

20030468

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 南学 正臣
平成16年(2004) 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

5-13

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

14-25

分担研究者 宮田 敏男 東海大学医学部内科 教授

研究課題名

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 助手

序

末期腎不全による透析患者数は急速に増加して23万人となり、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/年の割合で急増している。血液透析療法の進歩で生命予後は世界最高水準に達しているが、長期透析に伴う心血管病変・透析アミロイドーシスなど様々な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、患者の社会復帰を可能にし、医療費の削減に寄与する可能性があるが、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となっている。

近年、これら長期透析合併症の発症機序において、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。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とその蛋白修飾物質(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”という概念として世界に先駆けて提唱し、その腎障害および透析合併症における役割について、先駆的先端的研究を展開してきた。

我々は、本研究期間中に、カルボニルストレス病態生理学から血管・骨を中心とする長期透析合併症の発症進展機序の分子機構を解明し、さらにこれらに基づき、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効率良く除去することなどによる新規透析治療法に繋がる基盤研究の開発を行った。

種々のカルボニル化合物の病態生理学を明らかにする目的で、培養細胞における細胞内シグナル伝達について解析し、透析アミロイドーシスに対するカルボニルストレスの関与、腹膜透析合併症の除水機能不全の進展機構における腹腔内カルボニルストレスの重要性を明らかにした。これと並行し、カルボニルストレス評価系として有用なモデル動物を見出すため、遺伝子改変などの様々な技術を用いて種々の動物モデルを作成、検討、評価し、有用なカルボニルストレスモデル動物を見出した。更に、新たな治療法の開発のため、カルボニルトラップビーズを作製し、カルボニル化合物の吸着効果を示し、また酵素系を利用した斬新なカルボニルストレス除去システムである glyoxalase I の高発現マウスを作成し、解析した。加えて、蛋白修飾物に特異的な化学的定量法を利用し、in vitro の新しいカルボニルストレス評価系を確立し、種々の低分子化合物をスクリーニングすることにより、新たにカルボニルストレス阻害剤を同定、解析し、動物モデルにおける効果を実証した。

本研究の成果により、長期透析合併症におけるカルボニルストレスの関与についての詳細が明らかになるとともに、カルボニル化合物を標的分子とした新規治療の実用化への道が開けた。今後、本研究を発展させることにより、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が期待される。

主任研究者 南学 正臣
(東京大学医学部 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 助手
分担研究者 宮田 敏男 東海大学 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 23 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。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。このような問題に対する解決方法の 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、十分に普及していない。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が急務となっている。

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非酵素的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。本研究は前年度までに、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してきた。本年度はこ

れらの知見に基づいて、これまでの研究で蓄積した材料・技術などを駆使し、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行った。

B. 研究方法

I. カルボニルストレス消去酵素としてのグリオキサラーゼ系の治療応用の検討：

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グリオキサラーゼの解析を行うために我々の樹立したグリオキサラーゼ I のトランスジェニックマウスおよびトランスジェニックラットを検討した。

II. カルボニルストレスモデル動物の確立：

様々な糖尿病モデル動物、腎不全モデル動物、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などの詳細な検討を行い、また各種疾患モデル動物におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義をを検討した。

III. カルボニルトラップビーズの臨床応用の検討：

これまでの研究で作成したカルボニ

ル捕捉ビーズを用いて腹膜透析液を処理し、その影響を調べた。

IV. 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、カルボニル化合物捕捉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および新たな化合物について、HPLC、GC/MSなどを駆使し、蛋白修飾（AGEs/ALEs）抑制化合物の探索を行った。

更に、この結果発見された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、ラジカルの消去、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評価を行った。

V. 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：

カルボニルストレスモデル動物を用い、我々の見出した新しいカルボニルストレス抑制薬が生体においても病態の改善に有効であるかどうかを検討した。

（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グリオキサラーゼ系の治療応用の検討：

グリオキサラーゼ-1のトランスジェニックマウスおよびラットでは、グリオキサラーゼ-1発現の亢進が認められ、これに伴いカルボニルストレスに対する抵抗性が高まっていることが示された。

II. カルボニルストレスモデル動物の確立：

今後カルボニルストレス阻害剤の効果の評価する上で、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。本研究の過程で作成された遺伝子改変動物であるメグシントランスジェニックラットは、世界で初めての腎臓でセルピノパシーを発症し腎不全に至るモデル動物となることを見出された。また、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が、高いカルボニルストレスを呈し、カルボニルストレスモデル動物として最適であることが示された。

