

20020540

厚生労働科学研究費補助金

効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 南学 正臣
平成15年(2003) 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

5-12

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

13-24

分担研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 教授

序文

末期腎不全による透析患者数は急速に増加して20万人を超え、透析療法に関連する医療費は年間1兆円(総医療費の約4%)を超え、800億円/年の割合で急増し続けている。血液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か、長期透析に伴う心血管病変・透析アミロイドーシスなどの合併症の問題が深刻化している。腹膜透析療法は、在宅治療が可能で、医療費の削減に寄与する可能性があるか、腹膜硬化に伴う除水機能不全が重大な問題である。これらの問題点を解決するためにも、長期透析合併症の病態を解明し、合理的かつ革新的治療法に向けての研究を展開し、患者の生活レベルを向上させつつ医療費を削減する新たな腎不全治療システムを構築することが急務である。

我々は、生体内の糖、脂質が酸化、非酸化の過程を経て生成する反応性カルボニル化合物およびその蛋白修飾物質(advanced glycation (lipoxidation) end products AGEs/ALEs)のこれらの病態の形成における重要な役割を示し、これを“カルボニルストレス”という概念として提唱し、その腎障害および透析合併症における役割について、世界に先駆け先端的研究を展開してきた。本年度の研究では、初年度の研究で開発、蓄積した材料(実験動物など)、技術を利用し、更に研究を発展させた。

本年度の成果としては、1)GLO系のカルボニルストレス消去能の亢進を評価、利用するため、GLO高発現ラットを作成し、その消去能の亢進をin vitroのみならずin vivoで確認した。このことは、GLO系を利用した新規治療法の可能性を示唆するものである。2)カルボニルストレス評価系として有用なモデル動物を検討、評価し、SHR/NDラット系統がこの目的に相当であることを新たに見出し、解析を行った。3)AGEs/ALEsの測定法に関して、これまでの不正確であった物理的測定法を見直し、化学的反応に基づく精度が高く再現性のよい定量法を確立した。この方法を用い、既存の薬剤についてin vitroにおけるカルボニルストレス抑制作用を評価した結果、降圧薬であるアンジオテンシンII受容体拮抗薬やアンジオテンシンII受容体拮抗薬がカルボニルストレス抑制作用を有することを見いだした。そして、それらの薬剤について、ランカル消去能、キレート作用、カルボニル化合物トラップ能等を測定することにより、従来の薬剤と異なるカルボニルストレスの抑制に対する作用機序を明らかにした。4)この結果をin vivoに応用し、本年度の研究にて見出されたSHR/NDラット系統におけるカルボニルストレスの亢進とそれに伴う臓器障害が、アンジオテンシンII受容体拮抗薬によって抑制できることを示した。このことは、従来知られていなかったカルボニルストレス抑制性の薬理作用が既に臨床応用されている薬剤にも存在していることを示しており、この方法を用いて既存の薬剤の新しい応用方法が見出せることを示した点で意義深い。5)新たな治療法確立の試みとして、種々のリカント化合物をヒースにカノプリングさせたカルボニルトラップヒースを作製し、腹膜透析液中のカルボニル化合物の吸着能を評価し、処理した透析液が生物学的適合性の向上を示し、腹膜機能低下の改善に有効であることを示した。本方法は、患者のQOLを向上させるのみならず、医療費削減の点からも注目されている腹膜透析の合併症治療として新たな可能性を示したものである。

以上のように、今年度の研究により、長期透析合併症としての血管病変、腹膜病変、骨関節病変などに対する新規治療法を開発する上で有用な知見が得られた。また、これら情報と研究材料は単に腎不全合併症だけでなく、カルボニルストレスの関与が強く示唆されている糖尿病合併症や動脈硬化などの進展を阻害する新しい治療に繋がる可能性も期待される。更に、我々の確立した方法論により既に臨床で使われている薬剤に新たな薬効としてのカルボニル阻害作用が見出されたことは、その他の既存の薬剤においても未発見のカルボニル阻害作用がある可能性を示唆し、臨床応用への治験期間や費用の点から考え非常に意義深い。これらの結果は今後大きく発展すると考えられ、臨床的応用に向けこれらコンセプトを実用化することとその有用性を早急に検討すべきであると考えます。

平成15年3月

主任研究者 南宇 正臣
(東京大学医学部腎臓内分泌内科 助手)

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
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 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つある。このため、透析患者の増加は医学的観点からのみならず、社会的にも、医療経済的にも重要な問題となっている。これらの問題に対する方法の1つとして腹膜透析が挙げられるが、本法には腹膜機能低下、致死的な硬化性腹膜炎などの問題があり、十分に普及しない。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を確立することか急務となっている。

