

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790844

研究課題名(和文) アミノ酸L-リジンによるuremic memory解除の試み

研究課題名(英文) Influence of L-lysine on uremic memory

研究代表者

松井 功 (Matsui, Isao)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60456986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)： アデニン誘導性腎不全ラットモデルを用いた検討により、アミノ酸L-リジンの経口投与が、腎不全合併症である血管石灰化を抑制することが明らかとなった。アミノ酸L-リジン経口投与は、腸管におけるカルシウム吸収調節を介して、腎不全合併症である二次性副甲状腺機能亢進症を抑制し、適切な骨血管相関を保つのに貢献した。また、L-リジン経口投与にて血漿濃度が上昇したアラニン・プロリンは血管平滑筋細胞のアポトーシスを抑制し、同じく血漿濃度が上昇したアルギニン・ホモアルギニンはカルシウム・リン酸の沈殿形成を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Vascular calcification is one of the life-threatening complications of chronic kidney disease. Dietary L-lysine prevented arterial calcification in adenine-induced uremic rats. Dietary L-lysine strongly suppressed plasma intact parathyroid hormone in adenine rats, and thereby supported a proper bone-vascular axis. Dietary L-lysine elevated plasma alanine, proline, arginine, and homoarginine but not lysine. Analyses in vitro demonstrated that alanine and proline inhibit apoptosis of cultured vascular smooth muscle cells, and that arginine and homoarginine attenuate mineral precipitations in a supersaturated calcium/phosphate solution. Dietary supplementation of L-lysine ameliorated VC by modifying several key pathways that exacerbate VC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：Uremic memory 腎不全 血管石灰化 L-Lysine

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は蛋白質を構成する生命の基本物質である。蛋白質は人体構成成分のうち、水に次ぐ重量を占めており、健全なアミノ酸・蛋白質機能の保持なくして、健全な人体の機能保持はあり得ない。腎不全患者では、尿素素が蛋白質機能制御や遺伝子発現制御に影響を与え、腎臓病自体の進行や心血管合併症発症の原因となることが推察されているが[Kidney Int. 2003;63(5):1934-43]、尿素素による臓器障害発症メカニズムは未解明の部分が多く残され、これに対抗する手段も吸着炭系薬剤等に限られる。

## 2. 研究の目的

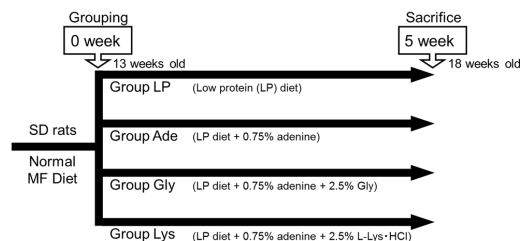
我々は本研究において、代表的尿素素である「尿素」とアミノ酸「リジン」の相互作用により生じる蛋白機能障害が、腎機能障害時に臓器に記憶 (uremic memory) され、この uremic memory が腎障害増悪・心血管合併症発症/進展の原因となる可能性を検証するとともに、L-リジン投与による uremic memory 解除を試みた。

## 3. 研究の方法

著明に血清尿素窒素が上昇し、血管石灰化などの腎不全合併症を生じる動物モデルとしてアデニン誘導性腎不全ラットを作成した。同モデルラットに L-リジンを 2.5% 混餌投与し、その影響を評価した。またアミノ酸対照として、最も単純な構造を持つアミノ酸グリシンを混餌投与した群も設定した。また、培養細胞系などを用いて、詳細なメカニズムを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) アデニン腎不全ラットの作成

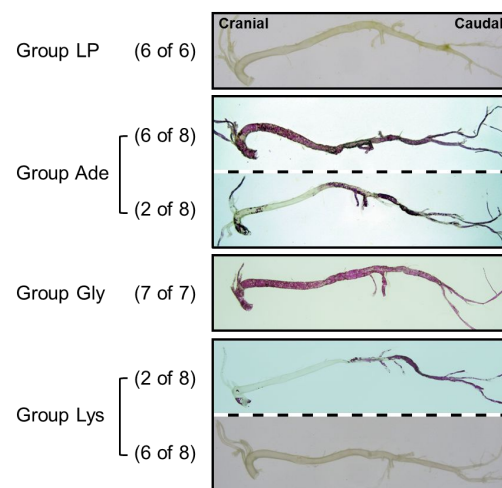


尿素窒素が著明に上昇する腎不全動物モデルとして 0.75%アデニン混餌によるアデニン誘導性腎不全ラットを作成した (Group Ade)。アデニン誘導性腎不全モデルでは、低タンパク食にすることで、血管石灰化が促進される事が知られているため、基本の餌は低タンパク食とした。また、アデニンを含まな

