

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293031

研究課題名(和文)有機アニオントランポーターの希少疾患を基礎とした普遍的腎不全治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel drugs for CKD

研究代表者

阿部 高明 (ABE, Takaaki)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：80292209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎不全から腎透析にいたる患者の数は年々増加している。腎不全時にはSLC04C1トランスポーターの発現は低下してお尿毒症物質の蓄積をもたらすと考えられた。そこでCKD時に蓄積する腎不全物質の細胞増殖抑制作用、エリスロポエチン産生抑制作用を検討した。なかでもインドキシル硫酸は生理的な濃度でGATA3の発現を介してSLC04C1の発現を抑制した。これらよりSLC04C1の発現はGATA3により負に制御されておりインドキシル硫酸はGATA3の発現増強を介してSLC04C1の発現を低下させることが示唆された。さらに我々はインドール化合物やGATA阻害薬が新たなCKD治療法となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The accumulated uremic toxins inhibit the expression of various renal transporters and this inhibition may further reduce renal function and subsequently cause the accumulation of uremic toxins. Recently, we have revealed that human kidney-specific organic anion transporter SLC04C1 excretes uremic toxins, and the up-regulation of SLC04C1 resulted in the reduction of blood pressure and renal inflammation in a CKD. We revealed that the uremic toxin transporter, SLC04C1, is negatively regulated by a representative uremic toxin indoxyl sulfate, through a transcription factor GATA3. The removal of indoxyl sulfate and blocking its signaling pathway should be an effective strategy to restore the SLC04C1-mediated renal excretion of uremic toxins.

In addition, among uremic toxins, indole-3-acetic acid significantly increased the cellular ATP level in Hep3B human cells. Indole derivatives may represent a novel therapeutic strategy for treating AKI and CKD as a mitochondria-homing drug.

研究分野：腎臓内科

キーワード：トランスポーター SLC04C1 尿毒素 腎不全 インドール

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全から腎透析にいたる患者の数は年々増加の一途をたどっており、毎年新たに3万人が透析に至ってしまう。腎不全時には尿毒症物質が血中に蓄積し各種臓器障害や腎性貧血、アシドーシス、神経症状等を引き起こし、心血管イベントの発症も有意に高いがその原因である尿毒症物質の実体、体内への輸送・蓄積・排泄のメカニズムは未だあまり明らかになっていない。

ヒト腎臓には尿毒症物質のなかの有機アニオンを排出するOATPトランスポーターは申請者が2004年に単離・報告したSLCO4C1しか存在せず、SLCO4C1は尿毒症物質を排除する新たな血液浄化システムの開発や腎臓移行性を目標とした創薬のターゲットとして非常に有用であると考えられる。

しかし腎不全時にはSLCO4C1を含むほぼ全ての血管側トランスポーターの発現が低下しており、このSLCO4C1トランスポーターの発現低下が糸球体濾過低下とともにヒト腎不全時における尿毒症物質排泄低下の原因と考えられた。

その仮説を検証するために我々はヒトSLCO4C1を腎臓特異的に発現するトランスジェニック(TG)ラットを作製した。腎不全状態においてTGラット群ではコントロール群に比較して高血圧、心肥大、腎臓内の炎症が軽減する事が明らかとなった。この腎症保護作用や降圧機序を解明するためにキャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)を用いて網羅的メタボローム解析を行ったところADMA、GSA、trans-aconitateの血中濃度が減少して炎症や高血圧が抑制されていることが明らかとなった。

この様にSLCO4C1トランスジェニック腎不全モデルは腎機能が改善するが、腎不全時にはその発現は低下しておりSLCO4C1の発現調節が腎機能保持、透析導入延長をもたらすと考えられた。一方、CKDにおけるSLCO4C1の発現が低下や腎性貧血のメカニズムはいまだ不明であった。