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

物の病態生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、これにより得られた知見に基づいて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消去酵素としてのGLO系の臨床応用実験

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 の解析を行うために昨年樹立した glyoxalase I のトランスジェニックマウス、および新たに樹立した glyoxalase I (GLO-1)のトランスジェニックラットを用い、GLO-1 発現の亢進を -1-確認し、更にこの GLO-1 発現亢進が実際にカルボニルストレス抑制効果を持つかどうかを検討した。

II モデル動物における病態とカルボニルストレスの関連性の確立

STZ 糖尿病モデル動物、SHR/ND 糖尿病自然発症系統、5/6腎摘腎不全モ

テル、これまでに我々の開発した腎炎自然発症遺伝子改変モデル動物等の各種疾患モデル動物の組織中のカルボニル修飾蛋白の濃度を測定し、更に免疫組織学的にその沈着を解析し、病態との関連性を検討した。

Ⅲ 新しいカルボニルストレス抑制剤の開発

臨床応用が可能な、副作用の少ないカルボニルストレス抑制剤の開発めざし、カルボニル化合物補足作用または蛋白修飾抑制作用を有する化合物のプロファイリングを行った。プロファイリングの結果得られた有用化合物(リード化合物)を基に、従来より臨床で使用されている種々の薬物について、HPLC、GC/MSなど駆使し、蛋白修飾(AGEs/ALEs)抑制化合物の探索を行った。

更に、有効とされる薬剤のカルボニルストレス抑制機序を明らかにするため、ESR、HPLCなどを用い、ラシカルの消去、カルボニル化合物生成抑制活性、カルボニル化合物トラップ活性について検討した。

Ⅳ 新しいカルボニルストレス抑制剤のモデル動物における治療効果の評価

前述のSHR/ND糖尿病性腎症ラットを用い、angiotensin 受容体拮抗剤によりカルボニルストレスが *in vivo* で軽減できるかどうかを検討した。

Ⅴ カルボニルトラップヒースの臨床応用実験

昨年度の研究で作成したカルボニル捕捉ヒースを用いて腹膜透析液を処理し、そのカルボニル化合物含有量を調べた。更に、処理した腹膜透析液の培養細胞に対する影響を調べた。

(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、そのプライハ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、マウスおよびラット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消去酵素としてのGLO系の臨床応用実験

GLO-1 のトランスシェニクマウスおよびラットでは、GLO-1 発現の亢進が確認された。カルボニル化合物として methylglyoxal, glyoxal, 3-deoxyglucosone を指標に用い、コントロール動物およびトランスシェニク動物の臓器抽出蛋白とともに incubation し、そのカルボニル化合物の濃度変化を HPLC にて測定したところ、GLO-1 高発現動物の臓器はカルボニルストレス抑制能を持つことが示された。

II モデル動物における病態とカルボニルストレスの関連性の確立

今後カルボニルストレス阻害剤の効果を

評価する上で、モデル動物における病態とカルボニルストレスの関連性を確立しておくことは必須である。本研究により、種々のモデル動物の中で、SHR/ND糖尿病自然発症ラット系統か、高いカルボニルストレスを呈していることか示された。

III 新しいカルボニルストレス抑制剤の開発

降圧薬であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ACEI)などか効率よくカルボニルストレスを抑制することか分かった。また、その作用は、AGEs/ALEs の前駆体であるカルボニル補足か主ではなく、様々な自動酸化により発生するランカルの消去あるいは遷移金属イオンをキレートを行い、糖脂質からのカルボニル化合物の形成を効率よく阻害することによることか判明した。

IV 新しいカルボニルストレス抑制剤のモデル動物における治療効果の評価

Angiotensin 受容体拮抗剤は、免疫組織学的にも、HPLC などを用いた生化学的定量法によっても、カルボニル化合物の蓄積を抑制した。治療群では、糖尿病性腎症の組織学的改善と蛋白尿の軽減か認められた。また、このカルボニル化合物蓄積軽減に伴う糖尿病性腎症の発症進展抑制効果は、血圧に非依存性であった。

V カルボニルトラップヒースの臨床応用実験

カルボニル捕捉ヒースを用いて処理した腹膜透析液では、カルボニル化合物含有量か低下していた。更に、カルボニル

化合物捕捉ヒースにより腹膜透析液の生物学的適合性の向上か得られ、これか腹膜機能低下の改善に有効であることか示された。

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か開始、あるいはそれに必須な実験系の樹立の準備か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か推測され、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る準備か整った。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か推測される。