い低タンパク餌投与による腎機能正常の群を作成した (Group LP)。アデニン誘導性腎不全におけるアミノ酸 L-リジンの効果を評価するため、2.5% L-リジン塩酸塩を混餌投与した Group Lys と、アミノ酸対照として 2.5% グリシン混餌投与した Group Gly も設定した。各群 13 週齢から負荷を開始し、18 週齢時点で組織などの変化を評価した。

18 週齢時点での血清尿素窒素は Group LP  $6.64 \pm 3.66$  mg/dL, Group Ade  $180.9 \pm 49.1$  mg/dL, Group Gly  $220.8 \pm 64.4$  mg/dL, Group Lys  $129.7 \pm 71.6$  mg/dL であった。Group Ade を対照に Dunnett 検定を行い、Group Ade, Gly, Lys 間に尿素窒素レベルの有意差がないことを確認した。

### (2) 腎不全合併症である血管石灰化に与える影響の評価

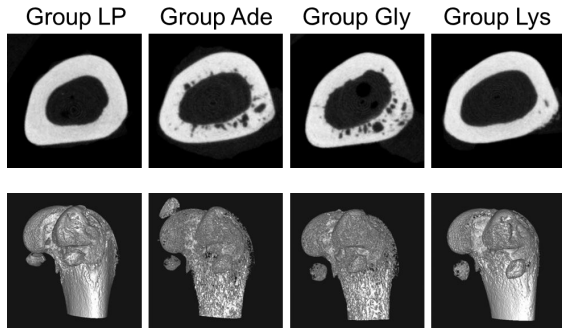


各群で血管石灰化の進展度を評価した。上記はラット大動脈をアリザリンレッド染色した結果であり、石灰化した部分が赤紫色で示されている (括弧内は個体数を表す)。Group Ade では著明な血管石灰化を認め、グリシン投与では血管石灰化が抑制されなかったが、L-リジン投与により血管石灰化が著明に抑制される事が明らかになった。Von Kossa 染色や血管ミネラル定量でも同様の結果が得られた。

血管石灰化進行には血管平滑筋細胞のアポトーシスが重要な役割を担っていることが知られている。このため、血管組織の TUNEL 染色および Western Blot (cleaved caspase) を行い、Group Ade および Gly で引き起こされた血管平滑筋細胞のアポトーシスが、Group Lys で抑制されていることも確認した。

臨床的には大動脈弁の石灰化も大きな問題であるため、上記ラットの動脈起始部の石灰化進展度も併せて評価し、動脈同様、L-リジン経口投与により、大動脈起始部の石灰化が著明に抑制される事を確認した。

### (3) 腎性骨症に与える影響



血管石灰化はしばしば骨粗鬆症に合併するため、上記動物モデルにおける骨病変を評価した。大腿骨をCT(上図)にて評価したところ、Group AdeおよびGlyにおいて、著明な骨粗鬆症様変化を認めた。一方、Group Lysにおいては、これらの変化が顕著に抑制された。

腎不全において、骨病変を来す最も重要な因子は二次性副甲状腺機能亢進症であるため、副甲状腺ホルモンを測定した。その結果、Group Ade, Glyで上昇した副甲状腺ホルモンがGroup Lysにおいて著明に抑制される事が明らかとなった。なお、L-リジンを経口投与されたL-リジンは腸管におけるカルシウムの吸収を促進することから、Group Lysにおける副甲状腺ホルモン抑制は、カルシウムを介した間接的なものであることが示唆された。

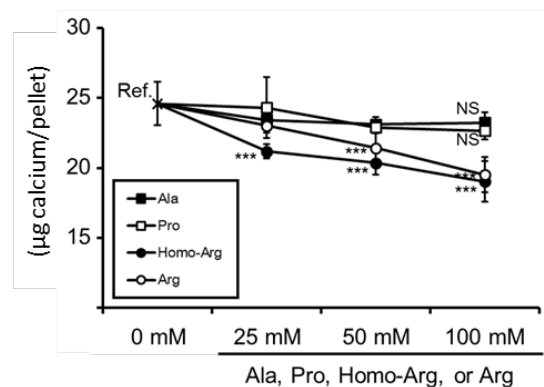
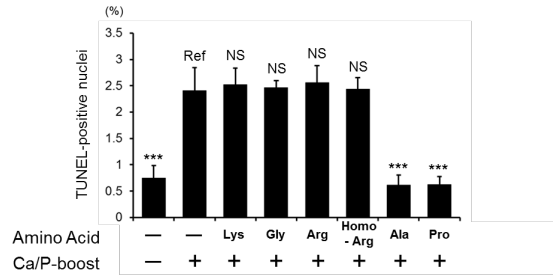
### (4) L-リジン混餌投与が血漿アミノ酸濃度に与える影響の検討

