

19980 770

平成10年度  
厚生科学研究費補助金

健康科学総合研究事業

透析合併症の病態解明及びそれに基づく治療法に関する研究

研究報告書

1999.3.

主任研究者 宮田 敏男

## 目 次

序文	総括班長	宮田 敏男	東海大学医学部 内科、助教授	
研究報告				
1. 透析合併症の病態解明と治療法の確立	主任研究者	宮田 敏男	東海大学医学部 内科、助教授	1
2. カルボニル病態生理学	分担研究者	渡辺 毅	福島県立医科大学 医部内科、教授	23

## 序

現在我が国では人工透析を受けている患者は 17 万人を超え、患者数は世界の 20% 強になり、透析療法にかかる医療費は年間 1 兆円を超えている。この透析患者のうち、毎年約 1~1.5 万人程度が亡くなっているが、新規透析導入患者が毎年 2.5 万人程度いるので、正味 1~1.5 万人程度の増加傾向が続いている。近年、食生活の変化に伴ない糖尿病患者が著しく増加し、これにより透析に導入される患者がますます増加している。さらに日本では米国と比べて腎移植の数が年間 500 人前後と低く、これ以上の大幅な増加は期待できない事を考えると、透析患者の増加が今後も予測される。透析療法の進歩により生命予後は世界最高水準に達しているが、それに伴い長期透析に伴う血管疾患・透析アミロイドーシスなどの合併症の増加などの新たな問題が出現している。

また腹膜透析は、在宅治療が可能で患者の社会復帰に貢献するが、腹膜機能低下により 5 年以内に 50% の患者が血液透析への移行を余儀なくされる。さらに、致死的な合併症である硬化性皮嚢性腹膜炎が数%に認められ、腹膜透析の普及を妨げている。

近年、これらの長期透析合併症の発症機序について、腎不全における糖・脂質の非酵素的反応(non-enzymatic biochemistry)の異常の重要性が指摘されている。糖・脂質は酸化・非酸化的機構により、反応性の高いカルボニル基を有する構造体に変化し、非酵素的に蛋白を修飾して、advanced glycation (lipoxidation) end products (AGEs, ALEs)を生成する。透析合併症の病変部においてこれらの生成物が証明され、糖・脂質から有害なカルボニルを形成し、蛋白修飾を介して組織障害をもたらす可能性(カルボニルストレス)が注目されている。

本研究の目的は、1) 腎不全におけるカルボニルストレスの反応経路、及び腎不全合併症におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義を明

らかにし、透析合併症の発症機序を解明すること、さらに 2) カルボニルストレスを調節し有害なカルボニルの形成を抑制する、或いは生成したカルボニルを消去する透析療法や薬剤の開発を行うことにより合併症の発症を抑制する治療法を開発することである。

本研究班の成果から、透析合併症の病態解明に対する多くの新しい知見が得られ、さらにこれらに対する新たな治療法の可能性が示唆され、患者の長期予後や quality of life(QOL)の改善と医療費の節減の可能性が期待される。このように本研究班はこの分野での総力を結集したものであり、着実な成果を上げている。今後、さらに未解決の問題に対して検討して行きたい。

平成 11 年 3 月

研究班長 宮田 敏男

(東海大学医学部、助教授)

## 研究課題 透析合併症の病態解明及びそれに基づく治療法の確立

主任研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授

**研究要旨** 透析患者の増加と透析の長期化に伴い心血管合併症・透析アミロイドーシス・腹膜硬化症などの透析合併症の増加が問題となっている。これら透析合併症の発症進展に関わる因子として、糖・脂質から生成される反応性の高いカルボニル化合物とそれが蛋白を修飾して最終的に生成される蛋白修飾物質の重要性が指摘され、カルボニルストレスという概念として提唱された。本研究では 1) 腎不全におけるカルボニルストレスの形成メカニズム、および腎不全合併症におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義を解明すること、さらに 2) カルボニルストレスを阻害、あるいは生成されたカルボニル化合物を消去することにより合併症の発症進展を抑制する治療法を確立する目的で研究が行われた。この結果、これら透析合併症に対する病態についてのいくつかの新しい知見が得られ、新たな透析療法・治療薬の可能性が報告された。

### 研究組織

#### 研究協力者

稲城 玲子 東海大学総合医学研究所  
講師  
上田 裕彦 東海大学総合医学研究所  
前田 憲志 名古屋大学医学部大幸  
医療センター 教授  
堀江 勝智 名古屋大学医学部大幸  
医療センター  
南学 正臣 東京大学医学部第一内科  
助手  
和田 健彦 東京大学医学部第一内科  
大園 恵幸 長崎大学医学部第二内科  
助教授  
宮崎 正信 長崎大学医学部第二内科