III. カルボニルトラップビーズの臨床応用の検討：

カルボニル捕捉ビーズを用いて処理した腹膜透析液では、カルボニルストレスが抑制されるとともに、腹膜機能を維持する作用があることが示された。

IV. 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) などが効率よくカルボニルストレスを抑制することが分かった。また、その作用は、従来のカルボニル抑制薬の機序であった AGEs/ALEs の前駆体であるカルボニル捕捉ではなく、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が判明した。このようなカルボニルストレス抑制作用は、カルシウム拮抗薬、ベーター遮断薬などの他の降圧剤には認められなかった。

V. 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：

我々が新たにカルボニルストレス抑制作用を見出したアンジオテンシン受容体拮抗剤は、SHR/NDカルボニルストレスモデル動物におけるカルボニル化合物の蓄積を抑制した。このカルボニル化合物蓄積軽減は、腎障害の改善と高い相関を示した。このような腎保護作用は、カルボニルストレス抑制作用を持たない他の降圧剤では認められなかった。更に、我々の開発した新しいカルボニルストレス抑制薬を、腹膜透析モデル動物の透析液中に添加したところ、腹膜透析液中のカルボニルストレス軽減とともに、腹膜機能の維持効果が認められた。

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、進展メカニズムを明らかにし、それにより得られた知見に基づいて新しい治療法の開発

を行い、ほぼ予定通りに計画が遂行された。

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。

E. 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臨床応用に向ける準備が整った。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。

F. 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した。本研究の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、今後より一層のカルボニルストレスに関する研究が進み、新たな治療薬が臨床応用されることが見込まれる。

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 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のツールとしてのモデル動物を確立し、更に新しいカルボニルストレス抑制剤の開発し、その効果をこ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を評価し、SHR/ND糖尿病性腎症自然発症ラット系統が、カルボニルストレスモデル動物として有用であることを示し、詳細な解析を行った。また、分担研究者の宮田らが開発した新しいカルボニルストレス抑制剤としてのアンジオテンシン受容体拮抗剤をSHR/NDラットに投与し、これがカルボニル化合物の蓄積を抑制するとともに、糖尿病性腎症の組織学的改善と蛋白尿の軽減を引き起こした。

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が期待される。

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

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

宮崎正信
長崎大学医学部内科
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的のみならず、社会的、医療経済的にも重大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”という概念として世界に先駆けて提唱し、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。

本研究では、我々はカルボニルストレスモデル動物の確立であるが、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することにより見出したカルボニルストレスモデル動物に対し、分担研究者の宮田の発見した新規カルボニルストレス阻害薬を投与し、その効果を検討した、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いた。

B. 研究方法

アンジオテンシン受容体拮抗剤、 β 遮断薬、ヒドララジンなどの降圧剤を、カルボニルストレスモデル動物であ

る SHR/ND ラットに 13 週齢より 20 週間連日投与し、その効果を解析した。カルボ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。腎障害に対する治療効果については、蛋白尿の測定、PAS 染色による病理組織学的評価、様々な障害マーカーの免疫組織染色などによって行った。

C. 研究結果と考察

免疫組織染色および生化学的定量法により評価されたカルボニルストレス阻害効果は、アンジオテンシン受容体拮抗剤が優れていた。このような効果は、 β 遮断薬などでは認められなかった。このカルボニルストレス抑制効果は、腎障害の組織学的改善と蛋白尿の減少と高い相関を示した。

従来、アンジオテンシン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、カルボニルストレスに対する治療の有効性を示すのみならず、アンジオテンシン受容体拮抗剤が血行動態を介する機序以外に、カルボニルストレスを軽減することにより腎保護作用を呈している可能性を示している。

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が期待される。また近年カルボ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が示唆されており、更これらの他分野の疾患群の病態解明・治療法

