

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461250

研究課題名(和文)尿毒症物質をターゲットとした透析患者の心血管疾患発症の抑制を目指す包括的研究

研究課題名(英文) Treatment approach against cardiovascular disease in hemodialysis patients through improvement of uremic toxins

研究代表者

森 克仁 (Mori, Katsuhito)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60382040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Fetuin-Aは肝で合成・分泌される血管石灰化抑制因子であり、透析患者において血中fetuin-A濃度低値群では有意に心血管死・全死亡が高率であることが知られている。しかしfetuin-Aの発現・調節機序については明らかではない。我々は透析患者で蓄積する尿毒症物質であるインドキシル硫酸(IS)に着目した。ISは培養肝細胞HepG2におけるfetuin-A発現を、ダイオキシンの受容体として知られるAryl Hydrocarbon Receptorを介して抑制することを示した。以上より透析患者におけるIS蓄積が血中fetuin-A濃度を低下させ、血管石灰化、予後不良につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fetuin-A is a liver-derived circulating protein that has potent calcification-inhibitory activity. Uremic patients exhibit decreased serum fetuin-A levels, increased vascular calcification and elevated cardiovascular mortality. Because the mechanisms for fetuin-A deficiency are unknown, we hypothesised that some uremic toxins suppressed hepatic fetuin-A production, which resulted in accelerated vascular calcification and poor outcome. Among these potential candidates, indoxyl sulfate (IS) has highly toxic properties. We examined the direct effects of IS on hepatic fetuin-A expression using the human hepatoma HepG2 cell line. IS suppressed hepatic fetuin-A expression by activating the aryl hydrocarbon receptor, suggesting a relationship among uremia, fetuin-A deficiency and cardiovascular mortality.

研究分野：代謝・腎臓内科学

キーワード：fetuin-A インドキシル硫酸 心血管イベント 血液透析 CKD 尿毒症 血管石灰化 培養肝細胞

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

透析患者の心血管疾患の発症率は高く、その改善は医療経済的にも重要な課題である。特に透析患者における心血管疾患は血管あるいは弁膜等の異所性石灰化を特徴とし、その機序の解明が必須である。腎不全に伴う尿毒症物質の蓄積が心血管系への障害を惹起することが推測されるが、その中でインドキシル硫酸 (Indoxyl Sulfate: IS) はその候補のひとつである。一方、肝で合成・分泌される糖蛋白質 fetuin-A は生体内においてカルシウム(Ca)、リン(P)と可溶性複合体を形成することにより、腎不全・透析状態での過剰な P、Ca 濃度により生じる異所性石灰化を抑制することが知られている。これまでの観察コホート研究では、透析患者では血中 fetuin-A 濃度は低下し、さらに血中 fetuin-A 低値群では、高値群に比較し有意に生命・心血管予後が不良であることが報告されている。以上のことから fetuin-A 低値は血管石灰化を促進し、透析患者の心血管疾患発症・生命予後悪化につながると推測されるが、血中 fetuin-A 濃度がどのように制御されているのか、特に透析患者で低値をとる機序については明らかではない。

### 2. 研究の目的

尿毒症物質の一つである IS に焦点を当て、透析患者の予後予測因子かつ石灰化抑制因子である fetuin-A が IS によって直接抑制されるかどうか、培養肝細胞を用いて検討する。また血清保存した透析患者コホートにおいて、血中 IS 濃度と血中 fetuin-A 濃度の相関関係について臨床的な検討をおこなう。

### 3. 研究の方法

Fetuin-A の発現・分泌が確認されているヒトの hepatoma cell line である HepG2 細胞を用いて、IS の肝細胞に対する fetuin-A の発現・産生に対する直接効果を検討し、さらに臨床検体を用いて IS と fetuin-A の関係についても検証する。

### 4. 研究成果

IS は HepG2 細胞における fetuin-A の mRNA・蛋白発現を経時的 (0~24 時間) に、かつ濃度依存的 (0~1mM) に抑制した (図 1)。

