

平成 11 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

2000.3.

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 20 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 12 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

近年の透析患者の高齢化や長期化に伴ない増加する透析合併症の問題に対して早急な予防・治療法の確立が望まれている。本研究課題はそれら合併症（動脈硬化、腹膜硬化症、副甲状腺機能障害など）の発症進展の分子メカニズムを明らかにし、それに基づき新規治療法の可能性を検討するものである。本年度は昨年につづいて、1) 透析患者生体内の糖・脂質由来反応性カルボニル化合物による蛋白修飾異常、すなわち“カルボニルストレス”の生化学的解析、病態生理学的解析、カルボニルストレス除去システムの検討、2) カルボニルストレスに基づく腹膜硬化症の分子メカニズムの解明、3) 副甲状腺機能亢進症の機序解明などの課題について検討が行われ、新たな研究成果が報告された。

### 研究組織

富永 芳博 名古屋第二日赤病院

南学 正臣 東京大学医学部

### 研究協力者

第一内科 助手

和田 健彦 東京大学医学部第一内科

稲城 玲子 東海大学総合医学研究所

大園 恵幸 長崎大学医学部第二内科

講師

助教授

上田 裕彦 東海大学総合医学研究所

宮崎 正信 長崎大学医学部第二内科

角田 隆俊 東海大学腎代謝内科

助手

講師

深川 雅史 東京逓信病院循環器内科

### A. 研究目的

前田 憲志 名古屋大学医学部大幸

我々は、透析患者においては糖・脂質

医療センター 教授

由来の反応性カルボニル化合物が生体内

堀江 勝智 名古屋大学医学部大幸

多量に蓄積し、異常な蛋白修飾をひきお

医療センター

こし、それが透析合併症の大きな誘因と

なる可能性を報告してきた。そうした状

況を“カルボニルストレス”と提唱し、本研究課題において、カルボニルストレスの生化学的解析、病態生理学的解析、及びそれに基づく新規治療法開発の可能性などを検討してきた。また腹膜硬化症、副甲状腺機能亢進症などの合併症に関してはより詳細な発症機序の解明とそれに基づく治療法の確立を目指す基礎研究を行ってきた。

本年度は、以下の研究項目について検討を行った。

#### 1) 腎不全患者血清におけるカルボニルストレスの生化学的解析

これまで Advanced glycation end products (AGEs) 研究は、AGEs がグルコースから生成する糖化の指標という概念から、糖尿病及びその合併症への関与が示唆されてきた。近年、一連の研究結果により、動脈硬化、腎不全など必ずしも高血糖を伴わない疾患においても顕著に AGEs が蓄積していることが明らかとなった。AGEs は糖からアマドリ化合物を経たメイラード反応で生成される系以外に、糖や脂質が酸化されて生成されるグリオキサール、アラビノース、マロンジアルデヒドなどのカルボニル化合物を

経た反応系からも生成される。すなわち、腎不全における AGEs の蓄積は、反応性の高いカルボニル化合物の産生亢進（カルボニルストレス）に由来することが示唆される。既に私たちは、腎不全患者血中におけるペントシジンの前駆体は低分子のカルボニル化合物であることを報告している。本研究は、近年、抗 AGE 抗体の主要なエピトープであることが同定され、ペントシジンと並ぶ代表的な AGEs 構造体と考えられるカルボキシメチルリジンの蓄積メカニズムを明らかにすることを目的とする。

#### 2) カルボニル消去システムの解析

持続携帯腹膜透析（CAPD）患者にとって腹膜硬化症は重大な長期合併症の1つであり、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。近年、この腹膜機能低下の原因として透析液中の高濃度のグルコース、特に加熱滅菌に伴い生成するグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンなどの反応性カルボニル化合物、およびこれらによる腹膜蛋白修飾（カルボニルストレ

ス)の重要性が指摘されている。我々は、腹膜透析におけるカルボニルストレスの生化学的解析を行い、腹腔内のカルボニルストレスには腹膜透析 (PD) 液に由来するものと血液由来のカルボニル化合物が関与していることを既に報告した。今回、CAPD 療法に伴うカルボニルストレスを軽減することを目的として、カルボニル化合物の消去剤の有用性について検討を行った。

### 3) CAPD 腹膜硬化症の進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

これまでの研究成果によって長期 CAPD 患者において腹膜機能低下を招く原因の一つに、血管透過性の亢進、血管新生などが考えられている。現在、この現象に深く関与する分子として血管緊張、血管透過性の調節、血管新生等に重要な役割を果たす Vascular endothelial growth factor (VEGF) やその VEGF の発現を亢進させる NO などが注目されている。興味深いことに、昨年我々は PD 液に含まれ、加熱滅菌にて生成されるグルコース由来反応性カルボニル化合物、メチルグリオキサールが腹膜の中皮細胞や

