

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860094

研究課題名(和文) トランスポーター発現調節と腸内細菌叢変動を標的とした新規慢性腎臓病治療法の開発

研究課題名(英文) Kidney transporter and gut microbiota as therapeutic targets for chronic kidney disease

研究代表者

秋山 泰利 (Akiyama, Yasutoshi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70635557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 透析患者の血中代謝性物質濃度を網羅的に測定し、非透析患者とのプロファイルの相違を明らかにした。(2) 新規インドール酢酸誘導体(MA-5)がミトコンドリアにおけるATP産生促進作用を持ち、ミトコンドリア病の新規治療薬となる可能性を明らかにした。(3) 下剤の一種であるルビプロストンが、腎不全モデルマウスに対する投与にて腸内細菌叢をいわゆる善玉菌優位に変化させ、腎機能低下および尿毒素の蓄積を抑制することを明らかにした。(4) RNaseの一種であるAngiogeninのin vivoの作用を検討し、既報で示唆されていたtRNAのCCA末端の切断作用は否定的であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) We comprehensively evaluated serum concentrations of 122 ionic compounds in hemodialysis (HD) patients. We identified 38 solutes and 23 solutes that were higher and lower, respectively, in HD patients than non-dialyzed chronic kidney disease (CKD) patients. (2) We revealed that a newly synthesized indole derivative (MA-5) increased cellular ATP level and survival of fibroblasts from patients with mitochondrial diseases. These data suggest that MA-5 has the potential to become a novel therapeutic drug for treatment of mitochondrial diseases. (3) We revealed that ClC-2 chloride channel activator lubiprostone improved the gut microbiota, resulting in amelioration of CKD progression. (4) Using next-generation sequencing, we examined whether ribonuclease angiogenin (ANG) cleaves CCA-termini of tRNAs in vivo. The proportion of tRNA-derived fragments with CCA did not increase in ANG-treated cells, suggesting that ANG does not cleave CCA-termini in vivo.

研究分野：腎臓病学

キーワード：尿毒素 腸内細菌 ミトコンドリア tRNA

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは、慢性腎臓病の血清および慢性腎不全モデルラットの血漿をキャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS) にて網羅的に解析し、腎機能低下に伴い体内に蓄積する代謝性物質を数多く同定している (*Hypertens Res* 2010, *Toxins* 2012)。また申請者らはヒト近位尿細管血管側に発現する SLC04C1 トランスポーターを単離し (*PNAS* 2004)、SLC04C1 が尿毒症物質の排泄を担うこと、また脂質異常症治療薬であるスタチンが SLC04C1 の発現増強を介して尿毒症物質の排泄を促進し高血圧や腎障害が改善することを報告した (*JASN* 2009)。さらに尿毒症物質のインドキシル硫酸が SLC04C1 の発現を負に制御しており、インドキシル硫酸を除去することで SLC04C1 の機能が回復することを見だし (*PLOS ONE* 2013)、SLC04C1 が尿毒症物質排泄による新規 CKD 治療の標的分子であることを報告してきた。

本研究では、CKD におけるトランスポーターの発現制御機構のさらなる解明、加えて尿毒症物質の毒性や産生源、トランスポーターによる尿毒症物質輸送の特性の解明を行うことで、尿毒症物質を効率良く除去する CKD 治療法の開発を目指すことを目的とし、以下に示す問題を解決すべき課題と捉えた。なお、(4)は 2015 年 10 月から留学中の米国ブリガム&ウィメンズ病院にて行った研究である。

(1) 維持透析患者の 5 年生存率は依然 60%程度と低く、貧血、骨ミネラル代謝異常、心血管系疾患などの合併症の発症が予後を悪化させる要因となっている。これらの病態に尿毒素の関与が想定されているが、透析患者における各種尿毒素の血中濃度はほとんど知られておらず、また透析患者の代謝動態が保存期腎不全患者と比較しどのように変化しているのかもほとんど明らかになっていない。

(2) 腎不全物質の網羅的解析にて、われわれはインドール酢酸 (Indole-3-acetic acid: IAA) が慢性腎臓病 (CKD) 患者にて蓄積することを明らかにした。IAA は植物においては成長ホルモンとして機能することが知られており、マウスおよびヒトの線維芽細胞の増殖を促進することが報告されているが<sup>1)</sup>、哺乳動物における機能は不明な点が多い。

(3) 腎機能の低下に伴い体内に蓄積する尿毒素のうち、インドキシル硫酸やパラクレシル硫酸などは産生に腸内細菌叢が関与することが知られている。しかしながら腸内細菌叢と CKD の関連はこれまでほとんど明らかになっていない。