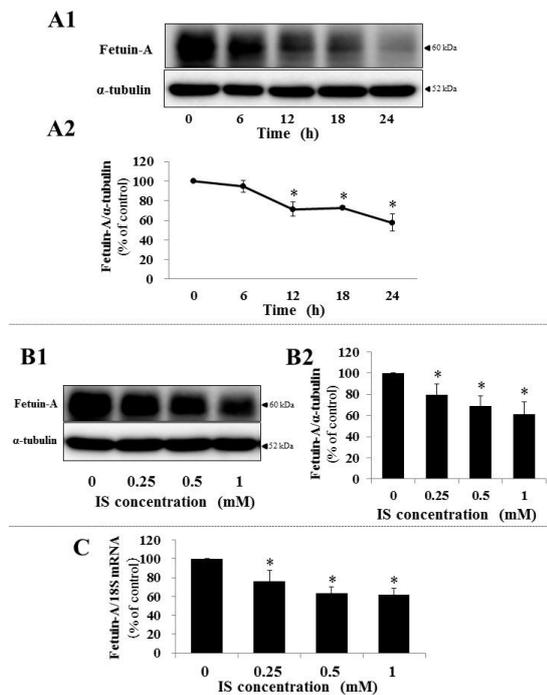


図 1 IS による経時的・濃度依存的 fetuin-A 発現抑制効果

この抑制は別の代表的な尿毒症物質である p-cresyl sulfate ではかからず、IS 特異的であると考えられた (図 2)。

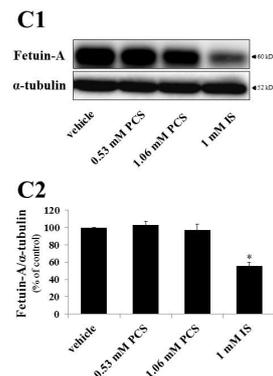


図 2 IS 特異的 fetuin-A 発現抑制効果

以前より IS は MAP kinase 系の活性化、あるいは酸化ストレスを誘導し細胞内にシグナルを伝達することが報告されていたため、HepG2 細胞において同様の検討を行った。IS は MAP kinase 系のうち、ERK1/2、JNK には影響しなかったが p38 のみ有意にリン酸化を促

進していた。したがって IS による fetuin-A 発現抑制が p38 を介している可能性を考え、p38 のノックダウンを行ったが発現回復は認められなかった (図 2)。

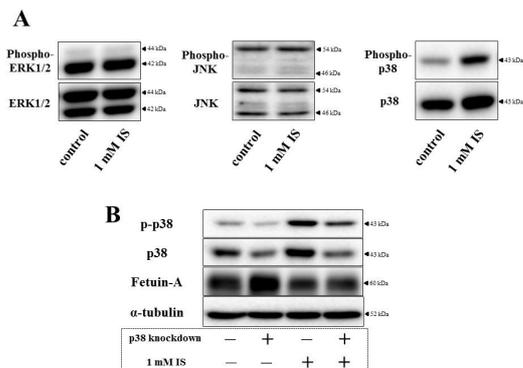


図 3 IS による fetuin-A 発現抑制には MAP kinase 系は関与しない

IS は既報通り HepG2 細胞においても酸化ストレス (Reactive oxygen species: ROS 産生) を誘導した。そこで抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を投与したところ、IS による ROS 産生は抑制されたが、この状況下で fetuin-A 発現回復は認められなかった (図 4)。

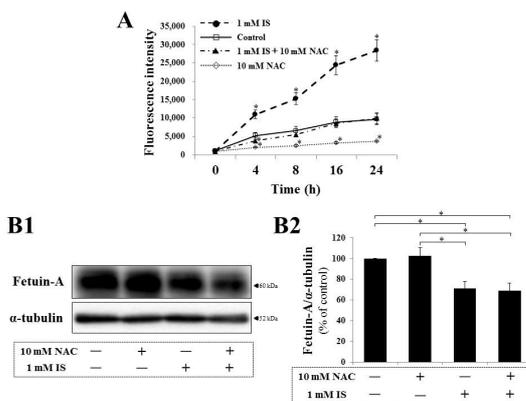


図 4 IS による fetuin-A 発現抑制には酸化ストレスは関与しない

近年、IS がダイオキシン受容体として知られる aryl hydrocarbon receptor (AhR) の内因性アゴニストであることが報告されている。そこで IS による fetuin-A 抑制に AhR が関与している可能性を考慮し、HepG2 細胞における AhR のノックダウンを行った。結果、IS により抑制された fetuin-A 発現は AhR ノ