### A. 研究目的

心血管合併症・透析アミロイドーシス・腹膜硬化症などの透析合併症の発症進展に関わる因子として、糖・脂質から生成される反応性の高いカルボニ

ル化合物とそれが蛋白を修飾して最終的に生成される蛋白修飾物質の重要性が指摘され、カルボニルストレスという概念として提唱された。本研究の目的は 1) 腎不全におけるカルボニルストレスの形成メカニズム、および腎不全合併症におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義を解明すること、さらに 2) カルボニルストレスを阻害、あるいは生成されたカルボニル化合物を消去することにより合併症の発症進展を抑制する治療法を確立する事である。この為、本年度は I. 腎不全におけるカルボニルストレスの形成メカニ

ズムの解明、II. 腹膜硬化症の発症機序の解明を行う、III. カルボニルストレスを阻害あるいは消去する透析治療、治療薬の開発を行うことを目指してきた。それぞれの具体的な目的を以下に示す。

### I. 腎不全におけるカルボニルストレスの病態生理学

Advanced glycation end products (AGEs) は蛋白の非酵素的な糖酸化反応により形成され、老化や糖尿病合併症進展への関与が示唆されている。近年 AGEs は、糖尿病ばかりでなく動脈硬化、腎不全合併症、神経変性疾患、慢性関節リウマチなど必ずしも高血糖を伴わない種々の疾患の病態に関与していることが示唆されてきた。特に、腎不全における AGEs や脂質過酸化物の蛋白修飾物である advanced lipoxidation end products (ALEs) の著明な蓄積は、前駆物質である糖、脂質およびアミノ酸から生成する低分子量で反応性の高いカルボニル化合物 (RCOs) の増加を示唆する。そこで、血液透析患者および腹膜硬化症は持続携帯腹膜透析 (CAPD) 患者を対象と

し、腎不全におけるカルボニルストレスの形成のメカニズムにつき化学的解析を行った。

### II. 腹膜硬化症の発症機序の解明

CAPD 患者によく見られる重大な長期合併症の1つで、腹膜機能低下を招き CAPD 療法の継続を困難にする。しかし、その発症機序や、それに関わる病因因子などは未だ明らかにされていない。腹膜硬化症では腹膜中皮層の線維化/肥厚、中皮細胞の消失、血管透過性の亢進、血管新生などが認められ、これら所見は腹膜機能異常を引き起こし、最終的に除水能の低下を招くものである。近年、CAPD 腹膜機能低下の原因として、加熱滅菌処理 PD 液中の糖分分解産物としての反応性カルボニル化合物や、腎不全血液中に蓄積する糖・脂質由来の反応性カルボニル化合物による生体内蛋白の修飾、すなわち AGEs/ALEs の形成が挙げられる。これら最終産物は、蛋白の担う本来の機能を低下させ、新たな生理活性を誘導することが示されつつある。そういったことから、CAPD 患者腹膜の形態/機能異常に PD 液由来、あるいは患者血液

由来の多量な反応性カルボニル化合物（カルボニルストレスと提唱している）が関与するか否かという点は非常に興味深く、今後の CAPD 療法のあり方を考える上で早急に明らかにしたい問題点である。

そこで本研究では腹膜硬化症の病態とカルボニルストレスとの関連性を病理学的に解析し、腹膜硬化症発症・進展の機序解明、新しい予防・治療薬の開発の可能性などに関する検討を行った。

### III. カルボニルストレス仮説に基づく治療法の開発

前述したように腎不全生体内におけるカルボニルストレスが長期腎不全合併症の病態に関与している可能性が指摘されてきている。このことから、カルボニルストレスを軽減させることができれば合併症の発症や進展を阻害することができると考えられ、カルボニルストレスを軽減するような新治療法が開発が望まれる。阻害薬品として最近我々は thiazolidine 誘導体に属する化合物がカルボニルストレスを有効に阻害する可能性を見だし、いくつかの

カルボニルストレスインヒビターのモデル化合物を得た。また、我が国においては慢性透析療法約 94 %を血液透析療法が占めており、血液透析膜がカルボニルストレスに及ぼす影響も重要であり、カルボニルストレスを軽減するような透析膜の開発は慢性血液浄化法において有用であると考えられる。本研究の目的はこれらの有用性を *in vitro* 及び *in vivo* で検討し、カルボニルストレスを軽減することを通じて長期透析合併症の発症進展を抑制する効果を明らかにするとともに臨床的応用に結びつけることである。

### **B. 研究方法**

#### I. 腎不全におけるカルボニルストレスの病態生理学

対象は、健常人 16 名、非糖尿病の血液透析患者 42 名、非糖尿病の CAPD 患者 17 名である。CAPD 透析液としてダイアニール PD-4（バクスター製）および同じ組成の液を調製し濾過滅菌して用いた。CAPD 排液については CAPD 透析液を CAPD 患者腹腔内に一定時間貯留したものを使用した。イン