In vitroでの検討に先立ち、血漿のアミノ酸濃度を測定した。その結果、血漿アラニン・プロリン濃度がGroup AdeおよびGroup Glyで低下し、Group Lysで上昇していた。また血漿アルギニン・ホモアルギニン濃度がGroup Lysで上昇していた。なお、血漿リジン濃度はL-リジン投与有無にかかわらず、アデニン誘導性腎不全で上昇した。またカルバミル化リジン濃度を測定したところ、Group Lysで低下傾向にあり、L-リジン経口投与にてuremic memoryが解除された可能性が示唆された。

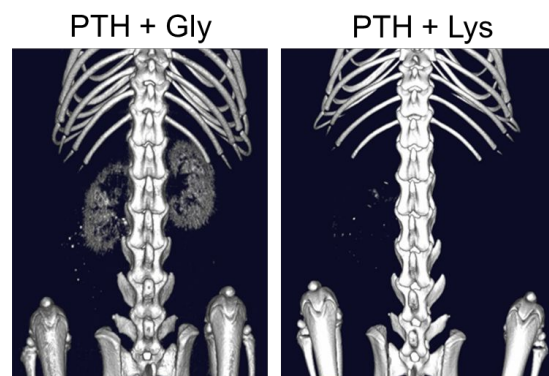
### (5) アラニン・プロリン・アルギニン・ホモアルギニンの作用検討

アデニンラットの血漿アミノ酸濃度変化から、アラニン・プロリン・アルギニン・ホモアルギニンが血管石灰化に關与していた可能性が示唆されたため、各アミノ酸を使いin vitroの検討を行った。その結果、アラニン・プロリンは血管平滑筋細胞のアポトーシ

スを抑制することが明らかになった(下図:TUNEL染色)。また、アルギニン・ホモアルギニンは、濃度依存性にカルシウム・リン酸の沈殿形成を抑制することが明らかとなった(下図グラフ)。これらの機序もGroup Lysにおける血管石灰化抑制に關与したと考えられた。



### (6) アデニンラット以外のモデルにおけるL-リジンの作用検討



アデニン腎症以外のモデルにおいて、L-リジンがどのような作用を發揮するか検討した。PTH 持続投与により腎石灰化が生じることを我々は以前報告した(Am J Physiol Renal Physiol. 2013 Mar 15;304(6):F751-60)。本モデルにグリシンを投与しても、腎石灰化は改善しないが、L-リジン投与によって、著明に腎石灰化が改善し、腎機能悪化も予防できる事が明らかとなった。

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 1 件)

Shimomura A, Matsui I, Hamano T, Ishimoto T, Katou Y, Takehana K, Inoue K, Kusunoki Y, Mori D, Nakano C, Obi Y, Fujii N, Takabatake Y, Nakano T, Tsubakihara Y, Isaka Y, Rakugi H.

Dietary L-Lysine Prevents Arterial Calcification in Adenine-Induced Uremic Rats.

J Am Soc Nephrol. 査読有 2014 Mar 20.  
[Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 8 件)

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆  
アミノ酸 L-lysine はアデニンラットの血管石灰化を抑制する  
Kidney Summit  
2013年12月21日  
東京

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆  
L-lysine ameliorates vascular calcification in adenine-induced uremic rats  
American Society of Nephrology, Kidney Week 2013  
2013年11月7日~11月10日  
Atlanta (USA)

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆  
アミノ酸 L-lysine はアデニンラットの血管石灰化を抑制する  
第58回日本透析医学会学術集会・総会  
2013年6月20日~6月23日  
福岡

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆  
L-lysine ameliorates vascular calcification in adenine-induced uremic rats  
ERA-EDTA 50<sup>th</sup> congress  
2013年5月18日~5月21日  
Istanbul (Turkey)

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆

L-lysine ameliorates vascular calcification in adenine-induced uremic rats

American Society of Nephrology, Kidney Week 2012

2012年10月30日~11月4日  
San Diego (USA)

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆

アミノ酸 L-lysine は adenine rat の血管石灰化を抑制する

第31回 腎と骨代謝研究会

2012年10月6日  
東京

松井功、下村明弘、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、楽木宏実、猪阪善隆

L-lysine ameliorates vascular calcification in adenine-induced uremic rats

ISN Nexus: Bone and the Kidney 2012, International Society of Nephrology

2012年9月20日~9月23日  
Copenhagen (Denmark)

下村明弘、松井功、濱野高行、井上和則、中野智香子、小尾佳嗣、楠康生、椿原美治、楽木宏実、猪阪善隆

アミノ酸 L-lysine はアデニンラットの血管石灰化を抑制する

第55回 日本腎臓学会学術総会

2012年6月1日~6月3日  
横浜

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/kid/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松井 功 (MATSUI, Isao)  
大阪大学大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60456986

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし