

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460190

研究課題名(和文)尿毒症物質-アルブミン尿-腎臓間クロストークに基づくCKD個別化治療戦略の構築

研究課題名(英文)Strategy for the personalized CKD medicine based on the crosstalk between albumin-bound uremic toxin and kidney

研究代表者

渡邊 博志(Hiroshi, Watanabe)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)は透析導入とともに心血管疾患(CVD)発症のリスク因子である。従って、腎予後の悪化やCVD発症に関わる分子機序の解明がCKD-CVDの病態制御に重要である。我々は病態の発症・進展に関わる液性因子として透析で抜けにくいアルブミン結合型尿毒素に着目した。中でもインドキシル硫酸(IS)とパラクレジル硫酸(PCS)に着目し、ISとPCSが誘発する腎障害の進展と心血管疾患発症機序について新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD), marked by a progressive loss in renal function, is a leading cause of hemodialysis initiation and cardiovascular disease (CVD). Understanding the molecular mechanism responsible for the progression of CKD and cardiovascular damage regarding crosstalk between the kidney and cardiovascular system is an important issue in controlling the pathogenesis of CKD-CVD. However, the mechanisms involved in CKD-CVD are not well understood. We have been investigating the role of protein-bound uremic toxins, that are difficult to remove by hemodialysis, on the onset and progression of CKD and CVD. Here, we focus on two sulfate conjugated uremic toxins, namely, indoxyl sulfate (IS) and p-cresyl sulfate (PCS), and summarize recent studies that provide new insights on the molecular mechanisms responsible for uremic toxin-induced oxidative tissue damage via a cardiovascular-renal connection.

研究分野：医療薬学

キーワード：尿毒素 腎障害 心血管障害 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は、腎障害や腎機能低下が慢性的に続く状態であり、血液透析導入並びに心血管疾患 (cardiovascular disease: CVD) 発症の重大な危険因子である。現在、日本には約 1,330 万人の CKD 患者がいると言われており、これは、成人の約 8 人に 1 人にあたる数である。また、末期 CKD である透析患者も 30 万人を超え、その数は毎年 1 万人ずつ増え続けると予想されている。加えて、透析患者の年間医療費の総額は 1 兆 5 千億円を超えていることから、CKD の制御による透析導入や心血管死の抑制は、保健衛生はもとよりのこと医療経済的にも最重要課題の一つとされている。特に、CKD 患者の主たる死因が CVD であることから、腎機能低下と心血管障害あるいは両臓器間のクロストークに関する分子機序の解明は CKD-CVD (心腎連関) の病態制御において重要なカギを握る。しかしながら、CKD 及び CKD-CVD に関する病態進展の分子機序、特に最近新たな危険因子として注目されるようになってきた酸化ストレスや炎症の誘発機序については十分に明らかにされておらず、これが新規治療法開発のボトルネックとなっている。

CKD の中でも腎不全あるいは透析期まで進行すると、全身的な代謝の変化及び尿中への代謝産物の排泄障害に伴い、さまざまな尿毒症物質が体内に蓄積する。これまでに約 90 種類の尿毒症物質が報告されており、それらは 1) 水溶性低分子 (フェニル酢酸、ネオプテリン、グアニジノコハク酸及び尿酸等)、2) 中分子 ( $\beta_2$ -ミクログロブリン、PTH、FGF23 及びシスタチン C 等) 並びに 3) 血清タンパク質結合性低分子 (インドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS)、*p*-クレジル硫酸 (*p*-cresyl sulfate: PCS)、フランジカルボン酸、馬尿酸及びキヌレニン酸等) の 3 つのグループに大別される。

なかでも、血清タンパク質結合性低分子尿毒症物質は、血清中に豊富に存在するアルブミンと強固に結合することから、血液透析による体外への除去は非常に難しく、透析後においても依然として高い血清中濃度を示す。最近、ヨーロッパとアジアの CKD 患者を対象とした臨床試験より、血清中 IS 及び PCS 濃度の上昇が、1) CKD の進展 (腎予後の低下)、2) CVD 発症に伴う死亡率の増加並びに 3) 総死因死亡率の増加と有意に相関することが次々と報告された。そのため、これら IS や PCS といった尿毒症物質が腎予後に加え、透析患者の CVD 発症リスクや長期予後の新規予測因子として注目されるようにな