キュベーション実験は腎不全患者血漿あるいは CAPD 排液の限外濾過液にウシ血清アルブミンを添加し 37°C で一定期間インキュベートすることにより行った。シッフ塩基形成阻害剤を用いた実験については、アミノグアニジンあるいは  $\pm$ 2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) の存在下でインキュベートすることにより行った。RCOs の測定は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 溶液を CAPD 透析液あるいは CAPD 排液の限外濾過液に加え反応させた後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析することにより行った。総 RCOs 濃度は CAPD 透析液あるいは CAPD 排液の限外濾過液に DNPH を添加して反応させた後、吸光度を測定することにより行った。ペントシジン濃度は血漿あるいはインキュベートしたサンプルを 6N 塩酸を用いて 110°C で 16 時間加水分解後、逆相 HPLC で測定した。

## II. 腹膜硬化症の発症機序の解明

1. CAPD 腹膜硬化症の病理学的解析、及びカルボニルストレスの病態生理学的意義。

CAPD 患者の場合、PD 液由来と血液由来のカルボニル化合物に曝露される。これら 2 種類のカルボニル化合物がいかなる病理生理学的意義を有するかを各々詳細に検討していくことが望まれる。本研究は腹膜蛋白の修飾がどちらのカルボニル化合物に起因するかを明らかにするため、各種カルボニル化合物由来 AGEs/ALEs に特異的な抗体を用いて CAPD 患者の腹膜組織にて免疫組織学的に解析した。対象は 36 名の CAPD 患者の腹膜で、内 3 名が導入時の症例とした。今回は CAPD 療法による腹膜の経時的变化を見るために、糖尿病、腹膜炎の既往の無い症例のみとした。これらの腹膜組織は 20%ホルマリンに固定後パラフィン包埋し、3 $\mu$ m に薄切後、HE 染色、PAS 染色、間接法による免疫組織染色にて解析した。今回は一次抗体に、抗 AGE 抗体としてマウス抗カルボキシメチルリジン抗体、ウサギ抗ペントシジン抗体、抗 ALE 抗体としてマウス抗マロンジアルデヒドリジン抗体、ウサギ抗 4 ヒドロキシ 2 ノネナール抗体を使用した。

2. 腹膜硬化症における vascular endothelial cell growth factor (VEGF)の病



## 因論

これまでに VEGF は血管新生、血管透過性亢進、慢性炎症反応の惹起といった種々の生理活性を有することが明らかにされている。これらの活性は腹膜硬化症の一部の病理像の誘因となれることから、腹膜硬化症病変部における VEGF mRNA の動態を検討した。具体的に、加熱滅菌処理した PD 液に多量に含まれる浸透圧物質、グルコースの分解産物からなる反応性カルボニル化合物 (glyoxal, methylglyoxal, 3-deoxyglucosone) 存在下でラットの腹膜中皮細胞、あるいはヒト由来血管内皮細胞を 3 時間培養し、VEGF mRNA の発現量を RT-PCR 法にて比較検討した。さらに methylglyoxal を 10 日間腹膜内投与したラットの腹膜を採取し、同様の方法にて in vivo における VEGF mRNA 発現量の変化を検討した。また近年、VEGF が血管内皮に作用すると NO 合成酵素 (NOS) が活性化され、NO の産生量に比例して血管拡張を誘導することが証明されている。そこで腹膜硬化症にみられる血管拡張といった病理像に NOS が関与しているかどうかを検討するため、腹膜機能が低下した

CAPD 患者腹膜と正常腹膜における NOS の発現量を mRNA レベルで比較検討した。

## 3. 腹膜硬化症における heat shock protein (HSP) 47 の病因論

従来、HSP は様々なストレス下で発現し、生体反応に重要なものである。中でも HSP47 はコラーゲン産生に深く関係していることが明らかとなりつつあり、今回、CAPD 腹膜組織における HSP47 の発現を調べ、腹膜硬化の発症・進展における役割を検討した。具体的に、32 人の患者より得られた腹膜組織を対象とした。内訳は CAPD 療法中止時に得られた腹膜組織 20 例と CAPD 導入時に腹膜カテーテル挿入時に得られた腹膜組織 (I 群) 12 例である。これらパラフィン切片に免疫組織化学的に HSP47, コラーゲン III, マクロファージ、 $\alpha$ -smooth muscle actin(SMA)を染色した。なお、CAPD を中止した患者群を、除水能が保たれている群 (II 群) と低下群 (III 群) とに分けて検討した。