開発にも貢献することが期待される。

E. 研究発表

[原著・総説] - 国外

1. 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** 2003; 63: 331-339.
2. **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** 2003; 14: 1212-1222.
3. **Nangaku M**: Complement regulatory proteins: Are they important in disease? **J Am Soc Nephrol** 2003; 14: 2411-2413.
4. 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** 2003; 42: 31-38.
5. 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** 2003; 14: 1825-1832.
6. Inagi R, **Nangaku M**, Miyata T, Kurokawa K: Mesangial cell-predominant functional gene, megsin. **Clin Exp Nephrol** 2003; 7: 87-92.
7. Tanaka T, Hanafusa N, Ingelfinger JR, Ohse T, Fujita T, **Nangaku M**: Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF-1-mediated upregulation of Bax. **Biochem Biophys Res Commun.** 2003; 309: 222-231.
8. Takaki J, 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** 2003; 41: 833-839.
9. Tanaka T, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Adler S, Fujita T, **Nangaku M**: Hypoxia-induced apoptosis in cultured glomerular endothelial cells – involvement of mitochondrial pathways. **Kidney Int** 2003; 64: 2020-2032.
10. Saito T, Ishida J, Takimoto-Ohnishi E, Takamine S, Shimizu T, Sugaya T, Kato H, Matsuoka T, **Nangaku M**, Kon Y, Sugiyama F, Yagami KI, Fukamizu A: An essential role for angiotensin II Type 1a receptor in pregnancy-associated hypertension with intrauterine growth retardation. **FASEB J.** 2003 Dec 19 [Epub ahead

- of print].
11. Shimamoto Y, Ishida J, Yamagata K, Saito T, Kato H, Matsuoka T, Hirota K, Daitoku H, **Nangaku M**, Yamagata K, Fujii H, Takeda J, Fukamizu A: Inhibitory effect of small heterodimer partner on hepatocyte nuclear factor 4 mediates bile acid-induced repression of human angiotensinogen gene. **J Biol Chem**. 2003 Dec 12 [Epub ahead of print].
 12. Sai K, Ishibashi Y, Oota N, Muto S, Kitamura T, Takara Y, Kido M, **Nangaku M**, Nakao A, Fujita T: Treatment of subcutaneous dialysate leak with polidocanol: case report. **Peritoneal Dial Int** 2004; 24, .
 13. Onogi H, Miyata T, Inagi R, **Nangaku M**, Kurokawa K: Serpin, megsin and plasmin. **Contrib Nephrol** 2004; 141: 212-220.
 14. **Nangaku M**: Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney. **Intern Med** 2004; 43: 9-17.
 15. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR, **Nangaku M**: Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. **Kidney Int** 2004; 65: 871-880.
 16. Kurokawa K, **Nangaku M**, Saito A, Inagi R, Miyata T: Future perspectives of chronic renal failure. **Am J Kidney Dis** *in press*.
 17. **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*.
 18. Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Fujita T, **Nangaku M**: Hypoperfusion of peritubular capillaries induced chronic hypoxia prior to progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol** *in press*
 19. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, **Nangaku M**: Evidence of tubular hypoxia in the early phase of remnant kidney. **J Am Soc Nephrol** *in press*
 20. Yamada K, Miwa T, Liu J, **Nangaku M**, Song WC: Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59. **J Immunol** *in press*
 21. Ohse T, Ota T, Niamh K, Godson C, Yamada K, Tanaka T, Fujita T, **Nangaku M**: Modulation of interferon-induced genes by lipoxin analogue in anti-GBM nephritis. **J Am Soc Nephrol** *in press*
 22. Onogi H, Inagi R, **Nangaku M**, Ueda Y, Miyata T, Kurokawa K: Accelerated glomerular injury in hemi-nephrectomized transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin. **Nephron Exp Nephrol** *in press*
 23. Inagi R, Miyata T, **Nangaku M**, Usuda N, Shimizu A, Izuhara Y, Onogi H, Ueda Y, Nakazato K, Oishi H, Takahashi S, Yamamoto M, van

- Ypersele de Strihou C, Kurokawa K:
A novel serpinopathy in rat kidney
and pancreas induced by
overexpression of meginin. **Am J
Pathol in press**
24. Izuhara Y, Miyata T, Inagi R, Ueda N,
Nangaku M, Kurokawa K:
Ultrapure dialysate decreases plasma
pentosidine, a marker of "carbonyl
stress". **Am J Kidney Dis in press**
25. **Nangaku M**: Hypoxia and
tubulointerstitial injury. **Nephron
Exp Nephrol in press**