(4) ストレス環境下において、RNase の一種である Angiogenin (ANG) は tRNA のアンチコドン を切断し 2 種類の断片 (tRNA-derived

stress-induced fragments: tiRNAs) を生成する。*in vitro* の実験に基づいたデータから、ANG は tRNA の CCA 末端も切断し、さらに CCA 付加酵素である TRNT1 によりストレス解除後は速やかに CCA が修復されると報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら *in vivo* において ANG が tRNA の CCA 末端の切断に関与するかは明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

(1) 透析患者の透析前後の代謝性物質の血中濃度をキャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS) にて網羅的に測定し、これを非透析 CKD 患者の血中濃度と比較することで、透析患者における代謝性物質のプロファイルを明らかにし、透析患者に特異的に蓄積する尿毒素および代謝性物質を同定する。加えて、透析により除去され欠乏に陥りやすい物質を明らかにすることで、生体に有益な代謝性物質や栄養素の喪失が、透析患者の病態に関与している可能性を検討する。

(2) IAA およびその誘導体のスクリーニングを行い、これらの物質が細胞の増殖および生存を促進するかを検討し、その分子学的機序と生体への作用を明らかにする。

(3) CKD 患者において便秘が腸内細菌叢の悪玉化をもたらす可能性が報告されていることから、ルビプロストン (C1C-2 クロライドチャネル活性化を機序とする下剤) の腎機能および血中尿毒素濃度への影響を検討する。

(4) *in vivo* において ANG が tRNA の CCA 末端を切断するか、また TRNT1 が CCA 修復に関与するかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 標準的な血液透析 (IV 型 PS 膜ダイアライザーにて週 3 回、各 4 時間) を施行中の 11 名の患者 (女性 6 名、男性 5 名。平均年齢 61.8 ± 6.3 歳、平均透析期間 8.1 ± 8.2 年) の血液透析前後の血清を採取し、CE-MS にて 500 種以上の代謝性物質の血中濃度を網羅的に測定し、結果を以前われわれが報告した非透析 CKD 患者 (stage G3: 11 名, stage G4: 17 名, stage G5: 13 名) の血中濃度 (*Hypertens Res* 2010) と比較した。特に CKD stage G5 の平均血中濃度と透析前の平均血中濃度を比較することで、透析患者に特異的に蓄積、または欠乏する物質を同定した。

(2) IAA 誘導体のライブラリーのスクリーニングを行い、細胞の増殖および生存を促進する物質 (Mitochonic Acid 5: MA-5) を同定した。さらに同定した物質をミトコンドリア病患者から採取した線維芽細胞に投与し、酸化ストレス環境下での細胞死抑制効果が得られるかを検討した。また腎障害モデルマウス (虚血再灌流およびシスプラチン腎症) やミ

トコンドリア病モデルマウス (Mitomice) に投与し、腎障害およびミトコンドリア病に対する治療薬としての可能性を検討した。

(3) ルビプロストンをアデニン投与腎不全モデルマウスに投与し、腎機能および血中尿毒素濃度への影響を検討した。

(4) 1時間のANG処理を行ったU2OS細胞から得られたtotal RNAを電気泳動し、tRNA分画とtiRNA分画をゲル抽出し、それぞれの分画毎にcDNAライブラリーを作製した。次世代シーケンサー(NGS)による解析を行い、tRNAにマッピングされたリードのうちtRNA遺伝子上の3'末端を含むものを抽出し、さらにこれらのリードのうち末端にCCAを有する割合を算出した。同様にCCA付加酵素であるTRNT1のノックダウン細胞からもtiRNA分画をゲル抽出した上でcDNAライブラリーを作製しNGS解析を行った。

またNGSの結果を生化学的に立証するため、ANG処理細胞のtotal RNAをゲル抽出して得たtiRNAおよびtRNA分画を、RNAリガーゼの一種であるRtcB(ANGによる切断で生じる2',3'-環状リン酸基と5'-水酸基を結合する酵素)の存在下で5'-水酸基をもつRNAオリゴとインキュベートし、ライゲーション産物を生成するか(ANGによる切断を受けていれば3'-末端に2',3'-環状リン酸基をもつためオリゴと結合する)を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 測定しえた122項目のうち、38物質で透析前においてCKD stage G5の患者と比較し有意な蓄積が認められた。このうち少なくとも、malonate, ADMA, trans-aconitate, hippurate, 3-indoxyl sulfate, glutarate, trimethylamine N-oxide, creatinine, indol-3-aceateの8物質は生体に対する毒性が示唆されており、透析患者における病態に関与している可能性があると考えられた。逆に、毒性が示唆されている物質の中でSDMAは透析前後とも有意に低濃度であり、またguanidinosuccinateは透析前においてはCKD stage G5と同程度であるが透析後は有意に低値となっていた。透析患者はこれらの物質の毒性は非透析CKD患者と比較し低減している可能性が示唆された。