ックダウンで回復した (図 5)。

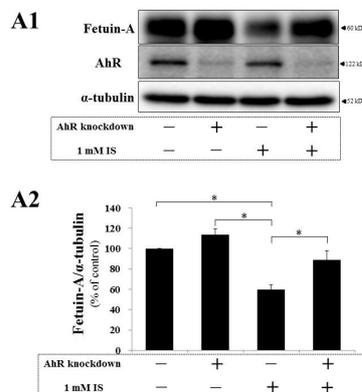


図 5 IS は AhR を介して fetuin-A 発現を抑制する

さらにヒトにおける IS と fetuin-A の関係を確認するため、透析患者の臨床検体を用い、検討中である (未発表)。

以上より透析患者では IS が蓄積し、その結果、肝 AhR に作用し、石灰化抑制因子である fetuin-A 発現を低下させ、結果的に血管石灰化促進、心血管イベント発症につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

Ochi A, Mori K, Nakatani S, Emoto M, Morioka T, Motoyama K, Fukumoto S, Imanishi Y, Shoji T, Ishimura E, Inaba M: Indoxyl sulfate suppresses hepatic fetuin-A expression via the aryl hydrocarbon receptor in HepG2 cells. *Nephrology, dialysis, transplantation* 2015; 30: 1863-92.

(査読あり) doi: 10.1093/ndt/gfv250

Ochi A, Mori K, Emoto M, Nakatani S, Morioka T, Motoyama K, Fukumoto S, Imanishi Y, Koyama H, Ishimura E, Inaba M: Direct inhibitory effects of pioglitazone on hepatic fetuin-A expression. *PLoS one* 2014; 9: e88704. (査読あり)

doi: 10.1371/journal.pone.0088704

[学会発表](計8件)

Ochi A, Mori K, Nakatani S, Emoto M, Motoyama K, Morioka T, Fukumoto S, Imanishi Y, Shoji T, Ishimura E, Inaba M: Indoxyl Sulfate Suppresses Hepatic Fetuin-A Expression through Aryl Hydrocarbon Receptor. ASN Kidney Week 2014, 2014.11.11-11.16, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Mori K, Shoji T, Ochi A, Okute Y, Sonoda M, Ichii M, Tshujimoto Y, Emoto M, Inaba M: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) as an Independent Predictor of Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. ASN Kidney Week 2014, 2014.11.11-11.16, Philadelphia, Pennsylvania, USA

越智章展、森克仁、仲谷慎也、森岡与明、今西康雄、絵本正憲、庄司哲雄、石村栄治、稲葉雅章: インドキシル硫酸による肝細胞の fetuin-A 発現抑制には Aryl Hydrocarbon Receptor は関与する. 第57回日本腎臓学会, 2014年7月4日~6日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

森克仁、庄司哲雄、越智章展、奥手祐次郎、園田実香、一居充、辻本吉広、田畑勉、絵本正憲、稲葉雅章: 血中 TRAIL は透析患者における心血管疾患発症の独立した予測因子である. 第57回日本腎臓学会, 2014年7月4日~6日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

森克仁、庄司哲雄、越智章展、奥手祐次郎、園田実香、一居充、辻本吉広、田畑勉、絵本正憲、稲葉雅章: 透析患者における血中 TRAIL と心血管疾患発症との関連. 第59回日本透析医学会, 2014年6月12日~15日, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市

越智章展、森克仁、仲谷慎也、森岡与明、

今西康雄、絵本正憲、庄司哲雄、石村栄治、稲葉雅章: インドキシル硫酸は Aryl Hydrocarbon Receptor を介して肝細胞の fetuin-A 発現を抑制する. 第59回日本透析医学会, 2014年6月12日~15日, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市

Ochi A, Mori K, Emoto M, Nakatani S, Morioka T, Motoyama K, Fukumoto S, Inaba M: Effects of Pioglitazone on Fetuin-A Expression in Hepatocytes. American Diabetes Association, 73rd Scientific Sessions, 2013.6.21-6.25, Chicago, Illinois, USA

越智章展、森克仁、絵本正憲、仲谷慎也、元山宏華、森岡与明、福本真也、稲葉雅章: インスリン抵抗性惹起糖蛋白質 fetuin-A の肝での発現調節 (pioglitazone の影響), 第56回日本糖尿病学会, 2013年5月16日~18日, 熊本県熊本市

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 克仁 (MORI, Katsuhito)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 60382040

(2)研究分担者

庄司 哲雄 (SHOJI, Tetsuo)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 40271192