内皮細胞における VEGF mRNA 発現量を有意に亢進させることや、PD 液および生体由来のカルボニルストレスに長期暴露された CAPD 患者腹膜では正常人腹膜に比べて内皮細胞由来 NO 合成酵素 (eNOS) の発現量が有意に増加していることなどを報告した。これらの事実はカルボニルストレスによる腹膜機能異常のメカニズムの一部を明らかにしており、そうした観点から CAPD 腹膜硬化症の進展をさらに詳細に検討する必要性を強く示唆している。

そこで今回我々は、CAPD 腹膜硬化症の進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義、特にカルボニルストレスによる VEGF/ eNOS 発現変動を検討目的で、糖/脂質由来カルボニル化合物異常修飾産物に対する抗体や抗 VEGF/eNOS 抗体を用いた免疫組織学的手法にて検討した。また、糖由来の反応性化合物であるメチルグリオキサール、グリオキサールが腹膜中皮細胞において VEGF 産生亢進を誘導する分子メカニズムや、それを抑制できるカルボニルストレス消去剤の CAPD 腹膜硬化症への有用性についての検討も行った。

#### 4) CAPD 腹膜硬化症の進展における熱ショック蛋白 (HSP) 47 の関与に関する解析

これまで我々はコラーゲン特異的な分子シャペロンである HSP 47 が、CAPD 患者腹膜硬化組織において発現されていることを報告してきた。今回、我々は i) HSP47 の経時的変化を検討する目的で、ラットの腹膜硬化モデルにおける HSP47 の発現を、また ii) 腹膜透析液が HSP47 の発現に及ぼす影響を検討する目的で、従来の腹膜透析液と重曹加腹膜透析液との比較を *in vivo*、*in vitro* で行った。

#### 5) 腎不全における副甲状腺機能亢進症の病態解明と新規治療法の開発について

腎不全における副甲状腺の過形成および腫瘍化機序を解明し、これに対する新しい治療法を開発する。また、腎不全における骨の上皮小体ホルモン (PTH) に対する抵抗性の機序を解明する。

### B. 研究方法

#### 1) 腎不全患者血清におけるカルボニルストレスの生化学的解析

健康者、非糖尿病腎不全患者を対象と

し、下記の生化学的解析を検討した。健康者と腎不全患者間および透析前後間の血漿におけるカルボキシメチルリジン産生能あるいはペントシジン産生能を比較検討するため、それぞれの血漿を 37℃ で一定期間インキュベートし、生成されたカルボキシメチルリジンは、ガスクロマトグラフィー質量分析器 (GC/MS) にて、ペントシジンは、高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。また一部の実験においては、カルボニルストレス阻害剤であるアミノグアニジン及び OPB-9195 を添加してインキュベートを施行し、カルボキシメチルリジン、ペントシジン生成抑制効果について比較検討した。また、両患者群の血漿中に含まれる低分子反応性カルボニル化合物がカルボキシメチルリジンあるいはペントシジンの前駆物質となりえる可能性を比較検討する目的で、限外濾過法にて分子量 5000 Da 以上の蛋白を除去した血漿をアルブミンと共に 37 °C、一定期間インキュベートし、カルボキシメチルリジン、ペントシジン産生量を測定した。

#### 2) カルボニル消去システムの解析

ジカルボニル化合物に対するアミノ化



合物、チオール化合物、カルボニル化合物トラップビーズなどのカルボニルトラップ効果やグルタチオン、グリオキサラーゼ I などのカルボニル化合物消去系物質のカルボニルストレス消去能について以下の比較検討を行った。グリオキサール、メチルグリオキサールおよび 3-デオキシグルコソンの混合溶液あるいは PD 液（バクスター製、ダイアニール PD-4、1.5）に各種カルボニル消去剤を添加し、室温あるいは 37 °C で一定時間インキュベートした後、ジカルボニル化合物の残存量を測定し評価した。また各種カルボニルトラップ剤の AGEs 生成の阻害効果については、PD 液にウシ血清アルブミンおよび各種カルボニル消去剤を添加し 37 °C で 1 週間インキュベート後のペントシジンあるいはカルボキシメチルリジンの生成量を測定し評価した。

### 3) CAPD 腹膜硬化症の進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

① CAPD 療法による腹膜の経時的病理変化を糖尿病、腹膜炎の既往の無い 36 名の CAPD 患者腹膜（そのうち 3 名は導入時の症例）を用いて免疫組織学的手法

にて解析した。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、糖/脂質由来カルボニル化合物異常修飾産物に対する抗体（抗カルボキシメチルリジン抗体、抗ペントシジン抗体、抗マロンジアルデヒドリジン抗体、抗 4 ヒドロキシ 2 ノネナール抗体）、抗 VEGF 抗体、抗 eNOS 抗体を用いた免疫組織学的に解析した。

②培養ラット腹膜細胞をカルボニル化合物、メチルグリオキサールあるいはグリオキサールと 1 時間反応させたのちに細胞破碎液を調製、抗リン酸化チロシン抗体、抗 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体（抗 Shc 抗体、抗 ERK1 抗体、抗 ERK2 抗体、抗 p38 抗体、抗 JNK 抗体）を用いた Western blot 法にて細胞内シグナル伝達物質のリン酸化の変動を比較検討した。さらに、反応性カルボニル化合物消去能を有するグルタチオン(0、80、400、2000  $\mu$ M)存在下で、メチルグリオキサール（400  $\mu$ M）が有するラット腹膜中皮細胞に対する VEGF mRNA 誘導能が抑制されるか否かを検討するため、グルタチオン存在下あるいは非存在下で腹膜中皮細胞をメチルグリオキサールに 3 時間暴露し、細胞か

ら全 RNA を抽出、VEGF 特異的半定量 RT-PCR による VEGF mRNA 発現量の比較検討を行った。

#### 4) CAPD 腹膜硬化症の進展における熱ショック蛋白 (HSP) 47 の関与に関する解析

①ラットの腹膜硬化モデル：クロールヘキシジン腹腔内に投与することにより作成し、経時的な HSP47 の発現を免疫組織染色により観察した。

②腹膜透析液の影響：ラット腹腔に従来の腹膜透析液と重曹加腹膜透析液を 28 日間投与し、経時的に HSP47 の発現を検討した。

#### 5) 腎不全における副甲状腺機能亢進症の病態解明と新規治療法の開発について

本年度は①ビタミン D 受容体遺伝子ノックアウト (VDRKO) マウスにおける副甲状腺過形成を病理組織学的に解析し、②副甲状腺過形成におけるビタミン D の役割について検討、副甲状腺過形成を伴う重症の副甲状腺機能亢進症では、ビタミン D 受容体数の減少が著明なためビタミン D パルス療法でも管理が難しく、試

験的にビタミン D 局注療法が行われ効果を挙げている。この作用機序を明らかにするために、高リン食で飼育した部分腎摘ラットの腫大した副甲状腺に対して、実体顕微鏡下に 5 $\mu$ l の薬剤を注入し、PTH 分泌と組織所見を検討、③さまざまな治療法によって PTH の分泌抑制が可能になってきたが、腎不全では PTH に対する骨の抵抗性が存在するため、骨回転を正常範囲に維持するために PTH の目標値をどこに設定するかが大きな問題となっている。この抵抗性の本体を解明するために、PTH によって骨芽細胞で産生される破骨細胞活性化因子 (ODF) の decoy receptor として働いている破骨細胞活性化抑制因子 (OCIF) 濃度を腎不全血清を用いての検討した。

#### C. 研究結果及び考察

##### 1) 腎不全患者血清におけるカルボニルストレスの生化学的解析

健常者および腎不全患者血漿中のペントシジン、カルボキシメチルリジン量とともに健常者に比べ腎不全患者で有意に高値を示した。インキュベーション後の両群検体、あるいは高分子蛋白を除去し

た後にインキュベーションを施行した血漿におけるペントシジン、カルボキシメチルリジン産生量を比較すると、いずれの検体においてもそれらの産生量はインキュベーション時間に比例して増加し、その増加程度は腎不全血漿で著明であることが明らかとなった。また透析前後の血漿では透析後でカルボキシメチルリジン、ペントシジン産生量が低下することも判明した。さらにアミノグアニジン、OPB-9195 などのカルボニルストレス消去剤添加は、両群血漿におけるペントシジン、カルボキシメチルリジン形成を効率に抑制した。

以上の結果より、腎不全患者血中には健常者に比しカルボキシメチルリジン、あるいはペントシジンが多量に蓄積しているのみならず、それらの生成前駆物質が多量に蓄積していることが示された。その前駆体の特性としては、限外濾過で除去されない 5000 Da 以下の低分子で、カルボニルストレス消去剤にてトラップされるカルボニル化合物であることが推測される。

カルボキシメチルリジンは、ペントシジンとは異なり糖だけでなく脂質からも形成される事から、カルボキシメチルリ

ジンの前駆体として低分子カルボニル化合物に加え、不飽和脂肪酸などの高分子カルボニル化合物の関与も考えられる。今後この点もふまえて腎不全患者血清のカルボニル異常修飾産物形成経路についてより詳細な検討を加え、カルボニルストレスを生化学的に検討したい。

## 2) カルボニル消去システムの解析

ジカルボニル化合物のカルボニル消去効果が認められた化合物は、アミノグアニジン、OPB-9195、ビグアナイド剤、システイン、N-アセチルシステイン、グルタチオン、カルボニル化合物トラップビーズなどであった。また AGEs 生成に対する抑制効果が認められた化合物は、アミノグアニジン、OPB-9195、システイン、N-アセチルシステイン、グルタチオン、カルボニル化合物トラップビーズなどであった。ちなみにメトホルミン、ブホルミン、フェンホルミンなどのビグアナイド剤の AGEs 生成抑制能は他に比べ低かった。上記化合物がジカルボニル化合物を消去する機序としては、アミノ化合物の場合、分子内のアミノ基とカルボニル化合物との反応により Schiff 塩基の生成によるものと考えられる。またシ

