらには cholesterol efflux を減少

させた (図 7)。IS の cholesterol efflux 減少の原因としてマクロファージ脂質排出のトランスポーターである ABCG1 の発現が減少していた (図 8)。以上から IS はマクロファージ

の炎症反応を増強し、cholesterol efflux を減少することを明らかにした。治療効果として

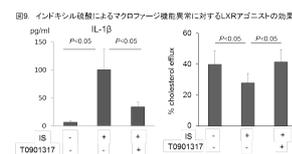
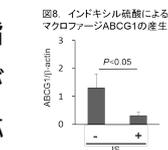
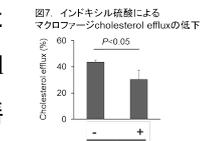
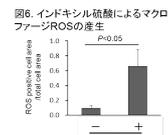
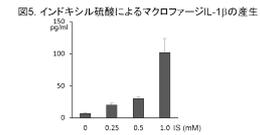
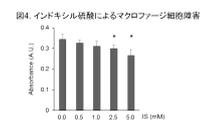
LXR アゴニストである T0901317 を上記反応に添加し治療効果を確認した。

T0901317 は IS で誘導された IL-1 β の産生と cholesterol efflux の低下をいずれも改善した (図 9)。以上から、IS はマ

クロファージの炎症反応、脂質代謝異常に関連することが明らかになった。またその反応

は LXR アゴニストを用いることにより改善した。今後は IS がマクロ

ファージ機能異常を起こす細胞内シグナルとそれを改善する治療について検討する。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計11件)

1. Yamamoto S, Kon V. Chronic kidney disease induced dysfunction of high density lipoprotein. Clin Exp Nephrol. 査読有 18: 2014, 251-4.
2. Koda R, Kazama JJ, Matsuo K, Kawamura K, Yamamoto S, Wakasugi M, Takeda T, Narita I. Intact parathyroid hormone and whole parathyroid hormone assay results disagree in hemodialysis patients under cinacalcet hydrochloride therapy. Clin Exp Nephrol. 査読有 Nov 11. 2014
3. Kazama JJ, Yamamoto S, Wakasugi M, Narita I. Hip fracture in a dialysis patient with A β 2M amyloidosis. Kidney Int. 査読有 85: 2014, 214-5.
4. Wakasugi M, Kazama JJ, Yamamoto S,

- Kawamura K, Narita I. Combination of healthy lifestyle factors is associated with a decreased incidence of chronic kidney disease: a population-based cohort study. *Hypertens Res.* 査読有 36: 2013, 328-33.
5. Yamamoto S, Kazama JJ, Fukagawa M. Autophagy: a two-edged sword in diabetes mellitus. *Biochem J.* 査読有;456: 2013, e1-3.
 6. Wakasugi M, Kazama JJ, Yamamoto S, Kawamura K, Narita I. Cause-specific excess mortality among dialysis patients: comparison with the general population in Japan. *Ther Apher Dial.* 査読有 17: 2013, 298-304.
 7. Wakasugi M, Kawamura K, Yamamoto S, Kazama JJ, Narita I. High mortality rate of infectious diseases in dialysis patients: a comparison with the general population in Japan. *Ther Apher Dial.* 査読有;16: 2012, 226-31.
 8. Yamamoto S, Yancey PG, Ikizler TA, Jerome WG, Kaseda R, Cox B, Bian A, Shintani A, Fogo AB, Linton MF, Fazio S, Kon V. Dysfunctional high-density lipoprotein in patients on chronic hemodialysis. *J Am Coll Cardiol.* 査読有 60: 2012, 2372-9.
 9. Sato H, Iino N, Ohashi R, Saeki T, Ito T, Saito M, Tsubata Y, Yamamoto S, Murakami S, Kuroda T, Tanabe Y, Fujisawa J, Murai T, Nakano M, Narita I, Gejyo F. Hypogammaglobulinemic patient with polyarthritis mimicking rheumatoid arthritis finally diagnosed as septic arthritis caused by *Mycoplasma hominis*. *Intern Med.* 査読有 51: 2012, 425-9.
 10. Yamamoto S, Zuo Y, Ma J, Yancey PG, Hunley TE, Motojima M, Fogo AB, Linton MF, Fazio S, Ichikawa I, Kon V. Oral activated charcoal adsorbent (AST-120) ameliorates extent and instability of atherosclerosis accelerated by kidney disease in apolipoprotein E-deficient mice. *Nephrol Dial Transplant.* 査読有 26:2011, 2491-7.
 11. Yamamoto S, Yancey PG, Zuo Y, Ma LJ, Kaseda R, Fogo AB, Ichikawa I, Linton MF, Fazio S, Kon V. Macrophage polarization by angiotensin II-type 1 receptor aggravates renal injury-acceleration of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 査読有 31:2011, 2856-64.
- 〔学会発表〕(計 21 件)
1. 坪野俊介、酒巻裕一、松尾浩司、山本卓、金子佳賢、今井直史、伊藤由美、成田一衛、生体腎移植 2 例が長期生着中の家族性巣状分節性糸球体硬化症 1 家系、第 48 回日本臨床腎移植学会 平成 27 年 2 月 4 日、ウェスティンナゴヤキャッスル(愛知県名古屋市)
 2. Yamamoto S, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Watanabe H, Maruyama T, Kazama JJ, Narita I. Continuous reduction of protein-bound uremic toxins with improved oxidative stress by oral charcoal adsorbent in maintenance hemodialysis patients; an additional blood purification therapy ASN Kidney Week 2014, 平成 26 年 11 月 10 日, Philadelphia (USA)
 3. 保川亮太、酒巻裕一、山本卓、今井直史、伊藤由美、金子佳賢、成田一衛、紫斑病性腎炎の組織学的重症度と予後、第 44 回日本腎臓学会東部学術大会、平成 26 年 10 月 23 日、ベルサール新宿グランド(東京都)
 4. 松尾浩司、山本卓、高橋良光、川村和子、若杉三奈子、風間順一郎、成田一衛、インドキシル硫酸はマクロファージの炎症反応を促進し、コレステロール代謝を増悪させる、第 59 回日本透析医学会学術総会、平成 26 年 6 月 13 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 5. 駒場大峰、谷口正智、山本卓、深川雅史、セベラマー塩酸塩の追加処方方は透析患者の生命予後の改善に関連する、第 59 回日本透析医学会学術総会、平成 26 年 6 月 13 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 6. 山本卓、風間順一郎、丸山弘樹、成田一衛、骨粗鬆症治療の進歩 in CKD-MBD、第 59 回日本透析医学会学術総会、平成 26 年 6 月 13 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 7. 山本卓、大森健太郎、松尾浩司、高橋良光、川村和子、丸山弘樹、渡邊博志、丸山徹、風間順一郎、成田一衛、経口吸着炭薬は維持血液透析患者の蛋白結合尿毒素物質を減少させる、第 59 回日本透析医