ってきた。このように、病態の予後予測因子としてこれら尿毒症物質の位置付けは確立されつつあるが、一方で病態進展因子としての役割については不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究では CKD-CVD に関わる尿毒症物質として、PCS を取り上げ、それらの生体内レドックス特性と酸化ストレスに関連した臓器障害の分子機構について検討を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト近位尿細管上皮細胞株(HK-2)、血管内皮細胞株(HUVEC)及びヒト平滑筋細胞株(HASMC)を用いた。CKD ラットは 5/6 腎臓摘出ラットを用いた。

## 4. 研究成果

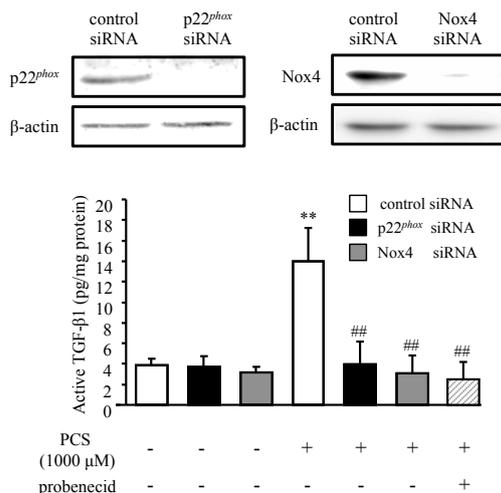
(1)PCS の腎近位尿細管への取り込みと NADPH oxidase を介した尿細管障害の分子機構

食物中のチロシンやフェニルアラニンに由来し、腸内細菌によって産生される *p*-クレゾールは、従来から積極的に研究が行われてきた尿毒症物質の一つであった。一方、2005 年に *p*-クレゾールの大部分は消化管吸収される際に腸管粘膜に存在する硫酸転移酵素により硫酸抱合を受け、循環血中においては、硫酸抱合体の PCS として存在していることが明らかとなった。しかしながら、IS とは異なりその動態特性並びに尿毒素としての作用については不明のままであった。

PCS は IS と同じくその構造内に硫酸基を有していることから、IS と類似した体内動態特性や生理作用を示す可能性が推察された。まず私達は、PCS のアルブミンに対する結合特性について限外濾過法及び蛍光プローブ法により検討した。その結果、IS と同様、PCS は血清中で主にアルブミン分子上のサイト II へ特異的に結合することが判明した。その際、結合定数は PCS 及び IS とともに  $10^5 \text{M}^{-1}$  オーダーであり、同程度の結合親和性を有していた。次に、私達は、PCS の腎排泄特性に関して、尿細管上皮細胞への PCS の取り込み機序を明らかにするために、ラット腎皮質スライス法を用いて PCS の取り込み実験を行った。その結果、PCS の取り込みが能動的であること ( $K_m=230\mu\text{M}$ )、またその取り込みは OAT 阻害剤と IS によって顕著に抑制された。このことから、PCS は、IS と同様に OAT の基質となることが強く示唆された。すなわち、PCS の腎排泄には OAT を介した尿細管上皮細胞への取り込みが大きく寄与し

ていると考えられた。

上述したように血清中 PCS 濃度は、腎予後の予測因子となることが報告されたことから、私達は次に、PCS が腎障害の進展因子として作用するという仮説を立て検証することにした。まず、HK-2 を用いて PCS のレドックス特性について検討した結果、PCS は PKC 及び PI3K 経路を介した NADPH oxidase の活性化により細胞内 ROS 産生を増大させた。その際、NADPH oxidase のサブユニットである Nox4 及び p22<sup>phox</sup> のタンパク質発現が増大していた。また、PCS は線維化に関連する TGF- $\beta$ 1、TIMP-1 及び Pro- $\alpha$ 1 (I) collagen の mRNA 及び active TGF- $\beta$ 1 のタンパク質発現を増大させた。これらの作用は、OAT の阻害剤である probenecid 及び Nox4 と p22<sup>phox</sup> の siRNA により抑制されことから、PCS による ROS 産生並びに腎線維化には PCS の OAT を介した細胞内蓄積とそれに伴う NADPH oxidase 活性化が大きく寄与していることが判明した (Fig.1)。次に、