## III. カルボニルストレス仮説に基づく治療法の開発

カルボニルストレスインヒビターの

モデル化合物である OPB-9195 について *in vitro* ならびに *in vivo* においてカルボニルストレス抑制効果を検討した。*in vitro* の実験系においてウシ血清アルブミンと各種前駆体（グルコース、アスコルビン酸）の混合物に OPB-9195 を添加してインキュベートし、生成する最終産物（AGEs / ALEs）を測定し、これをマーカーとして OPB-9195 の形成抑制効果を検討した。

同様にウシ血清アルブミンと CAPD の排液（高レベルのカルボニル化合物を含有していることが示されている）との混合物に OPB-9195 を添加してインキュベートし、生成したペントシジン濃度を測定することで OPB-9195 の形成抑制効果を検討した。

また、細胞内シグナル伝達に対する検討として反応性カルボニル化合物による細胞内蛋白のチロシン残基のリン酸化反応に対する OPB-9195 の抑制効果をウエスタンブロッティングで解析した。

*In vivo* の実験系としては、ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて局所におけるカルボニルストレスの存在を免疫組織学的方法により検討し、OPB-

9195 投与による動脈硬化病変の違いを検討した。更に、糖尿病モデルラットにおける糖尿病性腎症の発症に対する OPB-9195 の効果を *in situ* hybridizaion を用いて病理組織学的に検討した。

更に、透析膜が血液透析患者生体内のカルボニルストレスに及ぼす影響を検討する目的では以下の検討を行った。

日本とベルギーの維持血液透析患者計 126 人を対象として透析前血漿を採取し、そのペントシジン濃度を測定して比較することにより膜素材（対象膜：ポリスルホン(PS)膜・ポリアクリロニトリル(PAN)膜・ポリメチルメタクリレート(PMMA)膜・再生セルロース(RC)膜）によるカルボニルストレスの効果を検討し、対象患者のいくつかの属性（透析膜・残存尿量・血漿総蛋白濃度・血漿アルブミン濃度・透析歴・年齢）から維持血液透析患者のカルボニルストレスを規定する因子を変数選択-重回帰分析を用いて統計学的に解析を行った。

また縦断研究として、ポリアクリロニトリル膜を用いて維持透析を施行していて協力が得られた患者において 10 週間ポリスルホン膜へ変更し、膜素材

の変更が生体内のカルボニルストレスに及ぼす影響を検討した。

## C. 研究結果

### I. 腎不全におけるカルボニルストレスの病態生理学

#### 1. 血液透析患者におけるカルボニルストレス

健常人ならびに血液透析患者の血漿を 37°C でインキュベートしたところ、時間とともに、ほぼ直線的にペントシジンの生成量は上昇した。ペントシジンの生成速度は健常人血漿と比較して血液透析患者のほうが有意に速かった。血液透析患者の透析前の血漿中のペントシジンレベルと 37°C のインキュベートにより増加するペントシジン量との間には有意な相関が認められた。血漿の限外濾過液にアルブミンを添加してインキュベートした場合、血液透析患者のほうが健常人の場合よりペントシジンの生成量が有意に高かった。*in vitro* でウシ血清アルブミンとグルコースあるいはアスコルビン酸とアミノグアニジンあるいは OPB-9195 の存在下でインキュベートしたところ、ペントシジ

ンの生成量は濃度依存的に抑制された。さらに、腎不全患者血漿にアミノグアニジンを添加してインキュベートしたところ、ペントシジンの生成は抑制された。血液透析患者の透析前の血漿中には総 RCOs 濃度が健常人と比較して約 4 倍増加していた。

#### 2. CAPD 患者におけるカルボニルストレス

加熱滅菌した CAPD 透析液中には、濾過滅菌した CAPD 液中と比較してグルコースの分解物であるジカルボニル化合物（グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソン）が多く含まれていた。これらのジカルボニル化合物の濃度は、CAPD 透析液中のグルコース含量の増加とともに高くなった。CAPD 排液中のこれら 3 種のジカルボニル化合物の量は貯留時間の経過とともに低下したが、総 RCOs レベルは貯留時間の経過とともに上昇した。RCOs の反応性を検討するため、CAPD 患者血漿、CAPD 排液等の限外濾過液にアルブミンを添加し 37°C でインキュベートし、ペントシジンの生成量を測定した。その結果、CAPD 排液の場合、貯留時間の経過とともにペン

トシジンの生成量は上昇し、除蛋白した CAPD 患者血漿を用いた場合の値に近づいた。インキュベートの実験で、アミノグアニジンや OPB-9195 の存在下でペントシジンの生成が抑制された。