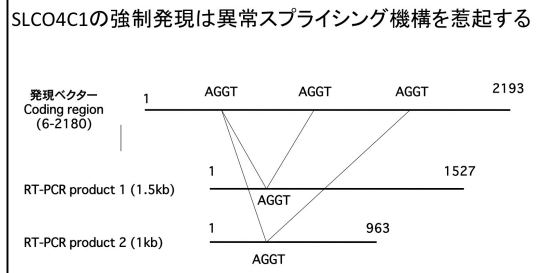
2. 研究の目的

そこで本研究では尿毒症物質がSLCO4C1の発現を低下させるのではないかという仮説を立てLC-MS/MSによる精密定量測定系を立ち上げて実際のCKD患者での代謝物の血中濃度を測定し、腎不全物質の解析とそれらがSLCO4C1の発現にどのように影響するのかを検討する事を目的とした。またそれら腎不全物質の合成経路の解明をとその解除法をあわせて検討した。またそれら化合物を貧血モデル、急性・慢性腎障害モデル、腎炎モデル、糖尿病腎症モデル、ミトコンドリア腎症のモデルに投与して腎機能・貧血への効果を確認する事を目的とした。

3. 研究の方法

SLCO4C1遺伝子の発現系の確立は多くの研究者が試みているのに非常に困難でありその研究が進んでいない。我々はその理由を詳細に解析したところヒトSLCO4C1のコーディング領域を培養細胞に強制発現させると多くの細胞が死滅すること、また強制発現細胞からSLCO4C1 mRNAを抽出・検討したところ強制発現系においてはSLCO4C1のmRNAのサイズがほとんどの細胞で小さくなっている事を明らかにした。cDNAのシーケンスを解析から強制発現時には正常では起こらないmRNA上での3カ所の部位で新たなスプライシングが起こっており、トランスポーター蛋白質としては機能しない構造が生じていた(下図)。このことはSLCO4C1を細胞に強制発現させるとその取り込み基質による細胞毒性が生じるためそれを回避するために細胞自身がSLCO4C1の遺伝子をスプライシングアウトし無毒化するのであろうと考えられた。同様のmRNA短小化はトランスジェニックラットでも起こっており生体の防御機構と考えられた。

そこで我々はこの異常スプライシングが



起こらないようにmutationを入れたコンストラクトを作製し強制発現細胞系を確立した。この細胞系は甲状腺ホルモンを時間的かつ濃度依存性に取り込むことが明らかとなった(投稿中)。

さらに今までは基質の放射性同位体を用いた取り込み実験がなされてきたがその煩雑性と標識体が限られるため今日はLC/MS/MSを用いた基質の細胞内取り込み実験が主流となっている。われわれは細胞内の化合物を取り込ませ、実験後終了後LC/MS/MS(TSQVantage)で測定する系が確立した。

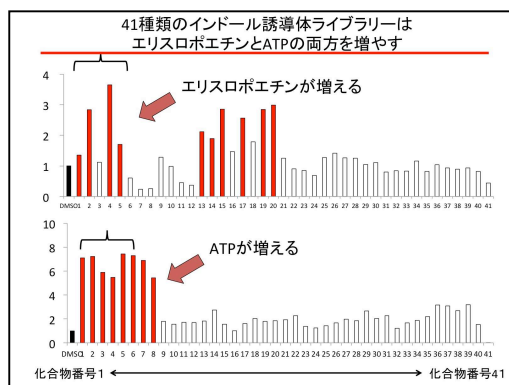
腎機能障害の時に蓄積する物質は100種類以上あるが、その中でそのもの自体に毒性があるものを尿毒症物質と呼ばれる。今日まで尿毒症物質の細胞毒性を網羅的に調べられたことは無く、報告されているのはインドキシル硫酸やパラクレシル硫酸、トリエチルアミンNオキシドが主である。そこで本研究では我々が確立したSLCO4C1発現系と測定系を用いて尿毒症物質のSLCO4C1による機能と毒性の相関を同時に解析を行なった。

#### 4. 研究成果

本研究では尿毒症物質がSLCO4C1の発現を低下させるのではないかという仮説を立てヒト近位尿細管由来細胞株であるHK-2細胞にCE-MSでヒトCKD時に蓄積する腎不全物質をそれぞれ含んだ培地で培養し、増殖抑制作用、エリスロポエチン産生抑制作用を目安に検討した。その結果、顕著にSLCO4C1の発現を低下させる3種類が見つかった。なかでもインドキシル硫酸はCKD患者での生理的な濃度でSLCO4C1 mRNA発現を抑制した。またインドキシル硫酸はまた腎臓に発現しているGATA転写因子群の中でGATA3の発現を濃度依存性に亢進させた。これらよりSLCO4C1の発現はGATA3により負に制御されており、インドキシル硫酸はGATA3の発現増強を介してSLCO4C1の発現を低下させることが示唆された。さらに我々はこれまでにインドキシル硫酸は直接GATA転写因子を介してエリスロポエチンの転写を抑制することを報告しており、インドール吸着剤やGATA阻害薬による腎性貧血改善も含めた総合的なCKD治療法となる可能性が考えられた。