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病態生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。本年度の研究結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、治療法への道か開け、カルボニル捕捉ヒース、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/材料か多岐に得られ、今後、必要な研究材料の準備/調整か着実に完了した。より一層のカルボニルストレスに関する研究か進むことか見込まれる。

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
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分泌内科 助手

研究要旨

カルボニルストレスは、長期透析合併症の病態を一元的に説明する独創的な仮説であり、世界的に注目を集めている。本研究では、カルボニルストレスの病態生理を明らかにするため、モデル動物の確立を行い、更に新しいカルボニルストレス抑制剤の効果をそのモデル動物を利用して解析した。

様々な腎疾患モデル動物の組織中のカルボニル修飾蛋白の濃度を測定し、更に免疫組織学的にその沈着を解析し、病態との関連性を検討することにより、SHR/ND糖尿病性腎症自然発症ラット系統か、カルボニルストレスモデル動物として有用であることか示された。また、分担研究者の宮田らか開発した新しいカルボニルストレス抑制剤としての Angiotensin 受容体拮抗剤をSHR/NDラット系統に投与し、これか免疫組織学的にも、HPLC などを用いた生化学的定量法によっても、カルボニル化合物の蓄積を抑制することか分かった。治療群では、糖尿病性腎症の組織学的改善と蛋白尿の軽減か認められた。また、このカルボニル化合物蓄積軽減に伴う糖尿病性腎症の発症進展抑制効果は、血圧に非依存性であった。

今回の研究は、カルボニルストレス阻害剤の評価系として我々の系か有効であることを示したのみならず、糖尿病性腎症に対してカルボニルストレス療法か有効であることを示した点ても意義深い。今後、本研究の成果により、腎不全・透析合併症に対する新たな治療・予防法か開発され、患者の長期予後や QOL か改善するとともに、医療費の大幅な節減か可能となることか期待される。

研究組織

研究協力者

山本 博

金沢大学大学院医学研究科 医学部

血管分子生物学 教授

稲城 玲子

東海大学総合医学研究所

講師

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。我々は、生体内の糖、脂質が酸化、非酸化の過程を経て生成する反応性カルボニル化合物およびその蛋白修飾物質(advanced glycation (lipoxidation) end products AGEs/ALEs)がこれらの病態の形成に重要な役割を果たしている可能性を示し、これを“カルボニルストレス”という概念として提唱し、世界に先駆け先端的研究を展開してきた。カルボニルストレスは種々の長期透析合併症を統一的に説明する独創的な学説であり、一連の研究は着実に成果を上げている。

本研究の1つ目の課題であるカルボニルストレスモデル動物の確立であるか、今後カルボニルストレス阻害剤の効果を評価する上で、モデル動物における病態とカルボニルストレスの関連性を確立しておくことは必須である。

本研究では様々な腎疾患モデル動物の組織中のカルボニル修飾蛋白の濃度を測定し、更に免疫組織学的にその沈着を解析し、病態との関連性を検討した。

本研究の2つ目の柱は、実際にこのカルボニルストレスモデル動物を用いての、カルボニルストレス阻害候補薬剤の検討である。

本研究では、カルボニルストレスモデル動物を樹立し、それを用いてカルボニルストレス抑制治療が実際に臓器保護効果を示すことを示し、今後の新たなカルボニルストレス療法の実現への道を開く。

B 研究方法

1 腎疾患モデル動物の作成

STZ 糖尿病モデル動物、SHR/ND 糖尿病自然発症系統、5/6腎摘腎不全モデル、これまでに我々の開発した腎炎自然発症遺伝子改変モデル動物等を作成し検討した。STZ 糖尿病モデルは、ラットに STZ(streptozotocin)を尾静注することにより作成した。5/6腎摘腎不全モデルは、右腎摘出後1週間してから、左の腎動脈を部分結紮し左腎の2/3を梗塞に陥らせることにより作成した。

2 腎疾患モデル動物に於けるカルボニルストレスの評価

組織中のカルボニル修飾蛋白の濃度について、高速液体クロマトグラフィーを用いてペンタシシンの測定を行った。

更に免疫組織学的にその沈着を解析した。AGEs/ALEs 修飾については、ペンタシシン、カルボキシメチルリシン(CML)、マロンシアルデヒド(MDA)蛋白修飾物および ヒドロキノンネナール(HNE)蛋白修飾物に対する特異的な抗体を用いた。

3 Angiotensin 受容体拮抗剤のカルホニルストレスモデル動物への投与実験

Angiotensin 受容体拮抗剤をSHR/NDラット系統に13週齢より20週間連日投与し、その効果を解析した。カルホニルストレスに対する効果は、HPLC などを用いた生化学的定量法および免疫組織学的方法によって評価した。糖尿病性腎症に対する効果は、蛋白尿の測定、PAS染色による病理組織学的評価、によって行った。

C 研究結果と考察

腎疾患モデル動物に於けるカルホニルストレスの評価

血液検査によりBUNおよびクレアチニンで評価する腎不全の程度は、5/6腎摘モデルで最も重篤であったにも関わらず、生化学的定量法および免疫組織学的評価法によるカルホニルストレスはSHR/ND糖尿病自然発症ラット系統において、最も重度であった。SHR/ND糖尿病自然発症ラット系統では、加齢とともに蛋白尿が出現し、組織学的にも分節性のメサンキウム基質の増加を認め、カルホニルストレスに伴う腎障害のモデル動物として適切であると考えられた。

Angiotensin 受容体拮抗剤のカルホニルストレスモデル動物への投与実験

免疫組織染色および生化学的定量法によりカルホニルストレスに対するAngiotensin 受容体拮抗剤の効果を検討したところ、治療によりカルホニル化合物の蓄積が抑制されることか示された。

更に、治療群では、糖尿病性腎症の組織学的改善と蛋白尿の軽減が認められた。また、このカルホニル化合物蓄積軽減に伴う糖尿病性腎症の発症進展抑

制効果は、血圧に非依存性であった。

従来、Angiotensin 受容体拮抗剤は糸球体内高血圧を改善することにより腎保護作用を示す、とする仮説が主流であった。我々の知見は、血行動態を介する機序以外に、カルホニルストレスを軽減することによりAngiotensin 受容体拮抗剤が腎保護作用を呈する可能性を提示している。今回の研究は、カルホニルストレス阻害剤の評価系として我々の系が有効であることを示したのみならず、糖尿病性腎症に対してカルホニルストレス療法が有効であることを示した点でも意義深い。

D 結論

今後、本研究の成果により、腎不全・透析合併症に対する新たな治療・予防法が開発され、患者の長期予後やQOLが改善するとともに、医療費の大幅な節減が可能となることか期待される。また近年カルホニルストレスは糖尿病・アルツハイマー病など腎不全以外の多くの疾患でも病態に関与することか示唆されており、すてに本研究による副次的産物として糖尿病性合併症に対する治療法の開発にも展望が開けており、更にこれらの疾患の病態解明・治療法開発にも貢献することか期待される。

E 研究発表

[原著・総説] -国外-

- 1 **Nangaku M**, Miyata T, Sada T, Mizuno M, Inagi R, Ueda Y, Ishikawa N, Yuzawa H, Koike H, de Strihou CvY, Kurokawa K

- Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy **J Am Soc Nephrol** *in press*
- 2 Takaki I, Nishi T, **Nangaku M**, Shimoyama H, Inada T, Matsuyama N, Kumano H, Kuboki T Clinical and psychological aspects of restless legs syndrome in uremic patients on hemodialysis **Am J Kidney Dis** *in press*
 - 3 Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, **Nangaku M** Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats **J Am Soc Nephrol** *in press*
 - 4 **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 **Int Congress Series** *in press*.
 - 5 **Nangaku M**, Miyata T, Kurokawa K Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications **Antiox Redox Signal** *in press*
 - 6 Shao J, **Nangaku M**, Miyata T, Inagi R, Yamada K, Kurokawa K, Fujita T Imbalance of T cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury **Hypertension** *in press*
 - 7 Onogi H, Miyata T, Inagi R, **Nangaku M**, Kurokawa K Serpin, megsin and plasmin **Contrib Nephrol** *in press*
 - 8 Kurokawa K, **Nangaku M**, Saito A, Inagi R, Miyata T Future perspectives of chronic renal failure **Am J Kidney Dis** *in press*
 - 9 Sogabe H, Quigg R.J, Okada N, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, **Nangaku M** Gene therapy for renal injury model rat using an adenovirus vector encoding the soluble rat Crry gene **Clin Exp Nephrol** 6, 216-223, 2002
 - 10 **Nangaku M** Final common pathways of progression of renal diseases **Clin Exp Nephrol** 6, 182-189, 2002
 - 11 Suzuki T, **Nangaku M**, Oku S Takemura H, Yokoyama Y, Takahashi Y, Fujita T Captopril renography In Bartter's syndrome **Clin Exp Nephrol** 6, 163-165, 2002
 - 12 Ishikawa N, Miyata T, Ueda Y, Inagi R, Izuhara Y, Yuzawa H, Onogi H, Nishina M, **Nangaku M**, de Strihou CvY, Kurokawa K Affinity adsorption of glucose degradation products improves the biocompatibility of conventional peritoneal dialysis fluid **Kidney Int** 63 331-339, 2003
 - 13 Inagi R, Miyata T, **Nangaku M**, Ueyama H, Takeyama K, Kato S, Kurokawa K Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin **J Am Soc Nephrol** 13(11) 2715-22, 2002
 - 14 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** 17 Suppl 9 34-36, 2002
- 15 Miyata I, De Strihou CvY, Ueda Y Ichimori K, Inagi R, Onogi H Ishikawa N, **Nangaku M**, and Kurokawa K Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products Biochemical mechanisms **J Am Soc Nephrol** 13 2478-2487, 2002
- 16 **Nangaku M**, Yamada K, Gariepy CE, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Yanagisawa M, Fujita T, Johnson RJ ETB receptor protects the tubulointerstitium in experimental thrombotic microangiopathy **Kidney Int** 62, 922-928 2002
- 17 Inagi R, Miyata T, Ueda Y, Yoshino A, **Nangaku M**, De Strihou CvY, and Kurokawa K Efficient in vitro lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in conventional glucose peritoneal dialysis fluid **Kidney Int** 62, 679-687, 2002
- 18 Inagi R, Miyata T, Imasawa T **Nangaku M**, Kurokawa K Mesangial cell-predominant gene, megin **Nephrol Dial Transplant** 17 Suppl9 32-33, 2002
- 19 **Nangaku M**, Pippin J, Couser WG C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in remnant kidney rats **J Am Soc Nephrol** 13, 928-936, 2002
- 20 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** 17, 580-586, 2002
- 21 Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, **Nangaku M**, Hirata Y, Nagai R In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin-II induced renal damage **Hypertension** 39 838-843, 2002
- 22 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, megin **J Clin Invest** 109 585-593, 2002
- 23 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** 22 11-21, 2002
- 24 Kurokawa K, **Nangaku M**, Saito A, Inagi R, Miyata T Current issues and future perspectives of chronic renal failure **J Am Soc Nephrol** 13 Suppl 1, S3-6, 2002
- [原著・総説] -国内-
- 1 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*

- 2 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, p413-414, 2003
 - 3 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) p76-82, 2002
 - 4 大瀬貴元、南学正臣 溶血性尿毒症症候群 p392-398 腎臓病 専門医にきく最新の臨床 御手洗哲也、秋葉隆 編集 中外医学社 2002
 - 5 大瀬貴元、南学正臣 補体と糸球体腎炎 細胞 34, 34-37, 2002
 - 6 南学正臣 尿細管間質障害の臨床的評価 p124-125 専門医のための腎臓病学 下条文武、内山聖、富野康日己 編集 医学書院 2002
 - 7 田中哲彦、南学正臣 鎮痛薬による腎乳頭壊死の診断 p129-131 専門医のための腎臓病学 下条文武、内山聖、富野康日己 編集 医学書院 2002
 - 8 大田樹、南学正臣 腎疾患と補体別冊・医学のあゆみ 腎疾患 states of arts 医歯薬出版株式会社, 浅野泰、小山哲夫編, p22-26, 2003-2005
 - 9 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, 飯野靖彦、槇野博史、二瓶宏編、南江堂 p144-146, 2002-2004
 - 10 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 60 Suppl 1, 593-597, 2002
 - 11 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 19, 405-408, 2002
 - 12 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 51, 465-470, 2002
- [学会発表] -国外-
- 1 **Nangaku M** Final common pathways of progression of renal disease **Taiwan Society of Nephrology**, 25-8, Taipei, Taiwan
 - 2 **Nangaku M**, Yamamoto T, Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Johnson RJ, Goligorsky MS, Noiri E The efficacy of transplanted endothelial cells to ameliorate a model of thrombotic microangiopathy in rats **American Society of Nephrology**, 1030-114, Philadelphia, U S A
 - 3 Inagi R, Miyata T, **Nangaku M**, Izuhara Y, Onogi H, Kurokawa K Mesangium-predominant serpin, megsin, inhibits the serine protease activity of plasmin **American Society of Nephrology**, 1030-114, Philadelphia, U S A
 - 4 Ishikawa N, Miyata T, Ueda Y, Inagi R, Izuhara Y, **Nangaku M**, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K Affinity adsorption of glucose degradation products improves in

- vitro the biocompatibility of conventional peritoneal dialysis fluid **American Society of Nephrology**, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
- 5 Miyata T, van Ypeisele de Strihou C, Ueda Y Inagi R, **Nangaku M**, Kurokawa K Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors lower in vitro the foimation of advanced glycation end products Biochemical mechanisms **American Society of Nephrology**, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
 - 6 Yamada K, Kawachi H, Inagi R, Miyata T Kurokawa K, Shimizu F Fujita T, **Nangaku M** T cell deficient rats develop anti-Thyl nephritis **American Society of Nephrology**, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
 - 7 Shao J, **Nangaku M**, Yamada K, Inagi R, Kurokawa K, Miyata T, Fujita T Imbalance of T cell subsets in angiotensin II infused rats **American Society of Nephrology**, 10 30-11 4, Philadelphia, U S A
 - 8 **Nangaku M** Complement and glomerulonephritis **University of Pennsylvania Nephrology Seminar**, 11 5, Philadelphia, U S A
- [学会発表] -国内-
- 1 **南学 正臣**「ワークショップ腎炎関連因子 補体調節蛋白」日本腎臓学会第32回東部学術集会(東京) 2002 10 18-19
 - 2 吉野 淳、宮田 敏男、稲城 玲子、石川 直愛、湯澤 公子、上田 裕彦、黒川 清、**南学 正臣**「クリオキサラーゼ消去系によるPD液由来カルボニルストレス軽減の検討」第47回日本透析医学会(東京) 2002 7 21
 - 3 石川 直愛、宮田 敏男、上田 裕彦、小野木 博、伊豆原 優子、稲城 玲子、黒川 清、**南学 正臣**「カルボニル化合物吸着ヒースと腹膜透析への応用」第47回日本透析医学会(東京) 2002 7 21
 - 4 伊豆原 優子、宮田 敏男、上田 裕彦、稲城 玲子、湯澤 公子、小野木 博、**南学 正臣**、黒川 清「ACE阻害剤/アンジオテンシンII受容体(AT1R)拮抗薬の蛋白修飾抑制効果」第47回日本透析医学会(東京) 2002 7 19
 - 5 上田 裕彦、宮田 敏男、稲城 玲子、湯澤 公子、伊豆原 優子、小野木 博、**南学 正臣**、黒川 清「ACE阻害剤ピリトキサミンのカルボニルストレス抑制作用」第47回日本透析医学会(東京) 2002 7 19
 - 6 **南学 正臣**「教育講演 補体学への招待」第33回補体シンポジウム(東京) 2002 7 11-13
 - 7 **南学 正臣**「腎疾患と補体」九州大学大学院講義(神戸) 2002 6 11
 - 8 **南学 正臣**「大島賞受賞講演 腎疾患の進展の final common pathway」第45回日本腎臓学会学術総会(大阪) 2002 5 23-25
 - 9 **南学 正臣**「日本語CME カリウム代謝異常とその分子メカニ

- ム」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 23-25
- 10 宮田 敏男、上田 裕彦、小野木博、稲城 玲子、南学 正臣、黒川 清「ACE 阻害剤/アンジオテンシン II 受容体 (AT₁R) 拮抗薬の腎保護作用 蛋白修飾抑制作用」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 25
- 11 上田 裕彦、宮田 敏男、稲城 玲子、小野木 博、伊豆原 優子、南学 正臣、黒川 清「第二世代 AGE 阻害薬ピリトキサミンのカルボニルストレス抑制作用」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 25
- 12 南学 正臣、山田 耕永、宮田 敏男、稲城 玲子、柳沢 正史、黒川 清、藤田 敏郎「尿細管間質障害におけるエントセリンB型受容体の保護的役割」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 25
- 13 稲城 玲子、宮田 敏男、伊豆原 優子、小野木 博、南学 正臣、黒川 清「メクシン標的セリンプロテアーゼ（メクシンリカント）の同定」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 24
- 14 伊豆原 優子、宮田 敏男、稲城 玲子、小野木 博、國頭 一也、朝倉 昌博、上田 裕彦、南学 正臣、黒川 清「抗人 megs1n 中和抗体の作製」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 24
- 15 小野木 博、宮田 敏男、上田 裕彦、伊豆原 優子、南学 正臣、稲城 玲子、黒川 清「システアミンによるカルボニルストレス抑制効果」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 24
- 16 石川 直愛、宮田 敏男、上田 裕彦、小野木 博、伊豆原 優子、南学 正臣、稲城 玲子、黒川 清「カルボニル化合物の吸着ヒースと腹膜透析への応用」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 24
- 17 上山 博、宮田 敏男、稲城 玲子、小野木 博、伊豆原 優子、南学 正臣、黒川 清「メサンキウム細胞高発現遺伝子 megs1n の転写調節機構」第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002 5 24
- 18 南学 正臣「腎疾患における間質障害」産業医科大学大学院講義（北九州）2002 2 22