## II. 腹膜硬化症の発症機序の解明

### 1. CAPD 腹膜硬化症の免疫組織学的解析、及びカルボニルストレスの病態生理学的意義

今回用いた検体の中で、5年以上 CAPD を施行した症例の多くは、形態・組織学的に腹膜硬化症を呈していることが、HE 染色、PAS 染色にて確認された。導入時の腹膜では、いずれの抗 AGEs/ALEs 抗体を用いた免疫組織学的解析においても明らかな陽性所見を認めなかった。しかし腹膜硬化の進展と共に、血管、中皮細胞、中皮下結合組織に AGEs/ALEs が著明に検出された。また染色パターン、程度はすべての抗体において概ね同様であった。

### 2. 腹膜硬化症における VEGF の病因論

PD 液由来の各種カルボニル化合物存在下でラットの腹膜中皮細胞を培養し、VEGF mRNA の発現量を比較検討した

ところ、glyoxal, 3-deoxyglucosone 存在下においてはその発現量に変化が認められなかったものの、methylglyoxal 存在下では、その発現が添加 methylglyoxal 量に比例して有意に亢進することが明らかとなった。さらに同様の現象はヒト由来血管内皮細胞を用いた実験においても認められた。この methylglyoxal による VEGF mRNA の発現亢進が in vivo 実験系においても認められるか否かを検討するため、methylglyoxal 腹膜内投与ラットの腹膜における VEGF mRNA 発現量の動態を検討した結果、前述の in vitro の実験結果と同様、腹膜における VEGF 発現量は投与した methylglyoxal 量に比例して亢進することが判明した。加えて、腹膜機能が低下した CAPD 患者腹膜と正常腹膜における NOS の発現量は、誘導型 NOS (iNOS) 発現は両群でかわらないものの、内皮細胞由来 NOS (eNOS) の発現量は CAPD 患者腹膜では正常腹膜に比べ有意に亢進している事が明らかにされた。

### 3. 腹膜硬化症における HSP 47 の病因論

CAPD 開始時の腹膜(I 群)では、一層

の腹膜中皮細胞が見られ、中皮下層の肥厚も認められなかったが、CAPD 中止群においては、多くの中皮細胞が脱落し、コラーゲンの増殖による中皮下層の肥厚を認めた。特に除水能低下群 (III 群) では、除水能が低下していない群 (II 群) や I 群に比して線維化が著明であり、線維層の一部には硝子化を認めた。HSP47 は、I 群では、ごく一部の細胞にしか発現していなかったが、II 群、III 群では肥厚した中皮下層に強く発現が認められた。その発現の程度は II 群は I 群より、III 群は II 群、I 群より有意に強かった。また、コラーゲン III の発現も、I 群 < II 群 < III 群の順に有意に増強していた。マクロファージの浸潤、および SMA の発現は、III 群において他群より有意に多く認められた。HSP47 の発現は、コラーゲン III、SMA、マクロファージの発現と正の相関を示し、CAPD 療法の期間が 60 ヶ月以上の患者群において、60 ヶ月未満の群に比してその発現は有意に増強していた。さらに HSP47 の発現は、難治性腹膜炎の患者腹膜においても増強しており、これまでの腹膜炎の回数と正の相関を示した。

### III. カルボニルストレス仮説に基づく治療法の開発

*In vitro* のインキュベート実験において OPB-9195 の添加によりグルコース由来のペントシジン・CML、及び脂質由来の MDA-lysine, HNE とともに生成の抑制効果が認められ、CAPD 排液とウシ血清アルブミンの混和物のインキュベート実験においてもこれに由来するペントシジンの OPB-9195 による生成抑制効果が認められた。

細胞内シグナル伝達についても、カルボニル化合物により惹起されるチロシン残基のリン酸化を介する伝達系に対して OPB-9195 が抑制効果をもつことが示唆された。

ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて頸動脈内膜肥厚部に一致して免疫組織化学的にカルボニルストレスの存在が認められ、この内膜肥厚は OPB-9195 の経口投与により軽減が認められた。糖尿病モデルラットにおける糖尿病性腎症の発症進展に関しても *in situ hybridization* の結果、OPB-9195 による抑制効果が認められた。

透析膜によるカルボニルストレスに

対する効果について、透析前の患者血漿の血漿ペントシジン濃度を比較すると PS 膜において有意に低値をとることから PS 膜によるカルボニルストレス軽減効果が示唆され、対象患者の各属性のうち血漿ペントシジン濃度の独立有意な規定因子となりうるのは透析膜・残存尿量の 2 項目であった。

縦断研究において対象となった 3 人の患者においては PS 膜透析期間中に有意な血漿ペントシジン濃度の低下を認め、PAN 膜透析に戻すことによりコントロールレベルまでの再上昇を認めた。

#### D. 考察

##### 1. 腎不全におけるカルボニルストレスの病態生理学

##### 1. 血液透析患者におけるカルボニルストレス

血液透析患者の透析前の血漿中のペントシジンレベルと 37°C で 4 週間のインキュベートにより増加するペントシジン量との間には有意に相関が認められたことから、血液透析患者の血漿中のペントシジンレベルは、主として、