ステインの場合は、アルデヒドと反応してチアゾリジンカルボン酸が生成することが報告されているが、 $\alpha$ -オキソアルデヒドの場合も、同様の化合物の生成が考えられる。

またグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液または PD 液中において、グリオキサラーゼ I とグルタチオンを用いたカルボニルストレスの抑制作用について検討したところ、グリオキサラーゼ I の存在下では、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のなどの  $\alpha$ -オキソアルデヒド除去作用が著しく促進されることが明らかとなった。グリオキサラーゼ系は、グルタチオンの存在下、 $\alpha$ -オキソアルデヒドを対応するアルドン酸に転換することが知られていることから、*in vivo* における有用性が推測される。

以上、アミノ化合物、チオール化合物、カルボニル化合物トラップビーズが、PD 液由来のカルボニルストレスによる生体内蛋白修飾を効率に軽減させることが示唆された。今後 CAPD 患者への安全かつ有効なカルボニル消去剤の使用法については検討する必要があると考えられる。

### 3) CAPD 腹膜硬化症の進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

①形態学的には5年以上を経過した症例では多くが組織学的に腹膜硬化症を呈していた。CAPD 導入時の腹膜では血管、中皮細胞に抗 VEGF、抗 eNOS 産生が弱く認められたが、カルボニル化合物修飾産物は認められなかった。しかし腹膜硬化の進展と共に血管、中皮細胞、中皮下結合組織を中心に、カルボニル化合物修飾産物が検出されるようになり、同じ局在に VEGF や eNOS の産生亢進が認められた。

②ラット腹膜中皮細胞は 500  $\mu$ M メチルグリオキサールあるいはグリオキサール存在下でチロシン蛋白のリン酸化や cross-link によるリン酸化蛋白の高分子化が認められた。このときメチルグリオキサールのみが Shc、ERK1/ERK2 リン酸化による Ras 経路を介した MAPK の活性化や p38 や JNK のリン酸化を介した MAPK の活性化を惹起させた。一方グリオキサールは高濃度 (10 mM) 条件下において同様の現象を引き起こし、逆にメチルグリオキサールは高濃度では脱リン酸化を誘導することが明らかになった。

③400  $\mu$ M メチルグリオキサールが有

する腹膜中皮細胞における VEGF mRNA 発現量亢進能が添加したグルタチオン濃度に比例して抑制された。

#### 4) CAPD 腹膜硬化症の進展における熱ショック蛋白 (HSP) 47 の関与に関する解析

① ラット腹膜は経時的に腹膜硬化を示し、コラーゲンの発現が増加するに従って HSP47 の発現も増強していた。また、同時にヒトの腹膜硬化症で見られたように、マクロファージの浸潤や  $\alpha$  smooth muscle actin 陽性の myofibroblast の増加を伴っており、このモデルは化学的刺激による腹膜硬化にもかかわらず、ヒトの腹膜硬化像と類似しており、腹膜硬化のモデルとして有用であると考えられた。

② 従来の透析液投与群では、軽度ながら経時的に腹膜の肥厚が認められ、同時に中皮細胞及び中皮下結合組織に HSP47 の発現の増加が観察された。重曹加透析の投与群においても HSP47 の発現は認められたが、その程度は軽度だった。また、従来の透析液と重曹加透析液下でヒト腹膜中皮細胞を培養し、ノザンプロット法で HSP47 mRNA の発現を検討した結果、重曹加透析液群の方が HSP47 mRNA の

発現は減少していた。以上より、HSP47 がコラーゲンの産生を介して腹膜硬化の進展に関与していること、また、生体適合性を考えた腹膜透析液の検討・開発が長期の CAPD 療法を行うためには今後益々重要であり、HSP47 が腹膜硬化という観点から見た生体適合性のマーカーと成りうる可能性が示唆された。

#### 5) 腎不全における副甲状腺機能亢進症の病態解明と新規治療法の開発について

① VDRKO マウスにおいては、正常マウスの副甲状腺に比して明らかに副甲状腺実質細胞数は増加し過形成を示したが、ヒトの二次性副甲状腺機能亢進症で認められる monoclonal に増殖する結節性の増殖（腫瘍化）は認められなかった。ヘテロのマウスでは正常マウスの副甲状腺とは差は認められず、腎機能正常状態では VDR のヘテロな欠損は副甲状腺に影響は与えないと考えられた。

②  $10 \mu\text{M}$  の 1,25(OH) $_2$ D $_3$  局所注入 7 日後に、血清 PTH 値は  $1292.3 \pm 417.6 \text{ pg/ml}$  から  $930.2 \pm 344.9 \text{ pg/ml}$  へと有意に減少した。組織学的検討では、ビタミン D 局所注入群は vehicle 注入群に比して細胞数の減少が目立ち、