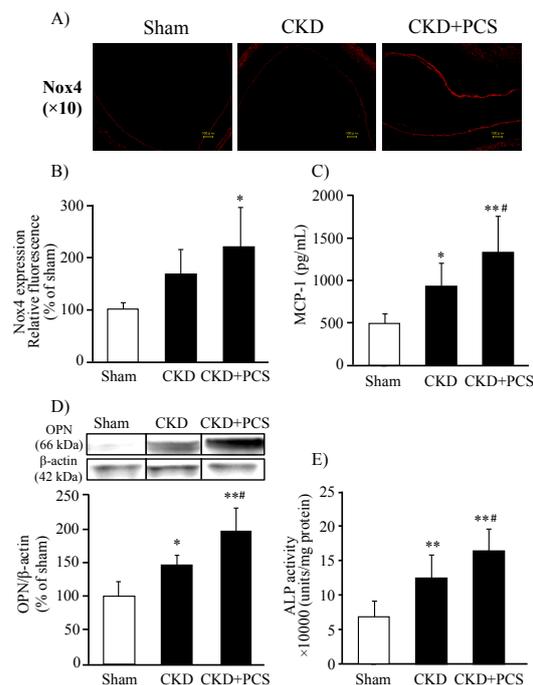


**Figure 1.** Effect of p22<sup>phox</sup>/Nox4 RNAi or probenecid on the PCS-induced active TGF- $\beta$ 1 protein secretion in HK-2 cells  
\*\* $P < 0.01$  versus w/o PCS; ## $P < 0.01$  versus PCS (1000  $\mu$ M).

本細胞実験から得られた結果を *in vivo* で検証するため、PCS を負荷した CKD ラットでの検討を行った。本ラットでは、血清中 PCS 濃度の上昇に伴い、腎尿細管変性と線維化の亢進が観察された。その際、HK-2 で観察された腎臓における Nox4 と p22<sup>phox</sup> の発現上昇及び NADPH oxidase 活性化に加え、TGF- $\beta$ 1 の産生亢進と腎線維化が認められた。以上の結果から、CKD 状態で尿細管細胞内に蓄積した PCS は NADPH oxidase の活性化を介して ROS 産生を誘導し、active TGF- $\beta$ 1 等の線維化関連因子の産生を亢進する結果、尿細管変性や腎線維化を惹起し、腎障害の進展因子となることが明らかとなった。

## (2)PCS により誘発される血管障害の分子機構

心腎連関の観点からは、PCS が OAT の基質であることを考慮すると、IS と同様に OAT を発現している血管系並びに骨芽細胞等においても取り込まれ、毒素としての生理作用を有する可能性が推察される。そこで血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞を用いて PCS による血管障害作用について検討したところ、腎尿細管と同様に NADPH oxidase の活性化を介した ROS 産生が血管障害のトリガーとなっていることを見出し、本検討は PCS 負荷 CKD モデルの大動脈弓を用いた検討において検証することができた (Fig.2)。



**Figure 2.** Effect of PCS administration on vascular Nox4 expression, serum MCP-1 level, vascular OPN expression and vascular ALP activity in CKD rats: (A) Representative vascular Nox4 expression in the arch of aorta, (B) Image analysis of the extent and intensity of Nox4 expression was performed, (C) Serum MCP-1 level, (D) vascular OPN expression and (E) ALP activity in the aortic arch samples were shown. Sham (n=6), CKD (n=10), and CKD+PCS (n=10) rats were measured 4 weeks after PCS administration (50 mg/kg/day ip) (mean  $\pm$  SD, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus sham, ## $P < 0.05$  versus CKD).

## (3)おわりに

これまでの臨床及び基礎研究により、IS や PCS といった血清タンパク結合性尿毒症物質の血清中濃度の上昇は CKD の進展に加え、その合併症である CVD 発症やミネラル/骨代謝異常に密接に関与することが明確になってきた。これら 2 つの尿毒症物質は腎臓、血管、骨に発現する OAT を介して細胞内へと取り込まれ、NADPH oxidase の活性化を介して細胞内 ROS 産生を亢進することで様々な毒素としての生理作用をもたらす。従って、今後、CKD 患者においてこれら尿毒症物質の体内蓄積を抑制すること、加えて、NADPH oxidase を標的とした CKD 状態における過剰な ROS 産生を制御する効果的な治療戦略の開発が求められる。

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)