一方透析患者において透析前後とも有意に低濃度の物質を23物質同定した。これらの中で4-hydroxy-3-methoxybenzoate, 5-methyltetrahydrofolateなどは生体に有益な作用が示唆されており、透析患者においては尿毒症物質の蓄積だけではなく、有益な物質の欠乏も病態に関与している可能性が示唆された。加えてbutanoateを代表とする短鎖脂肪酸は透析患者で欠乏する傾向を認めた。これらの短鎖脂肪酸は腸内細菌叢で産生され体内に吸収されることが知られており、透析患者における腸内細菌叢の変化を反

映している可能性が考えられた。

これまで同じ測定系で透析患者と保存期CKD患者における代謝性物質の血中濃度を網羅的に比較した報告はほとんどなく、今回明らかにした122物質のプロファイルは透析前後の代謝動態の変化に加え、保存期CKD患者との差異をも明らかにした点で有益な情報になると考えられた(投稿中)。

(2) IAA誘導体のライブラリーのスクリーニングにて、細胞の増殖および生存を促進する物質(Mitochonic Acid 5: MA-5)を同定した。MA-5は細胞内のATPレベルを増加させ、酸化ストレス条件下での細胞死を抑制した。いまだ有効な治療薬のない難病であるミトコンドリア病は、ミトコンドリアにおける呼吸鎖が障害されATP産生が低下することを特徴とする。申請者らはMA-5のATP産生促進作用に着目しミトコンドリア病に対する新規治療薬としての可能性を検討した。Leigh症候群、MELASなどのミトコンドリア病患者より採取した線維芽細胞を用いた検討では、MA-5は容量依存性に酸化ストレス条件下(L-buthionine-(S,R)-sulfoximine投与)における細胞生存率を改善した。この結果はMA-5がミトコンドリア病の新規治療薬となる可能性を示唆していると考えられた(*Tohoku J Exp Med* 2015)。in vivoでの検討では、MA-5はマウスへの投与にて虚血再灌流およびシスプラチン投与による腎障害を軽減することを明らかにした。さらにミトコンドリア病モデルマウスであるMitomiceへのMA-5投与にて、心筋障害や腎障害の顕著な改善傾向を認めた。これらの結果より、新規IAA誘導体MA-5はミトコンドリア病や酸化ストレスによる腎障害への新たな治療戦略となる可能性が高いと考えられた。特にミトコンドリア病は現在においても有効な治療法が確立されていないのが現状であり、MA-5はミトコンドリア病に対する画期的な治療薬となる可能性を持っていると考えられた(*JASN* 2015)。

(3) アデニン腎症モデルマウスへの投与にて、ルビプロストンは腎機能(BUN)を改善し、また尿細管障害、腎線維化および腎内炎症を抑制した。アデニン腎症による腎不全では、腸内細菌叢のいわゆる善玉菌(LactobacillaceaeおよびPrevotella)が減少していたが、ルビプロストン投与によりこれらの回復が認められた。CE-MSによる検討では、ルビプロストンの投与にてインドキシル硫酸や馬尿酸などの尿毒素の血中濃度の減少が認められた。これらからルビプロストンは腸内細菌叢および腸内の環境を改善することで、CKDにおける腎機能障害の進行および尿毒素の蓄積を抑制する可能性があると考えられた(*JASN* 2015)。

(4) tRNA 分画では CCA 末端を有する割合 (%CCA) は Control 93.5%、ANG 92.9%と ANG 処理によりわずかに低下を認めた。しかしながら CCA を有しない tRNA のリード数は ANG 処理によっても増加せず、この低下は ANG による tiRNA 産生に伴う全長 tRNA の減少によるものと考えられた。

tiRNA 分画 (20-50 nt) では、ANG 処理により 3'-tiRNA は著明に (>5 倍) 増加した。しかしながらこれらのほとんどは CCA を有しており、また CCA を有しないフラグメントのリード数は ANG 処理によっても増加を認めなかった。結果として %CCA は ANG により有意に増加した (Control 88.8%、ANG 98.5%)。さらに CCA 付加酵素である TRNT1 をノックダウンした細胞において ANG 処理を行い、同様に 3'-tiRNA の %CCA を算出したところ TRNT1 ノックダウンは %CCA に有意な変化をもたらさないことが明らかとなった。