7A6 抗原染色によって初期のアポトーシスシグナルを認めた。したがって、ビタミンD局所注入は、PTH 分泌抑制だけでなく、副甲状腺過形成の退縮を誘導する証拠が示された。また、カルシウム受容体作動薬、KRN568 (10 μM) の局所注入も同様の PTH 抑制効果があり、局所注入という新しいドラッグデリバリーシステムで投与する可能性が示唆された。

③腎機能の低下にしたがって OCIF 濃度の上昇がみられ、慢性透析患者の血清では正常人の約5倍 (in vitro で破骨細胞形成を50%抑制する OCIF 濃度に相当) に達した。この蓄積した OCIF は ODF 結合能を維持していた。したがって、腎機能低下に伴う OCIF の蓄積が、骨の PTH に対する抵抗性に関与している可能性が示唆された。

#### D. 結論

##### 1) 腎不全患者血清におけるカルボニルストレスの生化学的解析

腎不全患者血中におけるカルボニルストレスの生化学的解析の結果、腎不全患者血中では健常者に比べペントシジンや

カルボキシメチルリジンといった AGEs が著しく蓄積しており、カルボキシメチルリジンの主な前駆物質はペントシジンと同様、低分子のカルボニル化合物である可能性が示唆された。しかし、糖と脂質の両方を前駆体とするカルボキシメチルリジンは、生成経路や蓄積メカニズムに脂質が影響及ぼす事も考えられる。今後この点に関するさらなる解析が必要と考えられる。また、カルボニル化合物蓄積の原因が酸化反応の亢進 (産生亢進) や代謝反応系の異常 (消去の低下) であるかを明らかにするために、キレート剤添加実験による金属イオンを介した酸化反応の関与、あるいはグリオキサラーゼなどの添加実験によるカルボニル化合物消去系酵素の関与などを検討することが必要であると考えられる。さらに、腎不全血中のペントシジン、カルボキシメチルリジン以外のカルボニル化合物過剰修飾産物を測定し、各種パラメータとの相関関係を詳細に検討し、今後のカルボニルストレスの病態生理学的意義の解明に新たな知見を加えていきたい。

##### 2) カルボニル消去システムの解析

in vitro の検討から PD 液由来のカルボ

ニルストレスを抑制する効果を有する化合物を見出すことができた。今後、それら化合物の安全性や実用性について、さらに検討する必要があると考えられる。

### 3) CAPD 腹膜硬化症の進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

①今回の検討において、CAPD 年数や腹膜組織硬化に比例して、その症病変部位に糖酸化最終物質であるカルボキシメチルリジンやペントシジン、脂質由来の酸化最終物であるマロンジアルデヒドリジン、4 ヒドロキシ 2 ノネナール蛋白修飾物などの蓄積が亢進することが明らかとなり、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している。またこの事実は CAPD 患者におけるカルボニルストレスが、PD 液中の反応性カルボニル化合物のみならず、患者血液由来の反応性カルボニル化合物にも起因していることを示唆している。さらに腹膜血管、中皮細胞を中心に上記カルボニル化合物修飾蛋白の蓄積に伴い VEGF、eNOS 産生亢進が認められることから、カルボニルストレスによる腹膜硬化の機序にこれら分子が関与している可能性が

示唆された。

②熱処理 PD 液に含まれる糖由来の反応性カルボニル化合物は腹膜中皮細胞に直接作用して、チロシン蛋白リン酸化を介して細胞内シグナル伝達系の惹起を引き起こすことが示された。また、PD 液由来の反応性カルボニル化合物が有する腹膜中皮細胞に対する生理活性はグルタチオンといった反応性カルボニル消去能を有する化合物によって効率に抑制されることが明らかとなった。