[原著・総説] -国内-

1. 山本徳則、藤澤正人、野入英世、
南学正臣、藤田喜久、片岡則之、
戸村裕一、小笠原康夫、絹川常郎、
服部良平、小野佳成、大島伸一：
小児難治性腎不全に対する自己臍
帯静脈血管内皮細胞移植治療—臍
帯血由来細胞の移植、再生医療へ
の活用の考察—。西日泌尿 65,
427-432, 2003
2. **南学正臣**：急性腎炎症候群。今日
の治療指針 2005 年度版, 医学
書院 in press
3. 西裕志、**南学正臣**：腎不全の進行
阻止のための治療。治療学 in
press
4. 孫大輔、**南学正臣**：「講義録 腎臓
学」、メディカルビュー社 in press
5. 田中哲洋、**南学正臣**：間質・尿細
管障害と制御因子。日内会誌 92,
2042-2046, 2003
6. Krissanapong Manotham、**南学正
臣**：腎障害進展と尿細管間質障害。
Bio Clinica 18, 786-791, 2003

7. 太田樹、**南学正臣**：【腎機能が低下
した患者の受け持ちになるとき】
腎障害はどのように進行するか?
基礎編。臨床医 29: 1503-1510,
2003
8. **南学正臣**：尿細管間質障害機序
蛋白尿と慢性虚血。腎と透析 54:
201-204, 2003
9. **南学正臣**：糖尿病性腎症。Medico 34,
326-328, 2003
10. 宮田敏男、上田裕彦、**南学正臣**：
疾患・老化と酸化・カルボニルス
トレス：蛋白修飾研究の新たな展
開。日老会誌 40, 348-351, 2003
11. **南学正臣**、稲城玲子、宮田敏男：
メサンギウムに特異的に発現する
分子の同定。小児内科 35, 926-927,
2003
12. **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
13. 石川直愛、**南学正臣**、宮田敏男：
慢性腎不全におけるカルボニル/
酸化ストレス：蛋白修飾研究から
の知見。腎と透析 54, 729-733,
2003

[学会発表] -国外-

1. World Congress of Nephrology :
Proteinuria and tubulointerstitial
damage (Berlin) 6.8-12
2. Toshio Miyata, **Masaomi Nangaku**,
Naoyoshi Ishikawa, Reiko Inagi,
Yasuhiko Ueda, Charles van Ypersele
de Strihou, Kiyoshi Kurokawa:
Renoprotection of Anti-Hypertensive
Agents Is Associated with Inhibition
of Advanced Glycation End Product
(AGE) Formation. American Society

- of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
3. Koei Yamada, Takashi Miwa, Jianuo Liu, Colin Funk, John D. Lambiris, **Masaomi Nangaku**, Wenchao Song: Time-Dependent Involvement of Complement and Leukotriene Pathways in a Mouse Model of Renal Ischemia Reperfusion Injury. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 4. Jing Shao, Toshio Miyata, Reiko Inagi, Koei Yamada, Kiyoshi Kurokawa, Tatsuru Ota, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: Angiotensin II Receptor Blockers Ameliorate Imbalance of T-Cell Subsets in Hypertensive Tubulointerstitial Disease. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 5. Tetsuhiro Tanaka, Toshio Miyata, Reiko Inagi, Kiyoshi Kurokawa, Stephen Adler, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 6. Krissanapong Manotham, Tetsuhiro Tanaka, Toshio Miyata, Reigo Inagi, Kiyoshi Kurokawa, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: Evidence of Tubular Hypoxia in the Early Phase of Remnant Kidney: The Other Part of Hemodynamic Maladaptation. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 7. Tetsuhiro Tanaka, Norio Hanafusa, Julie R. Ingelfinger, Takamoto Ohse, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: Hypoxia Induces Apoptosis in SV40-Immortalized Rat Proximal Tubular Cells through the Mitochondrial Pathways, Devoid of HIF-1-Mediated Upregulation of Bax. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 8. Krissanapong Manotham, Tetsuhiro Tanaka, Makiko Matsumoto, Takamoto Ohse, Reiko Inagi, Toshio Miyata, Kiyoshi Kurokawa, Toshiro Fujita, Julie R. Ingelfinger, **Masaomi Nangaku**: Transdifferentiation of Tubular Cells Induced by Hypoxia.
 9. Makiko Matsumoto, Yuichi Makino, Tetsuhiro Tanaka, Hirotooshi Tanaka, Nobuhiro Ishizaka, Eisei Noiri, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: Pre-Induction of Renoprotective Gene Expression by Cobalt Ameliorates Renal Ischemic Injury Via HIF Signaling Activation. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 10. Makiko Matsumoto, Tetsuhiro Tanaka, Eisei Noiri, Krissanapong Manotham, Tokunori Yamamoto, Toshio Miyata, Reiko Inagi, Kiyoshi Kurokawa, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: Chronic Hypoxia in the Tubulointerstitium Preceded Tubulointerstitial Damage in a Model of Progressive Renal Disease with Glomerulosclerosis. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 11. Hiroshi Ueyama, Toshio Miyata, Yuko Izuhara, Reiko Inagi, **Masaomi Nangaku**, Satoshi Ogawa, Kiyoshi Kurokawa: Immunohistochemical Demonstration of the Endoplasmic