学会学術総会、平成 26 年 6 月 13 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

8. Yamamoto S, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Wakasugi M, Maruyama M, Kazama JJ, Narita I, Protein-bound uremic toxins were decreased continuously by oral charcoal adsorbent, AST-120, in maintenance hemodialysis patients, The 8th International Congress of Uremia Research and Toxicity, 平成 26 年 5 月 16 日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）
9. Yamamoto S, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Wakasugi M, Maruyama M, Kazama JJ, Narita I, Protein-bound uremic toxins were decreased continuously by oral charcoal adsorbent, AST-120, in maintenance hemodialysis patients, The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology (APCN 2014), 平成 26 年 3 月 3 日、品川プリンスホテル（東京都港区）
10. Yamamoto S, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Wakasugi M, Maruyama H, Kazama JJ, Narita I, Oral activated charcoal adsorbent, AST-120, induced continuous reduction of protein-bound uremic toxins in maintenance hemodialysis patients, ASN Kidney Week 2013, 平成 25 年 11 月 7 日, Atlanta (USA)
11. 若松拓也、片桐隆幸、矢田雄介、山本卓、中枝武司、飯野則昭、後藤眞、風間順一郎、成田一衛、肝性脳症による意識障害に対し血液透析濾過が有効であったバッド・キアリ症候群合併透析患者の一例、第 43 回日本腎臓学会 東西学術集会、平成 25 年 10 月 4 日、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール（東京都港区）
12. 山本卓、木戸亮、大西良浩、福間真悟、秋澤忠男、深川雅史、風間順一郎、成田一衛、福原俊一、レニン-アンジオテンシン系の阻害は二次性副甲状腺機能亢進症を合併した血液透析患者の骨折による入院頻度を抑制する、第 58 回日本透析医学会総会・学術集会、平成 25 年 6 月 21 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）
13. 松尾浩司、山本卓、川村和子、若杉三奈子、風間順一郎、成田一衛、インドキシル硫酸はマクロファージの炎症反応と細胞毒性を促進する、第 58 回日本透析医学