以上の知見より、腹膜硬化症の発症・進展を抑制するうえで生体に副作用の少ない効率に良いカルボニルストレス消去剤の開発が重要かつ有効であると思われる。

### 4) CAPD 腹膜硬化症の進展における熱ショック蛋白 (HSP) 47 の関与に関する解析

HSP47 が腹膜硬化の発症進展に強く関与していると思われる。

### 5) 腎不全における副甲状腺機能亢進症の病態解明と新規治療法の開発について

①ビタミン D の作用が障害された VDRKO マウスでは副甲状腺は過形成を

示すが、腫瘍化はしない。

②ビタミンD局所注入は、副甲状腺過形成の退縮を誘導しうる。カルシウム受容体作動薬の局所注入も有効である。

③腎不全における骨の PTH に対する抵抗性に、蓄積した OCIF が関与している。

## E. 業績

### 1. 論文発表

- 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.
- Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kiyoshi Kurokawa, Baynes JW. Alterations in non-enzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999; 55: 389-399.
- Miyata T, Inagi R, Kurokawa K. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of dialysis-related amyloidosis. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25: 114-117.
- Wada T, Miyata T, Kurokawa K. Implication of Carbonyl stress in long-term uremic complications. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14 [Supple 1]: 79-81.
- Miyata T, Ishikawa S, Asahi K, Inagi R, Suzuki D, Horie K, Tatsumi K, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5ylacetanilide (OPB-9195) inhibits the neointima proliferation of rat carotid artery following balloon injury: Role of glycoxidation and lipoxidation reactions in vascular tissue damage. *FEBS letter* 1999; 445: 202-206.
- Nakashima I, Ahkand AA, Pu M, Kato M, Hangaishi M, Senda T, Suzuki H, Parasha A, Du J, Liu W, Umeda Y, Miyata T. Redox-oriented chemical events in signal transduction in cells. *Redox Regulation of Cell Signaling and Its Clinical Application*. 1999:177-204.
- Miyata T, Nangaku M, Uchida K, Inagi R, Kurokawa K. Oxidative stress-induced "Carbonyl stress" in uremia. *Redox Regulation of Cell Signaling and Its Clinical Application*. 1999: 215-224.
- Miyata T, Izuhara Y, Sakai H, Kurokawa K. Carbonyl stress: Increased carbonyl modification of tissue and cellular proteins in uremia. *Perit Dial Int* 1999;19 [Supple 2]:58-61.
- Wada T, Miyata T, Hideto Sakai, Kurokawa K. b2-microglobulin and renal bone disease. *Perit Dial Int* 1999;10 [Supple 2]:424-427.
- Izuhara Y, Miyata T, Ueda Y, Suzuki D, Asahi K, Inagi R, Sakai H, Kurokawa K. A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:576-580.
- Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 10: 822-832, 1999.
- Jadoul M, Ueda Y, Yasuda Y, Saito A, Robert A, Ishida N, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. Influence of hemodialysis membrane type on pentosidine plasma level, a marker of "carbonyl stress". *Kidney Int* 1999;55:2487-2492.
- Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl stress: increased carbonyl modification of proteins by autoxidation products of carbohydrates and lipids in uremia. *Int J Art Org* 1999;22:195-198.
- Miyata T, Sugiyama S, Suzuki D, Inagi R, Kurokawa K. Increased carbonyl modification by lipids and carbohydrates in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1999;56(Supple71):S54-56.
- Miyata T, Sugiyama S, Nangaku M, Suzuki D, Urugami K, Inagi R, Kurokawa K. Apolipoprotein E2/E5 variants in lipoprotein glomerulopathy recurred in transplanted kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1590-1595.



16. Stein G, Franke S, Sperschneider H, Vienken J, Ueda Y, Miyata T, Kurokawa K. Decrease in serum pentosidine levels of ESRD patients during polysulfone hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1606-1608.
17. Kikuchi S, Shinpo K, Moriwaka F, Makita Z, Miyata T, Tashiro K. Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-Deoxyglycose on cultured cortical neurons: Synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res*. 1999;57:280-289.
18. Handa JT, Verzijl NV, Matsunaga H, Keen AA, Luty GA, Koppele JM, Miyata T, Hjelmeland LM. Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. *Investigative Ophthalmology Vis Sci*. 1999;40:775-779.
19. Liu W, Ahkand AA, Kato M, Yokoyama I, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I. 4-Hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. *J Cell Sci*. 1999;112:2409-2417.
20. Farboud B, Keen AA, Miyata T, Hjelmeland LM, Handa JT. Development of a polyclonal antibody with broad epitope specificity for advanced glycation end products and localization of these epitopes in Bruch's membrane of the aging eye. *Molecular Vision*. 1999;5:11.
21. Akhand AA, Pu M, Senga T, Kato M, Suzuki H, Miyata T, Hamaguchi M, Nakashima I. Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Try-416-linked mechanism. *J Biol Chem* 1999;274:25821-25826.
22. Inagi R, Miyata T. Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia: "carbonyl stress". *Blood Purification* 1999;17:95-98.
23. Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M. Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 1999;56:1004-1013.
24. Nangaku M, Miyata T, Kurokawa K. Possible involvement of "carbonyl stress" in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *Am J Med Sci* 1999;317:410-415.
25. Suzuki D, Miyata T. Carbonyl stress and diabetic nephropathy. *Internal Medicine* 1999;38:309-314.
26. Suzuki D, Miyata T, Nangaku M, Takano H, Saotome N, Toyoda M, Mori Y, Zhang S, Inagi R, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H. Expression of megin mRNA, a novel mesangium-predominant gene, in the renal tissues of various glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2606-2613.
27. Hori Y, Yamada K, Hanafusa N, Okuda T, Okada H, Miyata T, Couser WG, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. Crry, a complement regulatory protein, modulates renal interstitial disease induced by proteinuria. *Kidney Int* 1999;56:2096-2106.
28. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Letter* 1999;463:260-264.
29. Tominaga Y: Surgical management of secondary hyperparathyroidism. *Am J Med Sci* 1999;317: 390-397.
30. Tominaga Y, Tsuzuki T, Uchida K, Haba T, Otsuka S, Ichimori T, Yamada K, Numano M, Tanaka Y, Takagi H: Expression of PRAD1/cyclinD1, retinoblastoma gene products, and Ki67 in parathyroid hyperplasia caused by chronic renal failure versus primary adenoma. *Kid Int* 55:1375-1383,1999.
31. Tominaga Y: Mechanism of parathyroid tumorigenesis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(Supple1): 63-65.
32. Kanai N, Fujita Y, Kakuta T, Saito A: The effective of various extracellular matrices on renal cell attachment to polymer surfaces during the development of bioartificial renal tubules. *Artificial Organs* 1999;23: 114-118.
33. Kakuta T, Fukagawa M, Fujisaki T, Hida M, Suzuki H, Sakai H, Kurokawa K, Saito A: Prognosis of parathyroid function after successful percutaneous ethanol injection therapy (PEIT) guided by color Doppler flow mapping in chronic dialysis patients, *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1091-1099.
34. Fukagawa M: Molecular pathogenesis of secondary hyperparathyroidism in renal