また申腎不全患者の血中に100種類以上ある尿毒症物質のメタボローム解析を行いその中からインドール酢酸にエリスロポエチン産生促進作用のある物質を発見した。そこで我々は岡山理科大学の林謙一郎教授(連携研究者)と合同でインドールライブラリー数百種類を合成し構造特徴でグルーピングして代表例41種類のスクリーニングを開始し数種類の物質にEpo産生促進作用と細胞内ATP増加作用があることを見だし特許出願を行った(特願2012-258027、特願2013-209539)

本研究によりSLCO4C1の輸送体機能の低



下による尿毒症物質、特にインドキシル硫酸が腎臓内恒常性の破綻を引き起こし尿細管機能障害を引き起こすものと考えられた。また尿毒素の中にはインドール酢酸のように新たな治療メカニズムを理解する上で重要な物質が存在することも明らかとなった。

#### 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15件)

- ① Mishima E., Inoue C., Saigusa D., Inoue R., Ito K., Ito S., Tomioka Y., Itoh K. and Abe T. Conformational Change in tRNA is an Early Indicator of Acute Cellular Damage with Prognostic Significance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25: 2316-2326, 2014 (査読あり)
- ② Mullen W., Saigusa D., Abe T., Adamski J. and Mischak H. Proteomics and Metabolomics as Tools to Unravel Novel Culprits and Mechanisms of Uremic Toxicity: Instrument or Hype? *Semin. Nephrol.* 34:180-190, 2014 (査読あり)
- ③ Masereeuw R., Mutsaers H.A., Toyohara T., Abe T., Jhawar S., Sweet D.H. and Lowenstein J. The Kidney and Uremic Toxin Removal: Glomerulus or Tubule? *Semin. Nephrol.* 34:191-208, 2014 (査読あり)
- ④ Sato T., Yamaguchi H., Kogawa T., Abe T. and Mano N. Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 play an important role in uremic toxin handling and drug-uremic toxin interactions in the liver. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 17: 475-84, 2014 (査読あり)
- ⑤ Takeuchi Y., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Suzuki C., Suzuki T., Kobayashi T., Suzuki Y., Nakayama T., Takeshima Y., Vazquez, N., Ito S., Gamba G. and Abe T. Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman's Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 271-279, 2015 (査読あり)
- ⑥ Mishima E., Fukuda S., Shima H., Hirayama A., Akiyama Y., Takeuchi Y., Fukuda N.N., Suzuki T., Suzuki C., Yuri A., Kikuchi K., Tomioka Y., Ito S., Soga T. and Abe T. Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 1787-1794, 2015 (査読あり)
- ⑦ Ohmine K., Kawaguchi K., Ohtsuki S., Motoi F., Ohtsuka H., Kamiie J., Abe T., Unno M. and Terasaki T. Quantitative Targeted Proteomics of Pancreatic Cancer: Deoxycytidine Kinase Protein Level Correlates to Progression-Free Survival of Patients Receiving