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
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 教授

研究要旨

我々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かできるという立場に基づいて新しい治療法の開発を行ってきた。

本年度の本研究では、昨年度開発した酵素系の関与するカルボニルストレス消去システム、低分子化合物による新しいカルボニルストレス阻害剤、カルボニル化合物を捕捉するヒースについて、検討を加え、臨床応用を目指すための基礎実験を行った。

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消去システムである glyoxalase I (GLO-1) のトランスジェニックマウスおよびラットを樹立し、その GLO-1 発現の亢進を確認し、更に GLO-1 発現亢進が実際にカルボニルストレス抑制効果を持つことを示した。

また、昨年開発したカルボニルストレスの化学的定量法を利用した新しいカルボニルストレス阻害剤のスクリーニングにより、従来降圧剤として利用されていたアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ACFI) などか効率よくカルボニルストレスを抑制することを発見した。また、その作用はカルボニル補足か主ではなく、様々な自動酸化により発生するラシカル消去あるいは遷移金属イオンをキレートを行い、糖・脂質からのカルボニル化合物の形成を効率よく阻害することによることか判明した。

カルボニル捕捉ヒースについては、昨年開発した様々なカルボニル化合物を効率よくトラップするヒースを用いて実際に腹膜透析液を処理し、カルボニル化合物含有量か低下すること、カルボニル化合物捕捉ヒース処理により腹膜透析液の生物学的適合性の向上か得られ、これか腹膜機能低下の改善に有効であることを示した。

本研究の成果は、長期透析合併症を分子レベルで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。

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

杉山 敏
藤田保健衛生大学医学部内科 教授

臼田 信光
藤田保健衛生大学医学部解剖学
教授

角田 隆俊
東海大学内科 講師

A 研究目的

蛋白は糖により非酵素的および不可逆的反應を受けて advanced glycation end products (AGE)などの修飾物を形成する AGEs は当初、血糖の高い糖尿病で展開されてきたが、今では腎不全、動脈硬化、アルツハイマー病、関節リウマチなどの疾患においても研究が行われている。腎不全患者では、糖化ストレス、酸化ストレス、カルボニル消去系の低下に伴い、糖・脂質から生成したカルボニル化合物が蛋白を傷害し AGEs/ ALEs が蓄積している。さらに、血管内皮細胞由来の reactive nitrogen species や単球・マクロファージ由来の reactive oxygen species も蛋白を傷害し、それぞれに特有の蛋白修飾物 (3-nitrotyrosine, 3-chlorotyrosine,

o-tyrosine, m-tyrosine, dityrosine) を形成することか明らかとなっており、腎不全におけるこのような様々な蛋白修飾物の解析は、病態の生化学的背景を把握し理解を深めるのに有効である。現在、我々はカルボニルストレスの軽減、糖・脂質さらには reactive nitrogen / oxygen species による蛋白傷害を阻害する治療薬の開発を目指している。

B 研究方法

1 glyoxalase I トランスジェニックラットの樹立

ヒト glyoxalase I 遺伝子をクローニングし、これをラット卵に注入し、偽妊娠ラットの卵管に入れ、トランスジェニックラットを作成した。

外来遺伝子の発現をPCRおよびシエンミンクササンフロトで調べた。外来遺伝子産物の発現は、ウエスタンフロトおよび免疫組織学的手法により、調べた。

2 カルボニルストレス消去酵素としてのGLO系の臨床応用実験

ヒト glyoxalase I (GLO-I) トランスジェニックマウスおよびラットを用い、外来遺伝子産物である GLO-I が種々の臓器で高発現していることを、ウエスタンフロトおよび免疫組織学的手法により、調べた。

更に、外来遺伝子産物の生物学的活性について、組織抽出物の GLO-I 活性およびカルボニル化合物代謝能を調べた。

外来遺伝子の発現をPCRおよびシエンミンクササンフロトで調べた。外来

遺伝子産物の発現は、ウェスタンブロットおよび免疫組織学的手法により、調べた。外来遺伝子産物の生物学的活性については、組織抽出物の GLO-I 活性を調べた。

GLO-1 発現亢進が実際にカルボニルストレス抑制効果を持つかどうかを検討する目的で、GLO-1 のトランスジェニック動物から各種臓器を採取し、それら臓器破砕液における GLO-1 発現量とカルボニル消去能の相関を検討すると共に、GLO-1 のトランスジェニック動物由来の培養細胞(胸腺細胞、脾臓細胞など)におけるカルボニル誘導性細胞内シグナル伝達の抑制効果を解析した。