- failure: Basic and clinical aspects, *Nephrol Dial Trans* 1999;14 (Suppl 1): 61-62.
35. Kurokawa K, Fukagawa K: Introduction to renal osteodystrophy, *Am J Med Sci* 1999;317: 355-357.
  36. Fukagawa M: Cell biology of parathyroid hyperplasia in uremia. *Am J Med Sci* 1999; 317: 377-382.
  37. Kurokawa K, Fukagawa M: PTH/PTHrP and vitamin D receptors and applications to therapies, 1999 *Renal Week: Clinical Nephrology Symposia*, J Am Soc Nephrol. 1999; 215-223
  38. Fukagawa M, Kitaoka M, Tominaga Y, Akizawa T, Kurokawa K: Selective percutaneous ethanol injection therapy (PEIT) of parathyroid in chronic dialysis patients -- the Japanese strategy, *Nephrol Dial transplant* 1999; 14: 2574-2577.
  39. Fukagawa M, Noda M, Shimizu T, Kurokawa K: Chronic progressive interstitial fibrosis in renal disease -- are there novel pharmacological approaches? *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2793-2795.
  40. Fukagawa M, Tominaga Y, Kitaoka M, Kakuta T, Kurokawa K: Medical and surgical aspects of parathyroidectomy, *Kidney Int* 1999;56 (Supple 73): S65-S69.
  41. Hirata M, Katsumata K, Masaki T, Koike N, Endo K, Tsunemi K, Ohkawa H, Kurokawa K, Fukagawa M: 22-oxacalcitriol (OCT) ameliorates high turnover bone and marked osteitis fibrosa in rats with slowly progressive nephritis. *Kidney Int* 1999;56: 2040-2047,
  42. Kurokawa K, Fukagawa M: Uremic bone diseases: Advances over the last 30 years, *J Nephrol* 1999;12 (Supple 2):S6367.
  43. Fukagawa M, Kitaoka M, Tominaga Y, Kurokawa K. Parathyroid Imaging, in 'The Spectrum of Renal Osteodystrophy' edited by Drueke TB and Salusky I, Oxford University Press, (in press.)
  44. Fukagawa M. Continuing Nephrological Education: Management of the patients with advanced secondary hyperparathyroidism, *Nephrol Dial Trans.*( in press.)
  45. Fukagawa M, Akizawa T, Kurokawa K. Is aplastic osteodystrophy a disease of malnutrition? *Curr Opin Nephrol Hypertens.*(in press.)
  46. Fukagawa M. Phosphate as another major regulator of parathyroid function (Editorial). *Int Med*, in press. Shiohita K, Miyazaki M, Ozono Y, Abe K, Taura K, Harada T, Koji T, Taguchi T, and Kohno : Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2000;57:619-631.
  47. Abe K, Ozono K, Miyazaki M, Koji T, Shiohita K, Furusu A, Tsukasaki S, Matsuya F, Hosokawa N, Harada T, Taguchi T, Nagata K and Kohno S. Interstitial expression of heat shock protein 47 and  $\alpha$ -smooth muscle actin in renal allograft failure. *Nephrol Dial Transplant* (in press )
  48. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. "Carbonyl Stress" and long-term uremic complications. *Advanced in Nephrology* (in press)
  49. Miyata T, Kurokawa K. "Carbonyl stress" and dialysis-related amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* (in press)
  50. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. 4-Hydroxynonenal induces Fas-independent redox-related activation of caspase-3. *J Cell Sci* (in press)
  51. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Relevance of carbonyl and oxidative stress in long-term complications in hemodialysis. *Kidney Int* (in press)
  52. Miyata T, Kurokawa. Alterations in nonenzymatic biochemistry of carbohydrates and lipids in uremia. *Massry and Glassock's Text book of Nephrology* (in press)
  53. Miyata T, Kurokawa K, Charles van Ypersele de Strihou. Advanced glycation and oxidation end products. *J Am Soc Nephrol* (in press)
  54. Miyata T, Ueda Y, Asahi K, Izuhara Y, Inagi R, Saito A, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Mechanism of inhibitory effect of 2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) on AGE and ALE formation. *J Am Soc Nephrol* (in press)
  55. Miyata T, Horie K, Ueda Y, Fujita Y, Inagi R, Izuhara Y, Hirano h, Saito A, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Advanced glycation and lipoxidation of the peritoneal membrane in peritoneal dialysis:

- Respective contribution of serum and peritoneal dialysis fluid reactive carbonyl compounds. *Kidney Int* (in press)
56. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: Role in the pathogenesis of peritoneal membrane dysfunction in peritoneal dialysis. *FEBS Letter* (in press)
57. Miyata T. Carbonyl stress in chronic renal failure. *Kidney Int* (in press)
58. Miyata T. Carbonyl stress in uremia. *Blood purification* (in press)
59. Miyata T. Carbonyl stress in renal failure. *Nephrology* (in press) 113. Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* (in press)
60. Du J, Suzuki H, Nagase F, Akhand AA, Yokoyama T, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I. Methylglyoxal induces apoptosis in jurkat leukemia T-cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Cell Biochem* (in press)
61. 橋本勉, 宮田敏男, 黒川 清. 長期透析合併症とカルボニルストレス. *BIO Clinica*. 1999;14:18-22.
62. 宮田敏男, 旭浩一, 黒川 清. 血管障害進展におけるAGEs形成の意義及びその抑制法の検討. *代謝異常治療研究基金研究業績集*. 1999;26:21-27.
63. 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川 清. アミロイド骨症発症の分子機構. *日本メディカルセンター*. 1999;73-77.
64. 旭 浩一, 宮田敏男. 透析と酸化ストレス. *中外医学社*. 1999:52-59.
65. 稲城玲子, 宮田敏男. メサングウム高発現 セリンプロテアーゼインヒビター、メグシン. *医学のあゆみ*. 1999;190:40-43.
66. 宮田敏男, 上田太朗, 斎藤明, 黒川 清. カルボニルストレス とハイパフォーマンス膜. *東京医学社*. 1999;47:20-23.
67. 和田健彦, 宮田敏男, 斎藤 明, 黒川 清, Charles van Ypersele de Strihou. 透析膜生体適合性がカルボニルストレスに及ぼす影響についての検討. *東京医学社*. 1999;47:172-174.
68. 旭 浩一, 宮田敏男, 上田裕彦, 黒川 清. 腎不全血中におけるカルボニルストレスの証明. *東京医学社*. 1999;47:196-199.

- 69.宮田敏男.『内科学』第一章 総論 5. 遺伝. 文光堂. 1999 ; 1 : 72-81.
- 70.宮田敏男. 『今日の治療指針』12.腎疾患 透析アミロイドーシス.医学書院. 1999; 499-500.
71. 宮田敏男, 上田裕彦, 黒川 清. 腎不全とカルボニルストレス. Annual Review 2000 腎臓. 中外医学社. 2000;111-121.
72. 高野秀雄, 宮田敏男. カルボニルストレスと糖尿病性腎症. 医学のあゆみ. 2000;192:862-863.
73. 宮田敏男, 黒川 清. 糖尿病系球体病変における非酵素的蛋白修飾. 『Diabetes Frontier.』メディカルレビュー社. 2000;11:13-22.
74. 和田健彦, 宮田敏男. カルボニルストレスとリウマチ性疾患. 科学評論社. 印刷中.
75. 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川 清. メサングウム細胞における遺伝子発現と
- メサングウム細胞高発現遺伝子 (megsin)の分子特性. 東京医学社. 印刷中.
76. 宮田敏男, 黒川 清. 腎不全進展とカルボニルストレス. 中外医学社. 印刷中.
77. 宮田敏男, 石橋由孝, 黒川 清. AGE 化 $\beta$ 2 ミクログロブリン.東京医学社. 印刷中.
- 78.上田裕彦, 宮田敏男, 黒川 清. 透析アミロイドーシスの発症機構と診断・治療. 現代医療社. 印刷中.
79. 豊田雅夫, 宮田敏男. Megsin とメサングウム障害. 医学のあゆみ. 印刷中
80. 宮田敏男. カルボニルストレス. メディカルレビュー社. 印刷中.
- 81.宮田敏男. 糖尿病合併症とカルボニルストレス. フリーラジカルの臨床. 印刷中.
82. 潮下 敬、宮崎正信、芦澤麻美子、