血漿中に蓄積しているペントシジンの前駆体の量に依存することが示唆された。除蛋白血漿にヒト血清アルブミンを添加してインキュベートした場合、血液透析患者のほうが健常人の場合よりペントシジンの生成量が有意に高値を示したことから、血液透析患者の場合、ペントシジンの前駆体となる低分子量の RCOs が蓄積していると考えられた。このことは、血液透析患者の限外濾過液した血漿中に存在する総 RCOs の濃度から明らかとなった。腎不全患者血中のカルボニル化合物の蓄積は、腎からのカルボニル化合物の排泄障害と、腎不全に伴う酸化ストレスによる糖・脂質由来カルボニル化合物の生成の亢進によるものと考えられた。

##### 2. CAPD 患者におけるカルボニルストレス

CAPD 患者において、腹膜の蛋白の AGEs 化の原因は主として CAPD 透析液中の高濃度のグルコースあるいはその分解物によるものと考えられてきた。そこで、今日までグルコースの代わりに他の浸透圧物質を用いる努力がなされてきた。我々の結果は、腹腔内の AGE 生成に対して、CAPD 液中に存在する

グルコースの分解により生成する RCOs よりも血液由来の RCOs のほうが重要であることを示唆している。加熱滅菌した CAPD 液中に存在する主要な RCOs は GO、MGO および 3-DG であった。腹腔内の CAPD 貯留液中の RCOs を分析した結果、AGE の前駆体が腹腔内に蓄積することが明らかとなった。腹腔内の CAPD 中の GO、MGO、3-DG 濃度は貯留時間とともに減少したが、総 RCOs 濃度は著しく増加した。

これは、血液由来の RCOs が、腹腔内に拡散により移行したものと考えられた。RCOs 濃度の上昇は、AGEs の生成に重要な役割を演じる。実際に、除蛋白した CAPD 排液に BSA を添加して 1 週間インキュベートしたところ、かなりの量のペントシジンの生成が認められた。ペントシジンの生成は腹腔内における貯留時間とともに増加し、対応する腎不全患者の血清をインキュベートした場合の値に近づいた。インキュベーションによるペントシジンの生成はアミノグアニジンまたは OPB-9195 の添加で抑えられたことから RCOs がペントシジンの前駆体であることを示している。

我々は、最近、腎不全患者血漿中に蓄積している RCOs 化合物は糖だけではなく不飽和脂肪酸のような脂質からも生成することを示した。それらの分子量は小さいので、もし、種々の RCOs が拡散により腹腔内に移行するならば、腹腔内には、ペントシジンのような糖由来の AGEs だけでなく MDA 修飾リジンのような脂質から生成する RCOs 由来の ALEs が腹腔内の蛋白修飾物として存在すると考えられる。血中から拡散により移行する主要な RCOs については現在検討中であるが、蓄積の原因については今後、さらに検討しなければならない。いずれにしても、CAPD 患者において、主として血中から由来する RCOs により腹腔内はカルボニルストレス状態であることを示唆している。

## II. 腹膜硬化症の発症機序の解明

今回の検討において、腹膜硬化症病変部位には AGEs のみならず、ALEs もおなじ局在で蓄積していることが明らかにされた。このことはカルボニルストレスが腹膜硬化症の進展に関与していることを示唆するとともに、CAPD

患者におけるこれらカルボニル化合物が、PD 液由来のみではなく、血液よりも由来していると考えらる。また、少なくとも PD 液中の反応性カルボニル化合物は CAPD 患者腹膜の中皮細胞、内皮細胞に直接作用し、それら細胞における VEGF 産生を亢進させ、eNOS 産生の活性化を介して血管拡張、血管新生などの血管病変を引き起こす可能性が示唆された。さらに、腹膜硬化症の腹膜において、コラーゲン産生の際、シャペロンとして働いている HSP47 の発現が、腹膜の線維化の程度と正の相関を示し、増強していることが明らかとなった。一般に HSP は種々のストレスの際に発現されるが、CAPD 患者における HSP47 の発現誘導をおこす原因については、今回の研究では断定されていない。しかしながら、長期の CAPD 療法を行った腹膜組織に AGEs/ALEs が蓄積している事実から、カルボニル化合物、あるいはその最終産物が HSP47 の発現に関与している可能性が強く示唆された。これまでの腹膜透析液の高血糖、高浸透圧、酸性である性質が、生体適合性の低下に関連していることが明らかとなりつつあり、改良