3 新たなカルボニルストレス阻害剤スクリーニング方法により見出された新規カルボニルストレス阻害剤の解析

我々は、これまでのカルボニルストレス阻害剤の評価方法を見直し、物理的測定法から蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目することにより新たなカルボニルストレス阻害剤のスクリーニング系を開発し、これら修飾物を蛋白傷害の surrogate marker として既存の化合物の再評価を試みた。また、その結果得られたカルボニルストレス阻害作用について、その機序を解析した。

4 カルボニルトラップヒースの臨床応用実験

昨年開発した様々なカルボニル化合物を効率よくトラップするヒースを用い

て実際に腹膜透析液を処理し、カルボニル化合物含有量の変化を調べた。

また、培養細胞を、カルボニルトラップヒースで処理する前の腹膜透析液と、処理した後の腹膜透析液とともに incubation することにより、カルボニルトラップヒースか腹膜透析液の生体適合性に与える影響を調べた。

C 結果と考察

1 glyoxalase I トランスジェニックラットの樹立

7ラインの glyoxalase I トランスジェニックラットが得られ、そのうち最も glyoxalase I 発現の高い1ラインについて解析を行った。その glyoxalase I トランスジェニックラット由来の各種臓器破砕液は、野生型ラットに比し、5-10倍の glyoxalase I 活性を示した。これらのラットは、正常の発育をとけ、行動異常、血液検査の異常、尿検査の異常などを認めなかった。

2 カルボニルストレス消去酵素としてのGLO系の臨床応用実験

GLO-1 のトランスジェニックマウスおよびラットでは、種々の臓器において GLO-1 発現の亢進が確認された。カルボニル化合物として methylglyoxal, glyoxal, 3-deoxyglucosone を指標に用い、コントロール動物およびトランスジェニック動物の臓器抽出蛋白とともに incubation し、そのカルボニル化合物の濃度変化を HPLC にて測定したところ、GLO-1 高発現動物の臓器

はカルボニルストレス抑制能を持つことか示された。

また、GLO-1 トランスジェニックマウス、あるいは野生型マウス由来の胸腺細胞、脾臓細胞にカルボニル化合物 (glyoxal, methylglyoxal) を添加し、1 時間後の細胞内シグナル伝達を比較検討したところ、一部のカルボニル化合物誘導性シグナル伝達 (JNK のリン酸化) か、トランスジェニックマウスで抑制されることか示唆された。

3 新たなカルボニルストレス阻害剤スクリーニング方法により見出された新規カルボニルストレス阻害剤の解析

アミノクアニシンや OPB-9195 に代表される第一世代の AGE 阻害剤は効率よく AGEs/ALEs の形成を阻害しカルボニルストレスを軽減するか、カルボニル化合物に対する特異性か高くなく、総てのカルボニル化合物に反応する。このため、生体にとって有害な糖・脂質由来 RCO のみならず生体にとって必要なピリトキサールなどのカルボニル基も捕捉してしまうなどの重大な副作用かあり、臨床試験は実現していない。我々は、これまでのカルボニルストレス阻害剤の評価方法を物理的測定法から蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に在り目し、これら修飾物を蛋白傷害の surrogate marker とすることにより、新たなカルボニルストレス素材剤のスクリーニング系と可能とした。

興味あることに、従来降圧剤として臨床応用されてきたアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) やアンジオテン

シン II 受容体拮抗薬 (ACEI) などか、効率よくカルボニルストレスを抑制することか判明した。また、その作用はカルボニル補足か主てはなく、様々な自動酸化により発生するラシカルの消去あるいは遷移金属イオンをキレートを行い、糖・脂質からのカルボニル化合物の形成を効率よく阻害することによることか分かった。

4 カルボニルトラップヒースの臨床応用実験

カルボニルトラップヒースによる処理は、腹膜透析液中のカルボニル化合物含有量を減少させた。

更に、カルボニル化合物捕捉ヒースにより腹膜透析液の生物学的適合性の向上か得られ、これか腹膜機能低下の改善に有効であることか示された。

D 結論

カルボニルトラップヒース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か認められ、腹膜機能低下の改善に有効であることか示唆された。本研究によって、クルコースヘース透析液のデメリットをカバーすることによる一つの戦略として、CAPD 療法の新しい試みによる提案と更なる可能性を大いに見出したものになった。今後、この研究成果を安全に臨床へフィードバックできるようさらなる検討を続ける。

Glyoxalase 過剰発現マウスの樹立と解析により、生体か本来備えているカルボニル消去システムの高発現か、カルボニルストレスに対して有効な対策となりうることか示された。これの、応用