会総会・学術集会、平成 25 年 6 月 21 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

14. 小林新、河野恵美子、山本卓、飯野則昭、後藤眞、成田一衛、レジオネラ肺炎に伴う横紋筋融解症による急性腎不全症例、平成 25 年 6 月 8 日、第 132 回日本内科学会信越地方会例会、長野市若里市民文化ホール（長野県長野市）
15. Matsuo K, Yamamoto S, Kawamura K, Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I, Indoxyl sulfate inhibits efflux and promotes production of inflammatory cytokine of macrophage, World congress of nephrology satellite symposium 'Kidney and lipids', 平成 25 年 6 月 5 日、ヒルトン福岡シーホーク（福岡県福岡市）
16. 山本卓、吉田一浩、松尾浩司、河野恵美子、柴田怜、中枝武司、飯野則昭、後藤眞、風間順一郎、成田一衛、Budd-Chiari 症候群に続発した慢性腎不全に対し血液透析を行った一例、第 42 回日本腎臓学会東西学術集会、平成 24 年 10 月 13 日、ときメッセ（新潟県新潟市）
17. 山本卓、風間順一郎、川村和子、若杉三奈子、丸山弘樹、成田一衛、腎障害で増悪する動脈硬化病変内マクロファージに対するロサルタンとピオグリタゾンの機能改善効果、第 35 回日本高血圧学会総会、平成 24 年 9 月 22 日、ウェスティンナゴヤキャッスル（愛知県名古屋市）
18. 山本卓、飯野則昭、川村和子、成田一衛、丸山弘樹、透析関連と感染性合併症による腹膜透析離脱例の検討、第 18 回日本腹膜透析学会、平成 24 年 9 月 21 日、あわぎんホール（徳島県徳島市）
19. 山本卓、風間順一郎、丸山弘樹、成田一衛、透析患者 HDL は動脈硬化病変におけるマクロファージの泡沫細胞化を促進する、第 57 回日本透析医学会総会・学術集会、平成 24 年 6 月 22 日、京王プラザホテル札幌（北海道札幌市）
20. 山本卓、風間順一郎、川村和子、若杉三奈子、丸山弘樹、成田一衛、ピオグリタゾンはマクロファージ M1 フェノタイプを減少させ腎障害で増悪する動脈硬化を改善する、第 55 回日本腎臓学会学術総会、平成 24 年 6 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

21. Yamamoto S, Yancey PG, Ikizler A, Jerome WG, Linton MF, Fazio S, Kon V. Atheroprotective function of high density lipoprotein (HDL) is defective in end stage renal disease patients on hemodialysis (ESRD-HD), ASN Kidney Week 2011,)平成23年11月11日, Philadelphia (USA)

〔図書〕(計23件)

1. 山本卓, 深川雅史, 医学図書出版, 透析療法ネクスト, 2014年, 64-71
2. 山本卓, 成田一衛, 東京医学社, 腎と透析, 2014年, 362-365
3. 山本卓, 風間順一郎, 学研メディカル秀潤社, 2014年, 787-793
4. 山本卓, 医歯薬出版, 透析療法パーフェクトガイド第4版, 2014年, 201-208
5. 山本卓, 金子佳賢, 成田一衛, 臨床医学出版, 臨床透析, 2013年, 111-117
6. Yamamoto S, Kazama JJ, Maruyama H, Narita I. INTECH, Amyloidosis, 2013年, 67-83
7. 山本卓, 風間順一郎, 丸山弘樹, 成田一衛, 中外医学社, Annual review 腎臓2013, 2013年, 136-142
8. 山本卓, 成田一衛, メディカルレビュー, Fluid Management Renaissance, 2013年, 55-59
9. 山本卓, 風間順一郎, 医薬ジャーナル社, ガイドラインサポートハンドブック慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) 改訂版, 2013年, 129-137
10. 山本卓, 日本メディカルセンター, 透析患者の検査値の読み方改訂第3版, 2013年, 114-115, 149-152, 204-205
11. 山本卓, 風間順一郎, 南江堂, 臨床雑誌「内科」, 2013年, 1253
12. 山本卓, 風間順一郎, 成田一衛, 東京医学社, 腎疾患治療薬マニュアル2013-14, 2013年, 659-662
13. 山本卓, 成田一衛, 医学出版, 透析スタッフ, 2013年, 29-36

14. 山本卓, 風間順一郎, 考古堂書店, CKD-MBD ハンドブック2, 2013年, 236-240
15. 山本卓, 成田一衛, 日本臨牀社, 日本臨牀, 2012年, 62-66
16. 山本卓, 成田一衛, 科学評論社, 内分泌・糖尿病・代謝内科, 2012年, 275-284
17. 山本卓, 風間順一郎, 成田一衛, 最新医学社, 最新医学, 2012年, 207-214
18. 山本卓, 風間順一郎, 成田一衛, 東京医学社, 腎と透析, 2012年, 723-727
19. 山本卓, 風間順一郎, 成田一衛, 医薬ジャーナル社, CLINICAL CALCIUM, 2012年, 134-143
20. 山本卓, 風間順一郎, 丸山弘樹, 成田一衛, ライフサイエンス出版, Therapeutic Research, 2012年, 1162-1163
21. 山本卓, 風間順一郎, 丸山弘樹, 成田一衛, 医薬ジャーナル社, 医薬ジャーナル, 2012年, 81-84
22. Yamamoto S, Kazama JJ, Maruyama H, Narita I, Gejyo F. Wiley, Uremic toxins, 2012年, 249-258
23. 山本卓, 医歯薬出版, 透析療法パーフェクトガイド第3版, 2012年, 200-207

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本卓 (YAMAMOTO, Suguru)
新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教
研究者番号: 70444156