RtcB リガーゼによる tRNA および tiRNA 分画と RNA オリゴとの結合実験では、5'-tiRNA は 3'-末端が 2', 3'-環状リン酸基であるため、オリゴとのライゲーション産物を生成した。しかしながら 3'-tiRNA と tRNA ではライゲーション産物は検出されず、CCA 末端はそのまま維持されていることが示唆された。しかしながら、total RNA を *in vitro* において ANG 処理を行ったところ、5'-tiRNA だけでなく、3'-tiRNA および tRNA 分画でもライゲーション産物を検出した。これらの結果から、*in vitro* では ANG は tRNA の CCA 末端を切断する可能性があるものの、*in vivo* では切断はしないことが強く示唆された (投稿準備中)。

#### <引用論文>

1. G Abu Sinna. The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3 cells. *Comp Biochem Physiol C* 74: 433-436, 1983.

2. Andreas Czech, Sandra Wende, Mario Mörl, Tao Pan, and Zoya Ignatova. Reversible and rapid transfer-RNA deactivation as a mechanism of translational repression in stress. *PLoS Genet* 9: e1003767, 2013.

#### 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 4 件)

1. Shawn M Lyons, Marta M Fay, Yasutoshi Akiyama, Paul J Anderson, and Pavel Ivanov. RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA Biology* 14: 171-178, 2017.

DOI 10.1080/15476286.2016.1272746  
査読あり

2. T Suzuki, H Yamaguchi, M Kikusato, O Hashizume, S Nagatoishi, A Matsuo, T Sato, T Kudo, T Matsushashi, K Murayama, Y Ohba, S Watanabe, S i Kanno, D Minaki, D Saigusa, H Shinbo, N Mori, A Yuri, M Yokoro, E Mishima, H Shima, Y Akiyama, Y Takeuchi, K Kikuchi, T Toyohara, C Suzuki, T Ichimura, J i Anzai, M Kohzuki, N Mano, S Kure, T Yanagisawa, Y Tomioka, M Tohyomizu, K Tsumoto, K Nakada, J V Bonventre, S Ito, H Osaka, K i Hayashi, and T Abe: Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol* 2015,

DOI 10.1681/ASN.2015060623 査読あり

3. Takehiro Suzuki, Hiroaki Yamaguchi, Motoi Kikusato, Tetsuro Matsushashi, Akihiro Matsuo, Takeya Sato, Yuki Oba, Shun Watanabe, Daichi Minaki, Daisuke Saigusa, Hiroko Shimbo, Nobuyoshi Mori, Eikan Mishima, Hisato Shima, Yasutoshi Akiyama, Yoichi Takeuchi, Akinori Yuri, Koichi Kikuchi, Takafumi Toyohara, Chitose Suzuki, Masahiro Kohzuki, Jun-Ichi Anzai, Nariyasu Mano, Shigeo Kure, Teruyuki Yanagisawa, Yoshihisa Tomioka, Masaaki Toyomizu, Sadayoshi Ito, Hitoshi Osaka, Ken-Ichiro Hayashi, and Takaaki Abe: Mitochondrial 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.

DOI 10.1620/tjem.236.225 査読あり

4. Eikan Mishima, Shinji Fukuda, Hisato Shima, Akiyoshi Hirayama, Yasutoshi Akiyama, Yoichi Takeuchi, Noriko N Fukuda, Takehiro Suzuki, Chitose Suzuki, Akinori Yuri, Koichi Kikuchi, Yoshihisa Tomioka, Sadayoshi Ito, Tomoyoshi Soga, and Takaaki Abe: Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J Am Soc Nephrol* 26: 1787-1794, 2015, DOI 10.1681/ASN.2015060623 査読あり

#### [学会発表] (計 1 件)

1. 秋山泰利. CE-MS による透析患者に特異的な尿毒素の網羅的探索. 第 60 回日本透析医学会学術集会・総会 (2015 年 6 月 27 日、横浜市パシフィコ横浜)

#### [図書] (計 1 件)

1. 秋山泰利、阿部高明. 尿毒症の症状と診療法. 腎疾患・透析最新の治療 2017-2019、2017 年、南江堂. 査読なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 泰利 (AKIYAMA, YASUTOSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：70635557