- Gemcitabine Treatment. *Mol. Pharm.* 12: 3282-3191, 2015 (査読あり)
- ⑧ Uchida Y, Toyohara T, Ohtsuki S, Moriyama Y, **Abe T.**, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics for 28 transporters in brush-border and basolateral membrane fractions of rat kidney. *J. Pharm. Sci.* 105: 1011-6, 2016. (査読あり)
- ⑨ Mishima E., Jinno D., Akiyama Y., Itoh K. Nankumo S., Shima H., Kikuchi K., Takeuchi Y., Suzuki T., Elkordy A., Niizuma K., Ito S., Tomioka Y. and **Abe T.** Immuno-Northern blotting: Detection of RNA modifications by using antibodies against modified nucleosides. *Plos One* 10 :e0143756, 2015 (査読あり)
- ⑩ Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Matsuhashi T., Matsuo A., Sato T., Oba Y., Watanabe S., Minaki D., Saigusa D., Shimbo H., Mori N., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Yuri A., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Kohzuki M., Anzai J., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Toyomizu M., Ito S., Osaka H., Hayashi K. and **Abe T.** Mitochonic Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Tohoku J. Exp. Med.* 236: 225-232, 2015 (査読あり)
- ⑪ Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Hashizume O., Nagatoishi S., Matsuo A., Sato T., Kudo T., Matsuhashi T., Murayama K., Ohba Y., Watanabe S., Kanno S.-I., Minaki D., Saigusa D., Shinbo H., Mori N., Yuri A., Yokoro M., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Ichimura T., Anzai J., Kohzuki M., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Tohyomizu M., Tsumoto K., Kazuto Nakata K., Bonventre J.V., Ito S., Osaka H., Hayashi K. and **Abe T.** Mitochonic acid MA-5 binds to mitochondria and ameliorates renal tubular and cardiac myocyte damages. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27: 1925-1932, 2016 doi: 10.1681/ASN.2015060623 (査読あり)
- ⑫ Sato T., Ito H., Hirata A., **Abe T.**, Mano N. and Yamaguchi H. Interactions of crizotinib and gefitinib with organic anion-transporting polypeptides (OATP)1B1, OATP1B3, and OATP2B1: gefitinib shows contradictory interaction with OATP1B3. *Xenobiotica* 2017 Jan 12:1-6. doi: 10.1080/00498254.2016.1275880 (査読あり)
- ⑬ Sato E., Mori T., Mishima E., Suzuki A., Sugawara S., Kurasawa N., Saigusa D., Miura D., Morikawa-Ichinose T., Saito R., Oba-Yabana I., Oe Y., Kisu K., Naganuma E., Koizumi K., Mokudai T., Niwano Y., Kudo T., Suzuki C., Takahashi N., Sato H., **Abe T.**, Niwa T., Ito S. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2016 Nov 10;6:36618. doi: 10.1038/srep36618. (査読あり)
- ⑭ Mishima E., Fukuda, Mukawa C, Yuri A, Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Akiyama Y., Fukuda N., Tsukamoto H., Asaji K., Shima H., Kikuchi K., Suzuki C., Suzuki T., Tomioka Y., Soga T., Ito S. and Takaaki **Abe T.** Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a Capillary Electrophoresis-Time of Flight Mass Spectroscopy-based metabolomics approach. *Kidney International in press.* (査読あり) 2017年
- ⑮ Shima H., Sasaki K., Suzuki T., Mukawa C., Obara T., Oba Y., Matsuo A., Kobayashi T., Mishima E., Watanabe S., Akiyama Y., Kikuchi K., Matsuhashi T., Oikawa Y., Nannto F., Akiyama Y., Ho H.-J., Chitose Suzuki C., Saigusa D., Masamune A., Tomioka Y., Masaki T., Ito S., Hayashi K. and **Abe T.** A novel indole compound MA-35 attenuates renal fibrosis by inhibiting both TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> pathways. *Scientific Reports in press.* (査読あり)・2017年
- [学会発表] (計 19 件)
- ① AMED 難治疾患実用化研究事業「ミトコンドリア病の診療の質を高めるレジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」班 2017年2月11日(日本生産性本部 IPC 生産性国際交流センター、神奈川県三浦郡葉山町)「ミトコンドリア病; 治療へ向けて」新規化合物 MA-5 の分子標的とミトコンドリア病への有効性 (ア) 阿部高明
- ② 第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会 (017年1月15日(京都) 京都国際会議場、京都市) シンポジウム 15 「腸管シグナルと生体調節機構」慢性腎臓病 (CKD) と腸内細菌叢 阿部高明