1. Yamamoto S, Kazama JJ, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Matsuto T, Watanabe H, Maruyama T, Narita I. Continuous reduction of protein-bound uremic toxins with improved oxidative stress by oral charcoal adsorbent in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Sci Rep*. 査読有, 5, 14381 (2015) doi: 10.1038/srep14381
2. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M, Matsushita K, Mori Y, Kakuta T, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol Res Perspect*. 査読有, 3, e00092 (2015) doi: 10.1002/prp2.92
3. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 査読有, 9, e85216 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0085216
4. Tanaka H, Iwasaki Y, Yamato H, Mori Y, Komaba H, Watanabe H, Maruyama T, Fukagawa M. p-Cresyl sulfate induces osteoblast dysfunction through activating JNK and p38 MAPK pathways. *Bone*. 査読有, 56, 347-354 (2013) doi: 10.1016/j.bone.2013.07.002
5. Watanabe H, Miyamoto M, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. 査読有, 83, 446-454 (2013) doi: 10.1038/ki.2012.448

[学会発表] (計 19 件)

1. 渡邊 博志, 異島 優, 小田切 優樹, 丸山 徹 慢性腎臓病における腎-多臓器連関に関わる尿毒素の関与とその分子機構 日本薬学会 第136年会 2016/3/26-29 (神奈川: パシフィコ横浜)
2. 榎木 裕紀, 渡邊 博志, 荒毛 里歩, 富永 結菜, 杉本 龍星, 異島 優, 田中 元子, 松下 和孝, 深川 雅史, 小田切 優樹, 丸山 徹 尿毒素インドキシル硫酸はCKD病態の骨格筋萎縮を加速させる 第30回日本薬物動態学会 2015/11/12-14 (東京: タワーホール船堀)
3. Yuki Enoki, Hiroshi Watanabe, Masafumi Fukagawa, Toru Maruyama Indoxyl sulfate, a uremic toxin, accelerates skeletal muscle atrophy in CKD condition 第48回米国腎臓学会議 2015/11/3-8 (USA: San Diego Convention Center)
4. 渡邊 博志, 田中 元子, 深川 雅史, 小田切 優樹, 丸山 徹 慢性腎臓病における定量的酸化ストレス評価法の確立とそれを基盤とした治療戦略 第32回和漢医薬学会学術大会 2015/8/21-22 (富山: 富山国際会議場)
5. 榎木 裕紀, 渡邊 博志, 荒毛 里歩, 杉本 龍星, 異島 優, 田中 元子, 松下 和孝, 深川 雅史, 小田切 優樹, 丸山 徹 CKD病態の骨格筋萎縮における尿毒素の関与とその分子機構 第58回日本腎臓学会学術総会 2015/6/5-7 (愛知: 名古屋国際会議場)
6. 渡邊 博志, 南雲 恒平, 田中 遼大, 小玉 あずさ, 異島 優, 山田 尚之, 瀬戸山 博子, 田中 基彦, 佐々木 裕, 田中 元子, 深川 雅史, 小田切 優樹, 丸山 徹 酸化ストレス関連疾患とトランスレーショナルリサーチ 第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2014/11/15-16 (熊本)
7. Hiroshi Watanabe, Yohei Miyamoto, Yuki Enoki, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri and Toru Maruyama MOLECULAR PHARMACOKINETIC MECHANISMS OF OXIDATIVE STRESS-INDUCED TISSUE DAMAGE IN CHRONIC KIDNEY DISEASE FOR MEDICAL DEVELOPMENT AND THERAPEUTIC APPLICATION 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA

8. 渡邊 博志、宮本 洋平、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質 パラクレジル硫酸 による NADPH oxidase 活性化を介した尿細管及び血管障害作用 第26回 腎とフリーラジカル研究会 2014/9/20 (愛知: 産業労働センター ウィンクあいち)
  9. 今福 匡史、南雲 恒平、杉森 剛志、阿部 貴弥、申 曾洙、渡邊 博志、山田 尚之、田中 元子、松下 和孝、小田切 優樹、丸山 徹 透析患者における新規酸化ストレスマーカーとしてのシステイン付加Cys34アルブミンの有用性評価 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (神奈川: パシフィコ横浜)
  10. 渡邊 博志、宮本 洋平、榎木 裕紀、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質 p-クレジル硫酸 の酸化ストレス誘導を介した血管障害作用 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (神奈川: パシフィコ横浜)
  11. 宮村重幸、南雲恒平、杉森剛志、渡邊博志、山田尚之、小田切優樹、丸山徹 ESI-TOFMSを用いた透析患者由来ヒト血清アルブミンの翻訳後修飾解析 日本薬学会第134年会2014/3/27-30 (熊本)
  12. Hiroshi Watanabe, Yoshiaki Sakaguchi, Ryusei Sugimoto, Yu Ishima, Ken-ichi Kaneko, Hiroshi Iwata, Masaki Otagiri and Toru Maruyama Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate 8th International Society on Uremia Research and Toxicity 2014/3/13-15 (Okinawa convention hall)
  13. 榎木裕紀、渡邊博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒素の酸化ストレス誘導を介したマウス骨格筋細胞障害作用 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8 (長崎国際大学)
  14. 杉本 龍星、渡邊 博志、坂口 義明、宮本 洋平、異島 優、金子 健一、岩田 宏、小田切 優樹、丸山 徹 ヒト有機アニオントランスポーターは尿毒症物質p-クレジル硫酸の高容量性トランスポーターとして機能する 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8 (長崎国際大学)
  15. Hiroshi Watanabe, Yoshiaki Sakaguchi, Ryusei Sugimoto, Yu Ishima, Ken-ichi Kaneko, Hiroshi Iwata, Masaki Otagiri, Toru Maruyama TRANSPORT OF P-CRESYL SULFATE, A UREMIC TOXIN, VIA HUMAN ORGANIC ANION TRANSPORTER 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11 (東京: タワーホール船堀)
  16. 渡邊博志、宮本洋平、田中寿絵、異島 優、田中元子、松下和孝、深川雅史、小田切優樹、丸山 徹 尿毒症物質p-クレジル硫酸の酸化ストレス誘導を介した尿細管障害作用 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23 (福岡国際会議場など)
  17. 南雲恒平、杉森剛志、阿部貴弥、申 曾洙、渡邊博志、山田尚之、田中元子、松下和孝、小田切優樹、丸山 徹 ESI-TOFMSを用いた透析患者由来ヒト血清アルブミンの翻訳後修飾解析 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23 (福岡国際会議場など)
  18. 丸山 徹 尿毒症物質による酸化ストレスを介した臓器障害と治療戦略 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23 (福岡国際会議場など)
  19. 坂口義明、渡邊博志、宮本洋平、異島 優、金子健一、岩田 宏、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質p-クレジル硫酸の腎排泄過程におけるhOATsの関与 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25 (愛知、ウィンクあいち)
- [図書] (計8件)
1. Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, Albumin as a biomarker. Human serum albumin: Pharmaceutical and medical applications, edited by Masaki Otagiri et al. Springer (2016)
  2. 渡邊博志、丸山徹 タンパク結合率の臨床的な意義を教えてください。月刊薬事 3月号 じほう vol.58 No.4, 41-45 (2016)
  3. 田中元子、伊藤和子、奥田智子、今福匡史、渡邊博志、丸山徹、小泉賢洋、角田隆俊、深川雅史 CKD-MBDにおけるリン吸着薬の進歩と治療選択〜リンと鉄の関連を含めて〜最新透析医療 先端技術との融合 医薬ジャーナル社 699-701 (2016)
  4. Toru Maruyama, Hiroshi Watanabe, Victor TG Chuang. Recombinant albumin, Human Serum Albumin, edited by Masaki Otagiri

et al. 2013

5. Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Toru Maruyama. Binding of uremic toxin, Human Serum Albumin, edited by Masaki Otagiri et al. 2013
6. 渡邊博志 尿毒素を標的とした慢性腎臓病の治療戦略開発に向けて—薬事日報「研究戦略・YAKU学—研究現場から臨床へ—」2013
7. 渡邊博志、丸山徹 尿毒症毒素 透析患者の検査値の読み方 改訂第3版 211-213, 2013、臨床医学出版社
8. 渡邊博志 尿毒症物質による心腎連関を介した酸化ストレス臓器障害の分子機構 Molecular Mechanisms for uremic toxin-induced oxidative tissue damage via a cardiovascular-renal connection 薬学雑誌、8月号 (2013)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 博志 (WATANABE, Hiroshi)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398220

### (2) 研究分担者

丸山 徹 (MARUYAMA, Toru)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

小田切 優樹 (OTAGIRI, MASAKI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80120145