された幾つかの透析液が開発されている。これら新しい透析液がカルボニル化合物、およびそれら最終産物の産生能、腹膜における VEGF、HSP47 の発現程度と関係するか否か、今後の検討を要すると思われる。また、頻回の腹膜炎やマクロファージの浸潤と HSP47 の発現が相関したことより、腹膜の持続的な炎症が HSP47 の発現をおこすストレスとなりうる可能性も示唆された。

### III. カルボニルストレス仮説に基づく治療法の開発

腎不全合併症発症・進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義が示唆されていることから、カルボニルストレスを消去することは合併症の進展抑制につながる新しい治療法として期待される。

その中でカルボニルストレス阻害薬である OPB-9195 は一連の研究により、糖・脂質に由来するカルボニル化合物が蛋白を修飾して生成される最終産物である AGEs / ALEs の形成を著明に抑制し、疾患の病態を改善する可能性が *in vitro* 及び *in vivo* の検討により示唆された。しかし、この化合物の有効血中



濃度や副作用などについては検討が進んでおらず今後の課題として残されている。今後は薬物動態に関する解析を進め、カルボニルストレス消去についてより有効な薬剤を開発することを目標とする。

透析膜がカルボニルストレスに及ぼす影響に関する検討においては、PS膜で血液透析を施行している患者群で有意に血漿ペントシジン濃度が低いという結果が得られた。我々が既に報告していることであるが、腎不全患者血漿のインキュベーション実験により、血漿ペントシジン濃度はその前駆体カルボニル化合物量を反映することが明らかとなっている。このことを根拠として、本研究ではカルボニルストレスの指標として血漿ペントシジン濃度を用いた。

本研究ではPS膜で血液透析を施行している患者群で有意に血漿ペントシジン濃度が低く、この傾向は国やメーカーの違いによらなかった。また、縦断研究で同一の患者でPAN膜からPS膜へ変更した場合もカルボニルストレスのレベルの低下を認めたが、PAN膜もほぼ同じ孔径をもつ high-flux

membrane であること・実際に1回の透析でペントシジンはほとんど除去されないこと・前駆体カルボニル化合物の除去については分子量などより透析膜による差はほとんどないと想定されることなどを考慮するとPS膜の材質・構造そのものがカルボニルストレス抑制効果に関与している可能性が示唆される。このメカニズムの詳細については今後の研究課題であるが、これを解明することによりカルボニルストレスをより軽減させ長期透析合併症の発症・進展を抑える新たな透析膜の開発につながるものと期待される。また、今後はカルボニルストレスは透析膜の生体適合性の評価の上で、より長期的でしかも非酵素的反応系に関する新しい指標となりうると考えられる。

## E. 結論

### I. 腎不全におけるカルボニルストレスの病態生理学

腎不全患者である血液透析患者およびCAPD患者について、AGEsの前駆体となるRCOsについて検討を行った。その結果、腎不全患者血漿中には、RCOs

が著しく血中に蓄積していることが明らかとなった。我々は、CAPD 患者の腹膜の種々の AGEs や ALEs の生成に対して血液由来の RCOs が主要な役割を演じることを示した。RCOs は腹膜に対して AGEs や ALEs の生成に関与するだけでなく、細胞に対する直接的な作用により腹膜を質的に変化させると考えられる。腎不全における著明な AGEs の蓄積は、糖、脂質、およびアミノ酸を含む生体内の non-enzymatic biochemistry の破綻に伴うカルボニルストレスの結果であると考えられる。腎不全において、血液中の RCOs を減少させること、あるいは、RCOs 由来の AGE および ALE の生成を減少させることにつながり、腎不全における合併症を減少させるうえで重要であることを示唆している。カルボニルストレスの病態生理学的意義の解明は腎不全合併症をコントロールするうえできわめて重要であり、カルボニルストレスによる蛋白修飾を防止することは、腎不全における新しい治療法につながるものと考えられる。

## II. 腹膜硬化症の発症機序の解明

CAPD 患者における腹膜硬化症に関与する重要な因子として、PD 液の加熱滅菌により生じる糖分解産物としてのカルボニル化合物に加え、腎不全患者血中に多量蓄積した糖・脂質由来のカルボニル化合物が深く関与する可能性が示された。また、腹膜硬化症に特徴的な病理像である腹膜中皮層の線維化、血管病変（血管透過性亢進、血管新生）に HSP47、コラーゲン III、VEGF、eNOS、などが関与し、中でも VEGF 産生能は、PD 液由来カルボニル化合物の作用にによって亢進する可能性が示された。これらの事実から、カルボニル化合物消去剤がカルボニル化合物の担う病態生理活性を抑制し、腹膜硬化症の発症・進展を制御できる可能性が考えられる。今後、腹膜硬化症の発症・進展のメカニズムにおけるカルボニルストレスの病態生理学的意義をより詳細に検討し、それに基づく新しい治療法の開発として、カルボニル化合物消去剤の合成、その抑制剤としての有用性などを検討していく必要があると考えられる。