- ③ The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (2016年10月31日TKP ガーデンシティ品川、東京都) シンポジウム5: Frontier of therapy: focusing the mechanism> 「Development of a novel mitochondrial drug, MA-5」  
阿部高明
- ④ 第一回黒潮カンファレンス (2016年10月23日サンライズ九十九里、千葉) 「異分野融合による創薬研究の前衛を目指して」特別講演1  
ミトコンドリア病治療から代謝機能制御へ  
阿部高明
- ⑤ 第46回腎臓学会西部学術大会 (2016年10月15日シーガイア コンベンションセンター、宮崎市) ワークショップ2 「腸内細菌叢と腎疾患」阿部高明
- ⑥ 第46回腎臓学会東部学術大会 よく分かるシリーズ20 (2016年10月8日京王プラザ、東京都) 「ミトコンドリア機能障害と腎臓」阿部高明
- ⑦ 第59回日本腎臓学会 (2016年6月17日横浜国際会議場、横浜市) シンポジウム5 「マイクロバイオームと腎」「慢性腎臓病と腸内細菌叢」阿部高明
- ⑧ 第61回透析医学会 (2016年6月11日大阪国際会議場、大阪市) シンポジウム11: 「透析患者とエピジェネティクス」尿毒素によるエピジェネティック修飾と腎不全  
阿部高明
- ⑨ 第5回ゲノム創薬・医療フォーラム (2016年4月26日東京大学 医科学研究所、東京都) 「ミトコンドリア創薬と臓器保護」  
阿部高明
- ⑩ 第14回東北・北海道先天代謝異常症研究会 (2016年5月27日、良陵会館、仙台市) 「ミトコンドリア病治療薬の開発」阿部高明
- ⑪ 第19回日本心血管内分泌代謝学会総会 (2015年12月11日神戸国際会議場、神戸市) シンポジウム2 「生体の代謝異常と心血管病」「腎不全時の腸内環境変化と治療応用」  
阿部高明
- ⑫ 第30回日本薬物動態学会 (2015年11月12日、タワーホール船堀、東京都) シンポジウム2 「腎領域研究の最前線と薬物動態研究との接点」

ミトコンドリア病治療薬の開発と問題

阿部高明

- ⑬ 第49回日本栄養学会東北支部大会 (2015年10月24日東北大学農学部、仙台市) 公開シンポジウム「高血圧・腎臓病に関する最近の話題」腎不全時の腸内環境変化とその治療  
阿部高明
- ⑭ 第5回日本病院薬剤師会東北ブロック学術大会 (2015年6月7日山形テルサ、山形市) 医薬品相互作用研究会特別シンポジウム  
生活習慣病とトランスポーター  
阿部高明
- ⑮ 第58回日本腎臓学会 (2015年6月5日名古屋国際会議場、名古屋市) シンポジウム1 「腎臓領域の創薬の未来」ミトコンドリア病治療薬  
阿部高明
- ⑯ 第120回解剖生理学会 (2015年3月21日神戸国際会議場、神戸市) シンポジウム27 「細胞機能と膜輸送体・イオンチャネルの関連」腎不全物質の除去はトランスポーターの悪性サイクルを解除する  
阿部高明
- ⑰ 第88回日本薬理学会 (2015年3月18日名古屋国際会議場、名古屋市) シンポジウム59: 「新たな視点からの腎発生と病態修飾分子」メタゲノムとメタボローム解析による腎不全時の腸内環境変化の検討  
阿部高明
- ⑱ 第44回日本腎臓学会東部学術大会 (2014年10月24日ベルサール新宿グランド、東京都) シンポジウム1 「動脈硬化と腎」虚血性腎症  
阿部高明
- ⑲ 第111回内科学会 (2014年4月12日東京国際フォーラム、東京都) シンポジウム2 「各種臓器の血管病変と治療の展望」慢性腎臓病の病態と新規治療  
阿部高明

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2件)

名称: 臓器線維化疾患の治療剤

発明者: 阿部高明、林謙一郎ほか

権利者: 東北大学、岡山理科大学

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2015/005455

出願年月日: 2015年10月27日

国内外の別: 国外

名称：血中尿毒症物質の低減剤  
発明者：阿部高明、富岡佳久  
権利者：東北大学  
種類：特許出願  
番号：2016年10月31日  
出願年月日：2016年10月31日  
国内外の別：国内

○取得状況（計3件）

名称：L S T-1及び／又はL S T-2によつて輸送される化合物  
発明者：阿部高明  
権利者：東北大学  
種類：特許  
番号：特許第6021148号  
取得年月日：2016年10月14日  
国内外の別：国内

名称：エリスロポエチン産生促進剤  
発明者：エリスロポエチン産生促進剤  
権利者：東北大学ほか  
種類：特許  
番号：特許第5818905号  
取得年月日：2015年10月9日  
国内外の別：国内

名称：G A T A阻害剤を有効成分とする有機イオントランスポーター発現増強剤及びG A T A発現抑制剤  
発明者：阿部高明、曾我朋義  
権利者：東北大学、慶応大学  
種類：特許  
番号：特許第5812382号  
取得年月日：2015年10月2日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部高明 (ABE TAKAAKI)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：80292209

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )