

200/0579

厚生科学研究費補助金

21世紀型医療開拓推進研究事業

長期透析合併症の病態の解明及びこれに  
基づく革新的透析治療法の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 南学 正臣

平成14(2002)年 3月

## 目次

### I. 序文

主任研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内分泌内科 助手

### II. 総括研究報告

長期透析合併症の病態の解明及びこれに基づく革新的透析治療法の開発

1-4

### III. 分担研究報告

1. カルボニルストレスの骨関節症および腹膜機能不全に与える影響の解明

5-16

主任研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内分泌内科 助手

2. カルボニルストレスをターゲットにした新しい治療法の開発

17-28

分担研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授

3. カルボニルストレスに起因する細胞内シグナリング経路の解明

29-32

分担研究者 中島 泉 名古屋大学医学部免疫学 教授

## 序 文

腎疾患による末期腎不全透析患者数は年々増加の一途をたどり、透析療法に費やす医療費は年間約1兆円を超えた。更に、透析患者の長期化、高齢化なども進行し、医学的、社会的に重要な問題となった長期透析合併症に対する対策をたてることは急務となっている。我々は、透析合併症を酸化的および非酸化的蛋白修飾の観点から理解するカルボニルストレスという新しい概念を世界に先駆けて提唱し、その重要性を、骨関節病変、動脈硬化、腹膜透析における除水機能不全など、様々な透析合併症において示してきた。

本研究の目的は、カルボニルストレスおよびその蛋白修飾物の反応経路、生理活性、病理学的意義を明らかにし、各種長期透析合併症の発症進展機序を明らかにするとともに、これに基づいて酸化ストレスを制御し、レドックスバランスを保つことで有害なカルボニル化合物の生成を抑制する、あるいは生成したカルボニル化合物を消去することなどによる新たな治療法の開発を目指すことである。本年度は、1)カルボニルストレスによる細胞内シグナル伝達が詳細に解明され、2)除水機能不全におけるカルボニルストレスの関与の解析を施行し、3)生体が本来備えているカルボニル消去酵素系を利用した新しい治療法の開発と、第二世代のカルボニル阻害剤の同定系の確立を行った。本研究の成果はこれまで有効な対策の乏しかった長期透析合併症研究について、新たな治療法の開発のための合理的根拠を与えるとともに、それに必要な研究システムを整備、確立したもので、有効な治療法の開発研究を促進させることが期待される。本研究において、長期透析合併症に対する対策が確立されれば、多数の患者の予後および生活の質の向上に寄与するのみならず、患者ならびにその家族の社会・経済活動を活性化するとともに、増大する医療費を大幅に抑制し、保健医療制度の破綻を防ぐためにも極めて効果的であると考えられる。

平成 14 年 3 月

主任研究者 南学 正臣

(東京大学医学部腎臓内分泌内科 助手)

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)  
総括研究報告書

長期透析合併症の病態の解明及びこれに基づく革新的透析治療法の開発

主任研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手  
分担研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授  
分担研究者 中島 泉 名古屋大学免疫学 教授

A. 研究目的

我が国において腎障害による末期腎不全透析患者数は現在 20 万人を超え、年間約 14,000 人のペースで増加しつつある。それに伴い、透析療法に費やす医療費は年間約 1 兆円(総医療費の約 4%)を超え、800 億円/年の割合で急増しつづけている。特に、我が国では、末期腎不全に対する重要な治療法である腎移植が種々の理由により少ないことなどもあり、透析患者の増加は医学、社会、医療経済などの様々の面から重要な問題となっている。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、致死的な硬化性腹膜炎などの問題があり、普及を妨げている。このため、長期透析合併症の病態を解明し、これに基づいた合理的な治療法の確立が求められている。

我々は近年カルボニルストレスという生体内の糖質、脂質、アミノ酸など幅広い物質の蛋白修飾の概念を提唱し、その

各種長期透析合併症の発症進展に対する関与を明らかにしてきた。

本研究は、カルボニルストレスおよびその蛋白修飾物の反応経路、生理活性、病理学的意義を明らかにし、各種長期透析合併症の発症進展機序を明らかにするとともに、これに基づいて酸化ストレスを制御し、レドックスバランスを保つことで有害なカルボニル化合物の生成を抑制する、あるいは生成したカルボニル化合物を消去することなどによる新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

I. カルボニルストレスに起因する細胞内シグナリング経路の解明:

種々のカルボニル化合物の培養ヒト血管内皮細胞におけるシグナル伝達について解析を行い、特にアポトーシスに注目して研究を行った。

II. 透析アミロイドーシスにおけるカルボニルストレスの役割の解明:

透析アミロイドーシスの病期を各段階に

分類し、種々の組織におけるアミロイド形成と骨関節の破壊等に対するカルボニルストレスの関与を、単球・マクロファージの浸潤と関連付けて、解析を行った。

### III. 腹腔内カルボニルストレスの解明:

腹膜透析の合併症として重要な除水機能不全の主要因とされる腹膜の有効血管面積増大に着目し、患者腹膜におけるNOS、VEGF、FGF2などの発現を調べ、更に腹腔内カルボニルストレスとの関連についても検討を行った。

### IV. カルボニルトラップビーズの開発:

様々な化合物をアフィニティビーズにカップリングさせ、カルボニルトラップビーズを作製し、腹膜透析液中のカルボニル化合物に対する吸着効果について検討を行った。

### V. 酵素系の関与するカルボニルストレス消去システムの解明と臨床応用:

生体の備えているカルボニルストレス消去システムと考えられる glyoxalase の解析を行うため、glyoxalase I のトランスジェニックマウスを樹立した。

### VI. カルボニルストレス阻害剤の開発と臨床応用:

AGE 阻害剤の評価方法として蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目し、副作用の少ない有用なAGE阻害剤のスクリーニングを可能とし、種々の低分子化合物のAGE阻害能を調べ、更にそのメカニズムを解析した。

(倫理面への配慮)

これまで本研究においてヒト組織を用いた実験は、全て東海大学医学部の倫理委員会によって承諾されており、その

規則に従って施行している。よって、いずれの検体も提供者にご依頼・説明書を提示し、同意書によるインフォームドコンセントを得、そのプライバシーが十分に保たれた条件にて用いている。本研究課題ではその性質上、マウスを用いた動物実験を多く施行する。したがってすべての動物実験は動物福祉の立場からの要請や法的規制に十分従い、個体に最も負担の少ない実験手技を用いる。

### C. 研究結果及び考察

#### I. カルボニルストレスに起因する細胞内シグナリング経路の解明:

異なるカルボニル化合物である GO と MGO は培養ヒト血管内皮細胞に対して共通にチロシinkinナーゼの活性化を誘導する活性を示す一方、アポトーシス誘導に関しては異なるシグナルを伝達すること、同時にフィードバック制御機構も起動することを明らかにした。

#### II. 透析アミロイドーシスにおけるカルボニルストレスの役割の解明:

初期のアミロイドの形成には、カルボニルストレスによる蛋白修飾やマクロファージの関与が必要でないことが示唆された。しかし、透析アミロイドーシスの病態において、骨関節組織の沈着アミロイドのカルボニルストレスによる蛋白修飾が、骨・関節破壊に関与するマクロファージの浸潤に関与することが示唆された。

#### III. 腹腔内カルボニルストレスの解明: 腹膜透析の合併症として重要な除水機

能不全の主要因である腹膜の有効血管面積増大に NOS、VEGF、FGF2 などが関与していること、それらの産生亢進には腹腔内カルボニルストレスが関与していることなどを明らかにした。

#### IV. カルボニルトラップビーズの開発:

種々の化合物をカップリングしたビーズをスクリーニングした結果、化合物 X(特許における都合により)をカップリングしたビーズを用いた時に、様々なカルボニル化合物をほぼトラップすることが示され、最良の結果を得ることができた。

カルボニルトラップビーズを用いて処理された透析液は、従来の透析液より生物学的適合性の向上が認められ、腹膜機能低下の改善に有効であることが示唆された。

#### V. 酵素系の関与するカルボニルストレス消去システムの解明と臨床応用:

生体の備えているカルボニルストレス消去システムと考えられる glyoxalase の解析を行うため、glyoxalase I のトランスジェニックマウスを樹立した。

#### VI. カルボニルストレス阻害剤の開発と臨床応用:

アミノグアニジンなどの第一世代の AGE 阻害剤は特異性が低く、生体にとって必要な分子のカルボニル基も捕捉してしまうなどの副作用がある。我々は AGE 阻害剤の評価方法として蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目し、副作用の少ない有用な AGE 阻害剤のスクリーニングを可能とした。これにより同定された化合物(第二世代 AGE 阻害剤)は AGEs/ALEs の前駆体であるカルボニル捕捉作用が主ではなく、様々な自

動酸化により発生するラジカルの消去あるいは遷移金属イオンをキレートする作用を有し、糖・脂質からのカルボニル化合物の形成を効率よく阻害した。

#### D. 評価

##### I. 達成度について

独創的なカルボニル仮説に基づき、これまで明らかにされていなかった長期透析合併症の発症、進展メカニズムに迫り、それにより得られた知見に基づいて新しい治療法あるいは予防法を開発するための研究が開始、あるいはそれに必須な実験系の樹立の準備が予定通りに遂行されている。よって来年度の研究計画は一層効率に進むことが推測され、初年度の研究計画は十分に達成されていると判断する。

##### II. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究は、医学的、社会的、医療経済学的に大きな問題となっている長期透析合併症に対し、全く新しい視点でアプローチし、基礎的知見から更に発展させて治療薬開発を目指す上で極めて有用な基幹技術を提供している。

##### 1. 今後の展望について

本年度の研究で得られた知見は、長期透析合併症の発症、進展機転についての理解を大いに深め、これによりカルボニルストレスを標的とした新しい治療法の開発に向けた準備が整った。この治

療法は、長期透析合併症の治療のみならず予防にも役立つと考えられ、増大する医療費の大幅な削減につながり、それによって医療経済面で重要視されている保健医療制度の破綻を防ぐこともでき、患者ならびにその家族の社会・経済活動の活性化を図ることにも大いに貢献することが推測される。

#### E. 結論

本研究は、カルボニルストレスおよびその蛋白修飾物の反応経路、生理活性、病理学的意義を明らかにし、各種長期透析合併症の発症進展機序を明らかにするとともに、これに基づいて酸化ストレスを制御し、レドックスバランスを保つことで有害なカルボニル化合物の生成を抑制する、あるいは生成したカルボニル化合物を消去することなどによる新たな治療法の開発を目指す。本年度の研究成果によりカルボニル化合物を標的分子とした新たな予防、治療法への道が開け、カルボニル捕捉ビーズ、カルボニル消去酵素系を利用したシステム、第2世代カルボニル阻害剤などの開発に向けての新たな研究情報/材料が多岐に得られ、今後、必要な研究材料の準備/調整が着実に完了した。より一層のカルボニルストレスに関する研究が進むことが見込まれる。

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)  
分担研究報告書

カルボニルストレスの骨関節症および腹膜機能不全に与える影響の解明

主任研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手

研究要旨

透析アミロイドーシスは、長期透析患者において重要な合併症で、quality of life (QOL) を著しく低下させることから病態の解明が望まれている。また、腹膜透析は、末期腎不全の有効な治療法であるにも関わらず、除水機能不全などの問題から長期に継続して行うことに問題がある。本研究では、これらの合併症の発症メカニズムについてカルボニルストレスの観点からアプローチした。

透析アミロイドーシスの病態においては、骨関節組織の沈着アミロイドのカルボニルストレスによる修飾が、骨・関節破壊に関与するマクロファージの浸潤に関与することが示唆された。また、腹膜透析の合併症として重要な除水機能不全の主要因とされる腹膜の有効血管面積増大に着目し、患者腹膜におけるNOS、VEGF、FGF2 などの発現を調べ、その関与を示し、更にそれらの産生亢進には腹腔内カルボニルストレスが関与していることなどを明らかにした。

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

和田 健彦

東京大学大学院医学研究科内科学専攻腎臓内科学

Jing Shao

東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科

A. 研究目的

末期腎不全患者は増加の一途を辿っており、その治療については医学、社会、医療経済などの様々の面から重要な問題となっている。

本研究の1つ目の課題である透析アミ



ロイドーシスは、長期透析患者において重要な合併症で、quality of life (QOL)を著しく低下させることから病態の解明が望まれている。透析アミロイドーシスの発症機序に関して、アミロイド線維の主成分は $\beta 2$ -

ミクログロブリン( $\beta 2$ -m)であること、アミロイド沈着部位周辺にマクロファージの浸潤が見られること、沈着したアミロイド蛋白質には advanced glycation (lipoxidation) end products (AGEs/ALEs)による非酵素的蛋白修飾が認められることが明らかとなった。

しかし、それらの現象は、そのほとんどが透析アミロイドーシスの後期の限られた部位のアミロイド沈着物の解析によって得られた結果であり、各段階の沈着アミロイドにおける AGEs/ALEs 修飾や浸潤マクロファージの関与についての詳細は明らかではない。

最近、ベルギーのバニパーセルらは、透析アミロイドーシスの臨床症状の出る数年前からアミロイドの沈着が起こり、アミロイドの沈着と臨床症状との間には明らかに年数のずれが認められることを報告している。

そこで、透析アミロイドーシスの病態を解析する場合、無症状で病理学的にアミロイドの形成が認められる前期段階と関節痛、手根管症候群などの臨床症状を伴い、骨関節破壊像を認める後期段階の2つの段階について検討する必要がある。

本研究では透析アミロイドーシスを各段階に分類し、種々の組織におけるアミロイド形成と骨関節の破壊等に対する AGE 修飾および単球・マクロファージの浸潤について解析を行った。

本研究の2つ目の柱は、腹腔内カルボニルストレスである。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、腹膜透析(CAPD)の長期継続は腹膜の形態学的及び機能的変化に伴って困難となる。長期 CAPD 患者が血液透析への移行を余儀なくされる最大の原因は除水機能不全であるため、その機能異常の分子メカニズムを明らかにすることが急務とされているが、未だ解明されていない。これまでの研究では腹膜機能における腹膜中皮細胞の重要性が多く報告されてきたが、近年、除水機能不全は腹膜の有効血管面積の増加や腹膜微小血管の透過性亢進に基づくことが明らかになりつつある。このことから、腹膜除水機能不全を血管病態学観点から解析し、その基盤研究に基づいて長期 CAPD 保持を可能にする合理的、革新的 CAPD 療法確立の可能性を検討することの重要性がうかがえる。

本研究では、除水機能不全を伴う腹膜透析患者の腹膜を血管病態学的に解析した知見と、その現象にカルボニルストレスがいかなる関与を示すかを述べ、次世代の CAPD 療法の展開についてもその可能性を検討する。

## B. 研究方法

### 1. 透析患者の関節病変の評価

透析患者および対照について、剖検によって得た胸鎖関節についてアミロイドの沈着を病理学的に解析し、Garbarらの方法に従い病理学的に3段階のstageに分類した各組織について、マクロファ

ージの浸潤及び AGEs/ALEs 修飾を検討した。

## 2. 透析患者の骨関節におけるカルボニルストレスの評価

AGEs/ALEs 修飾については、ペントシジン、カルボキシメチルリジン(CML)、マロンジアルデヒド(MDA) 蛋白修飾物および ヒドロキシノネナール(HNE) 蛋白修飾物に対する特異的な抗体を用いた免疫組織染色により検討した。さらに、透析患者および対照の軟骨について酸加水分解後、高速液体クロマトグラフィーを用いてペントシジンの測定を行った。

## 3. 腹膜有効血管面積の評価

長期 CAPD 患者の腹膜形態異常と血管病理学的特性を明らかにする目的で、腹膜を第 VIII 因子抗体を用いた免疫組織染色を行い、コンピューター画像解析にて有効血管面積を測定した。

## 4. 腹膜における各種サイトカインなどの発現の解析

長期 CAPD 患者にみられる有効血管面積増大の分子メカニズムを明らかにするために、血管新生/拡張因子として知られる NO 合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) や vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現変動を immunoblot 法にて解析した。

## 5. 腹腔内カルボニルストレスの評価

腹膜の糖化/脂質過酸化最終産物 (AGEs/ALEs) 検出部位と VEGF の発現部位の局在は連続切片を用いた免疫染色法にて検討した。

さらに上記と同様の検討を腎不全モデ

ル動物(5/6 腎摘出ラット)の腹膜を用いて施行した。

## C. 研究結果と考察

### 透析患者の骨関節病変の評価

stage 1、つまり初期段階ではアミロイド沈着は軟骨の表面のみにみられ、stage 2 になると沈着は軟骨表面から関節包、滑膜に認められた。stage 1、stage 2 の段階ではアミロイド沈着部位にはマクロファージの浸潤は認められなかった。そして最終的には、臨床症状を伴い、後期のアミロイドの像を呈する stage 3 に至り、この段階でマクロファージの浸潤がアミロイドの沈着した滑膜部分のみに認められた。

### 透析患者の骨関節病変とカルボニルストレス

AGEs/ALEs 修飾とアミロイド沈着の関連性について抗 AGEs/ALEs 抗体を用いた免疫組織染色により検討したところ、stage 1 あるいは stage 2 のアミロイド組織において、軟骨自体は AGEs/ALEs 化されているが、その表面に沈着した  $\beta 2$ -m アミロイドは抗 AGEs/ALEs 抗体で染色されず、初期の段階のアミロイドでは AGEs/ALEs 修飾は認められないことが判明した。また、stage 2 にみられる被膜、滑膜のアミロイドもこの時点では AGEs/ALEs 修飾は認められなかった。しかし、stage 3、つまり後期段階のアミロイドにおいては、軟骨表面上のアミロイドには変化は認められないものの、滑膜に沈着したアミロイドはペントシジン抗体、CML 抗体などの AGEs 抗体及び MDA 抗体、HNE 抗体などの ALEs 抗体と強く反応し、高度に AGEs/ALEs 修飾されていることが明らかとなった。これらのことか

ら、初期のアミロイド形成に AGEs/ALEs 修飾は必須ではないことが示唆された。また関節のアミロイドの中で AGEs/ALEs 修飾されているのは滑膜に沈着したアミロイドだけであることが明らかとなった。

アミロイドの AGEs/ALEs 化、あるいはマクロファージの浸潤との関連性を検討したところ、アミロイド沈着の初期には AGEs/ALEs 修飾もマクロファージの浸潤も認められず、後期のアミロイド、それも滑膜に沈着したアミロイドのみに AGEs/ALEs 修飾とマクロファージの浸潤が同時に生じることが明らかとなった。

後期の骨・関節の破壊に対するマクロファージと、AGEs/ALEs 化による修飾の役割に関しては、マクロファージ浸潤のある場所に、AGEs/ALEs 修飾が認められることから、両者には関連性があることは明らかである。

現時点では、アミロイド形成の原因/促進のなりうる因子の断定は困難であるが、免疫組織染色で検出できない量の AGEs/ALEs 修飾がアミロイド形成に関与している可能性は否定できない。また、滑膜という限られた領域に沈着したアミロイドのみが AGEs/ALEs 修飾されるメカニズムやその意義などを詳細に解析し、アミロイド形成に関与する因子を同定していく必要性があると考えられる。そのためには、免疫組織学的解析だけでなく、高感度の機器分析を用いた化学的定量系を用いた検討も必要であると考えられる。

現在のところ、カルボニルストレスとマクロファージの浸潤との間の因果関係については明らかではないが、2 つの仮説が考えられる。一つは、AGEs/ALEs が、マクロファージを局所に集め、次に局所における炎症を引き起こすという仮説で、もう一つは、マクロファージがアミロイド沈

着物を異物として認識し、浸潤し、活性酸素を放出することにより AGE 形成を促進するという仮説である。活性化マクロファージは、種々の活性酸素種 (reactive oxygen species) や活性窒素種 (reactive nitrogen species) を産生し、蛋白質のフェニルアラニンやチロシン残基を修飾し、o-チロシン、m-チロシン、ジチロシン、3-ニトロチロシン、3-クロロチロシンなどの化合物が生成することが報告されている。今後、これらの修飾アミノ酸を手がかりに、DRA の病態におけるマクロファージの関与と、それに伴う酸化修飾の重要性についての検討が必要と考えられる。

#### 長期 CAPD 患者の腹膜形態異常と血管病理学的特性

長期 CAPD 患者腹膜は正常腹膜の約 4 倍の血管有効面積を有していることが明らかとなった。このことから、CAPD 患者腹膜においては溶質や濃度勾配物質の糖が増加した微小血管から早く拡散していくことが強く推測される。

さらに CAPD 患者腹膜における NOS や VEGF の発現変動を検討すると、CAPD 施行期間に伴って腹膜中の総 NOS 活性や VEGF 発現が有意に亢進することが判明した。このことから、CAPD 患者の腹膜においては NOS や VEGF などの血管新生/拡張因子の活性亢進によって有効血管面積の増大が生じていることが明らかにされた。

#### 腎不全時の腹膜機能と血管病理学的特性

腎不全モデルラットを用いて、腎機能不全と腹膜透過性の関連性を検討したところ、腎機能低下に比例して腹膜透過

性の亢進が認められた。さらに、NOS や VEGF の発現も腎機能低下に伴って亢進することが示された。NOS や VEGF に加えて血管新生や線維化に關与する fibroblast growth factor (FGF2) の発現亢進も確認されている。以上のことから、腹膜機能、特に腹膜透過性は腎不全状態ですでに低下しており、CAPD 施行によってさらに機能低下が促進されることが推測された。

#### CAPD 患者腹膜における血管病理学的異常とカルボニルストレスとの関連性

これまで我々は、CAPD 療法で腹膜機能(特に除水機能)を低下させる主要因子の一つとして反応性カルボニル化合物 (reactive carbonyl compound, RCOs) 蓄積によるカルボニルストレスの可能性を検討してきた。腎不全患者では糖や脂質から形成される RCOs が血中に多量蓄積しており、それらは腹膜透析を行うとに腹腔に貯留し、腹膜の広汎な蛋白質を異常修飾(糖化/脂質過酸化最終産物, AGEs/ALEs)を形成することが示唆されている。

我々は CAPD 患者腹腔内の高いカルボニルストレス状態が腹膜における NOS や VEGF の発現を亢進し、有効血管面積の増大、ひいては除水機能不全を招くのではないかという仮説のもと、腹膜の AGEs/ALEs 検出部位と VEGF の発現部位の局在が一致しているか否かを検討した。その結果、AGE の検出部位に一致して VEGF 発現が認められた。これは腹腔内 RCOs が腹膜中皮層や血管壁の蛋白質を異常修飾し、それによって腹膜中皮/内皮細胞から VEGF などの血管作働性物質の産生を亢進し、最終的に除水機能不全を引き起こす可能性を強く示唆している。

#### D. 結論

初期のアミロイドの形成には、AGEs/ALEs 化やマクロファージの關与が必要でないことが示唆された。しかし、透析アミロイドーシスの病態において、骨關節組織の沈着アミロイドの AGEs/ALEs 化による修飾が、骨・關節破壊に關与するマクロファージの浸潤に關与することが示唆された。今後、“カルボニルストレス”と“酸化ストレス”という概念に基づいて、透析アミロイドーシスの発症機序に關してさらに分子レベルでの解析が進み、限定された領域(滑膜)に沈着したアミロイドのみが AGEs/ALEs 修飾されるメカニズムの解明が、透析アミロイドーシスに対する有効的な治療法開発に大きく寄与することが期待される。

また、本研究では、腹膜透析の継続の上で大きな問題となる除水機能不全の主要因である腹膜の有効血管面積増大(血管新生、血管拡張)に NOS、VEGF、FGF2 などが關与していること、それらの産生亢進には CAPD 患者腹腔内カルボニルストレスが深く關与していることなどが明らかにされた。

この成果は、除水機能不全の分子メカニズムを明らかにすると共に、次世代の CAPD 療法を開発する上で極めて意義深い基盤成果である。今後、カルボニルストレス抑制がより一層安全で生体適合性の良い CAPD 療法開発への糸口となることが期待される。

#### E. 研究発表

[原著・総説] -国外-

1. Nangaku M, Pippin J, Couser WG: C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in remnant kidney rats.

- J Am Soc Nephrol** *in press*.
2. Nangaku M, Yamada K, Garipey CE, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Yanagisawa M, Fujita T, Johnson RJ: ETB receptor protects the tubulointerstitium in experimental thrombotic microangiopathy. **Kidney Int** *in press*.
  3. Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K: Progressive mesangial expansion and hypercellularity in transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin. **J Clin Invest** *in press*.
  4. Nangaku M, Miyata T, Kurokawa K: Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. **Antiox Redox Signal** *in press*.
  5. Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, Akatsuka A, Miyata T, Nangaku M, Tagawa H, Kurokawa K: Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells. **Peritoneal Dial Int** *in press*.
  6. Hanafusa N, Sogabe H, Yamada K, Wada T, Fujita T, Nangaku M: Contribution of genetically engineered animals to the analyses of complement in the pathogenesis of nephritis. **Nephrol Dial Transplant** *in press*.
  7. Hanafusa N, Yatomi Y, Yamada K, Hori Y, Nangaku M, Okuda T, Fujita T, Kurokawa K, Fukagawa M: Paracrine effects of sphingosine 1-phosphate on renal mesangial cells. **Nephrol Dial Transplant** *in press*.
  8. Sogabe H, Nangaku M, Ishibashi Y, Wada T, Fujita T, Sun X, Miwa T, Madaio MP, Song W. Increased susceptibility of

- decay-accelerating factor (DAF) deficient mice to anti-GBM glomerulonephritis. **J Immunol** 2001; 167: 2791-2797
9. Miyata T, de Strihou CvY, Imazawa T, Yoshino A, Ueda Y, Ogura H, Kominami K, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K: Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patients. **Kidney Int** 2001; 60: 2351-2359
  10. Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Ueda Y, Izuhara Y, Sakai H, Nangaku M, Kurokawa K: Characterization of megsin, a novel serpin predominantly expressed in mesangial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 286: 1098-1106
  11. Shao J, Miyata T, Yamada K, Hanafusa N, Wada T, Gordon KL, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Johnson RJ, Nangaku M: A Protective Role of Nitric Oxide in a Model of Thrombotic Microangiopathy in Rats. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 2088-2097
  12. Nangaku M, Miyata T, Suzuki D, Umezono T, Hashimoto T, Wada T, Yagi M, Nagano N, Inagi R, Kurokawa K: Cloning of rodent megsin revealed its up-regulation in mesnagioproliferative nephritis. **Kidney Int** 2001; 60: 641-652
  13. Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, Okuda T, Nanago N, Choi-Miura N-H, Couser WG, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M: Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury. **Kidney Int** 2001; 59: 137-146
  14. Wada T, Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Wagatsuma M,

Suzuki D, Wadzinski BE, Okubo K, Kurokawa K: Cloning and characterization of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4 from mesangial cells. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 2601-2608

[原著・総説] -国内-

1. 南学正臣:尿細管間質腎炎(急性、慢性). 今日の治療指針2003年度版, 医学書院, *in press*
2. 花房規男、南学正臣:糸球体内皮細胞障害. Annual Review腎臓 2002 (中外医学社) *in press*
3. 大瀬貴元、南学正臣:HUS. 専門医のための腎臓病学 *in press*
4. 田中哲洋、南学正臣:膜性腎症と膜性増殖性糸球体腎炎の診かた. *Medicine in press*
5. 太田樹、南学正臣:腎疾患と補体. 医学のあゆみ *in press*
6. 南学正臣:血液凝固異常に伴う糸球体病変 HUS、TTP、DIC. 腎疾患最新の治療2002-2004、144-146、飯野靖彦、槇野博史、二瓶宏編、南江堂
7. 加藤秀樹、南学正臣:溶血性尿毒症症候群(HUS),血栓性血小板減少性紫斑病(TTP). 日本臨床 2002; 60 Suppl 1: 593-597
8. 和田健彦、南学正臣:尿細管間質障害のメカニズム—その臨床的意義—. *Medical Practice* 2002; 19: 405-408
9. 金子知代、南学正臣:糸球体構築の崩壊と慢性腎障害. 総合臨床 2002; 51: 465-470
10. 南学正臣:尿蛋白検査,最近の動向-検査前検査から病態解析まで 補体活性化と尿細管,間質障害. 生物物理化学 2001; 45: 61-64
11. 南学正臣:血栓性微小血管症(溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病). 今日の治療指針2001年度版 p483, 多賀須幸男他編, 医学書院, 2001

12. 上條敦子、南学正臣:腎疾患はなぜ進行するか. *Mebio* 2001; 18: 32-36
13. 大瀬貴元、南学正臣:血栓性微小血管症 (HUS, TTP):EBMに基づく臨床データブック. *臨床医* 2001; 27 suppl: 530-534
14. 堀雄一、南学正臣:進展機序におけるメディエータ系球体における補体活性化の機序とその調節. *医学のあゆみ* 2001; 別冊糸球体腎炎の発症と治療: 57-61
15. 田中哲洋、南学正臣:ショックと腎不全. *臨床医* 2001; 27: 2110-2112
16. 宮田敏男、南学正臣、黒川清:糖尿病性血管合併症の Key Molecule. *Prog Med* 2001; 21: 2161-2166
17. 南学正臣:医療現場のニーズ腎不全治療. *日薬理誌* 2001; 118: 71-73
18. 和田健彦、南学正臣:蛋白尿による間質障害と補体制御因子. *Annual Review 腎臓* 2001 (中外医学社), 94-99, 2001
- [学会発表] -国外-
1. Inagi R, Miyata T, Ueda T, Nangaku M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Efficient lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in peritoneal dialysis. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA) October 12-19, 2001.
  2. Imasawa T, Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
  3. Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, Akatsuka A, Nangaku M, Miyata T, Tagawa H, Kurokawa K. Glucose dialysate induces oxidative mitochondrial DNA damage in peritoneal dialysis. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
  4. Sogabe H, Miwa T, Sun X, Ishibashi Y, Wada T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Madaio MP, Song W, Nangaku M. Increased susceptibility of



- decay-accelerating factor (DAF) deficient mice to anti-GBM glomerulonephritis. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
5. Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Suzuki D, Sugiyama S, Kurokawa K. Progressive mesangial matrix expansion and hypercellularity in transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
  6. Nangaku M, Pippin J, Couser WG. C6 mediates chronic progressive renal disease in remnant kidney rats. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
  7. Nangaku M, Yamada K, Garipey CE, Yanagisawa M, Gordon KL, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Johnson RJ. ETB receptor protects the tubulointerstitium in experimental thrombotic microangiopathy. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
  8. Ueyama H, Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Kurokawa K. Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
  9. Miyata T, Inagi R, Izuhara Y, Nangaku M, Kurokawa K, Uchida K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
  10. Inagi R, Miyata T, Ueda Y, Nangaku M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Efficient lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in peritoneal dialysis. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
  11. Nangaku M, Miyata T, Imasawa T, Ueda Y, Inagi R, Kurokawa K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
  12. Ueda Y, Miyata T, Izuhara Y, Inagi R, Tatsumi K, van Ypersele de Strihou C,

- Nangaku M, Kurokawa K. Mechanism of the inhibitory effect of 2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) on advanced glycation end product and advanced lipoxidation end product formation. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
13. Ueda Y, Miyata T, Ishikawa S, Inagi R, Nangaku M, Tatsumi K, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) inhibits the neointima proliferation of rat carotid artery following balloon injury. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.