## III. カルボニルストレス仮説に基づく

## 治療法の開発

カルボニルストレス阻害薬はカルボニルストレス軽減に有用である可能性が示唆された。血液透析患者生体内のカルボニルストレスは残存腎機能と透析膜の種類によって独立に規定されると考えられる。血液透析膜の中でポリスルホン膜はカルボニルストレス軽減効果を有する可能性があり、このメカニズムを解明することでカルボニルストレス抑制効果を介して長期透析合併症の発症・進展を予防するような新しい透析膜の開発に寄与する可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney International* 1998; 53: 416-422.
2. Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with markers of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244:45-49.
3. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Stress carbonilé et complications a long terme de l'urémie, in ACUTUALITE. NEPHROLOGIQUES JEAN HAMBURGER. HÔPITAL NECKER 1998 (eds. Grunsfeld JP, Bach JF, Kreis H). 247-253. *Médecine-Sciences Flammarion*.
4. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Suzuki D, Miyata T, Noguchi N, Niki E, Osawa T. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4882-4887
5. Yasuda Y, Miyata T, Nangaku M, Iida Y, Maeda K, Okubo K, Kurokawa K. Functional quantitative analysis of the genome in cultured human mesangial cells. *Kidney International* 1998; 53: 154-158
6. Ehlerding G, Schaeffer J, Drommer W, Miyata T, Koch K M and Floege J. Alterations of synovial tissue and their potential role in the deposition of  $\beta_2$ -microglobulin-associated amyloid. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1465-1475
7. Miyata T, Jadoul M, Kurokawa K, Charles van Ypersele de Strihou.  $\beta_2$ -Microglobulin in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1723-1735
8. Sugiyama S, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K. Implication of the glycoxidation and lipoxidation reactions in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *Int J Mol Med* 1998; 2; 561-565
9. Sugiyama S, Miyata T, Maeda K, Ueda Y, Tsuyuki M, Tanaka H, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Plasma level of pentosidine in diabetic patients: an advanced glycation end product. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1681-1688
10. Ueda Y, Miyata T, Hashimoto T, Yamada H, Izuhara Y, Sakai H,

- Kurokawa K. Implication of altered redox regulation by antioxidant enzymes in the increased plasma pentosidine, an advanced glycation end product, in uremia. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 785-790
11. Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, ThorpeSR, Baynes JW. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: Is there oxidative stress in uremia? *Kidney International* 1998; 54: 1290-1295
  12. Miyata T, Nangaku M, Suzuki D, Uragami K, Inagi R, Sakai H, Okubo K, Kurokawa K. A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin up-regulated in IgA nephropathy. *J Clin Invest* 1998; 102: 828-836.
  13. Niwa H, Takeda A, Wakai M, Miyata T, Yasuda Y, Mitsuma T, Kurokawa K, Sobue G. Accelerated formation of carboxymethyllysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 93-97.
  14. Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Goto Y, Wakai M, Watanabe M, Yasuda Y, Horie K, Inagaki T, Doyu M, Maeda K, Sobue G. Advanced glycation end products co-localization with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 1998; 98: 555-558.
  15. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, Uchida K, Kurokawa K. Generation of protein carbonyls by glycation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS letter* 1998; 437: 24-28
  16. Kimura T, Takamatsu J, Miyata T, Miyakawa T, Horiuchi S. Localization of identified advanced glycation end product structure, N-carboxymethyllysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathology International* 1998; 48: 575-579.
  17. Hangaishi M, Taguchi J, Miyata T, Ikari Y, Togo M, Hashimoto Y, Watanabe T, Kimura S, Kurokawa K, Ohno M. Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 285-292.
  18. Anwarul AA, Kato M, Suzuki H, Miyata T, Nakasima I. Level of HgCl<sub>2</sub>-mediated phosphorylation of intracellular proteins determines death of thymic T-lymphocytes with or without DNA fragmentation. *J Cellular Biochemistry* 1998; 71: 243-253.
  19. Miyata T, Ueda Y, Yamada Y, Saito A, Jadoul M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Carbonyl stress in uremia: Accumulation of carbonyls accelerate the formation of pentosidine, an advanced glycation end product. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2349-2356.
  20. Ahkand AA, Kato M, Suzuki H, Hamaguchi M, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I. Carbonyl compounds cross-link cellular proteins and activate protein-tyrosine kinase p60c-src. *J Cellular Biochemistry* 1999; 72: 1-7.
  21. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in non-enzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney International* 1999; 55: 389-399.
  22. Miyata T, Inagi R, Kurokawa K. Diagnosis pathogenesis, and treatment of dialysis-related amyloidosis. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25: 114-117.
  23. Wada T, Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl stress in long-term uremic complications. *Nephrol Dial*