[学会発表] -国内-

1. 南学正臣. 免疫学的機序による腎疾患の発症と進行. 阿蘇腎フォーラム. 特別講演. 2001.01.20. 博多
2. 南学正臣. 腎疾患の発症、進展機構における補体. 日本薬学会第121年会. シンポジウム. 2001.03.28.-3.30. 札幌
3. 吉野 淳, 宮田敏男, 小倉裕幸, 上田裕彦, 稲城玲子, 伊豆原優子, 南学正臣, 斉藤 明, 黒

- 川 清. 透析患者におけるカルボニル消去系の検討. 第44回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
4. 邵 菁, 南学正臣, 曾我部肇, 山田耕永, 花房規男, 和田健彦, 稲城玲子, 黒川 清, RichardJohnson, 藤田敏郎. Thrombotic microangiopathy モデルにおける eNOS の保護作用. 第44回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
  5. 和田健彦, 宮田敏男, 南学正臣, 稲城玲子, 鈴木大輔, 堺秀人, 黒川 清. ヒト培養メサンギウム細胞よりのプロテインフォスファターゼ新規サブユニットのクローニングと解析. 第44回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
  6. 宮田敏男, 稲城玲子, 南学正臣, 鈴木大輔, 杉山敏, 堺秀人, 黒川 清. ヒトメサンギウム細胞高発現遺伝子(megsin)改変マウスにおけるメサンギウム増殖性腎炎. 第44回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
  7. 曾我部肇, 南学正臣, Song Wenchao, 石橋由孝, 和田健彦, 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川 清, 藤田敏郎. マウス抗GBM抗体腎炎におけるDAFの保護的役割. 第44回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
  8. 南学正臣, 山田耕永, 花房規男, 和田健彦, 宮田敏男, 稲城玲子, 黒川 清, Couser William, 藤田敏郎. 5/6腎摘

モデルにおける長期的な尿細管  
間質障害の尿中補体依存性.第  
44 回日本腎臓学会学術総会.  
講演. 2001.5.27-5.29. 東京.

9. 曾我部肇, 南学正臣, Quigg  
Richard, 岡田則子, 稻城玲子,  
宮田敏男, 黒川 清, 藤田敏郎.  
可溶性補体調節蛋白(sCrry)遺  
伝子導入による腎炎治療.第 44  
回日本腎臓学会学術総会. 講  
演. 2001.5.27-5.29. 東京.
10. 南学正臣. 腎疾患の発症と進  
行における補体と補体調節蛋白  
の重要性. 第22回九州臨床補  
体研究会. 特別講演.  
2001.11.17. 博多.

厚生科学研究費補助金(21世紀型医開拓推進研究事業)  
分担研究報告書

カルボニルストレスをターゲットにした新しい治療法の開発

分担研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 助教授

研究要旨

我々はこれまでにカルボニルストレスという新しい概念により、長期透析合併症の病態メカニズムにアプローチし、その重要性を示してきた。

本年度の本研究では、カルボニルストレスに対処することにより長期透析合併症を治療あるいは予防することができるという立場に基づき、カルボニル化合物を捕捉するビーズの開発、酵素系の関与するカルボニルストレス除去システムの解明と、低分子化合物による新しいカルボニルストレス阻害剤の開発について検討を行った。

カルボニル捕捉ビーズの開発のため、種々の化合物をカップリングしたビーズをスクリーニングした結果、様々なカルボニル化合物を効率よくトラップするビーズの開発に成功した。

酵素系の利用としては、生体の備えているカルボニルストレス除去システムと考えられる glyoxalase の解析を行うため、glyoxalase I のトランスジェニックマウスを樹立した。

カルボニルストレス阻害剤の開発のためには、AGE 阻害剤の評価方法として蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目し、副作用の少ない有用な AGE 阻害剤のスクリーニングを可能とした。これにより同定された化合物(第二世代 AGE 阻害剤)は AGEs/ALEs の前駆体であるカルボニル捕捉作用が主ではなく、様々な自動酸化により発生するラジカルの除去あるいは遷移金属イオンをキレートする作用を有し、糖・脂質からのカルボニル化合物の形成を効率よく阻害した。

本研究の成果は、長期透析合併症を分子レベルで理解するうえで基礎的に重要であり、更にこれを抑制する新しい治療法の開発などに大きく寄与するものと考えられる。