- Reticulum (ER) Stress in Experimental. Kidney Diseases. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
12. Reiko Inagi, Toshio Miyata, Yuko Izuhara, Hiroshi Onogi, **Masaomi Nangaku**, Kiyoshi Kurokawa: Crucial Roles of the Reactive Site Loop of Megsin as an Inhibitory Serpin. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 13. Yuko Izuhara, Toshio Miyata, Kazuhiro Saito, Akira Saito, **Masaomi Nangaku**, Kiyoshi Kurokawa, Charles van Ypersele de Strihou: Ultrapure Dialysate Decreases Plasma Pentosidine, a Marker of Carbonyl Stress. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 14. Reiko Inagi, Toshio Miyata, **Masaomi Nangaku**, Nobuteru Usuda, Yuko Izuhara, Yasuhiko Ueda, Hiroshi Onogi, Charles van Ypersele de Strihou, Kiyoshi Kurokawa: A Novel Serpinopathy Involving the Kidney and the Pancreas Induced by Overexpression of Megsin, a New Serine Protease Inhibitor (Serpine), in Rats. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 15. Hiroshi Onogi, Toshio Miyata, **Masaomi Nangaku**, Reiko Inagi, William G. Couser, Kiyoshi Kurokawa: Increased Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Glomerular Epithelial Cells (GEC) by Hypoxia, Nitrosative Stress, Abnormal Protein Retention and Calcium Store Depletion within the ER. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 16. **Masaomi Nangaku**, Toshio Miyata, Naoyoshi Ishikawa, Reiko Inagi, Yasuhiko Ueda, Charles van Ypersele de Strihou, Kiyoshi Kurokawa: SHR/NDmc-cp Rat Is a Model of Hypertensive Type 2 Diabetes with Massive Proteinuria and Progressive Glomerular Sclerosis and with an Increase in Advanced Glycation End Product (AGE) Genesis. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 17. Yasuhiko Ueda, Toshio Miyata, Reiko Inagi, **Nangaku Masaomi**, Charles van Ypersele de Strihou, Kiyoshi Kurokawa: Different Mechanisms for Anti-Oxidative Effects of Anti-Hypertensive Agents. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
 18. Takamoto Ohse, Tatsuru Ota, Niamh Kieran, Catherine Godson, Koei Yamada, Tetsuhiro Tanaka, Toshiro Fujita, **Masaomi Nangaku**: Modulation of Interferon-Induced Genes by Lipoxin Analogue in Anti-GBM Nephritis. American Society of Nephrology, 11.12-11.17, San Diego, U.S.A.
- [学会発表] -国内-
1. 「尿細管間質障害からみた腎不全の進展機構と治療に関する Update」

- 日本腎臓学会第46回学術総会イブニングセミナー（東京）5.22-24
2. 「腎不全進行の機序：蛋白尿と虚血」自治医科大学院セミナー（栃木）10.9
 3. 「腎不全における貧血と腎虚血」第13回上越腎疾患・透析療法研究会（新潟）11.9
 4. 「補体と虚血」第17回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー（東京）12.10
 5. "Hypoxia and Progressive Renal Disease" 第5回日本ヨーロッパ腎臓フォーラム（箱根）3.5-7
 6. 第7回九州沖縄腎疾患研究会（福岡）3.6
 7. 静岡県腎不全研究会（静岡）3.14
 8. 崔啓子、石橋由孝、南学正臣、城戸牧子、花房規男、谷口茂夫、高市憲明、後藤淳郎、中尾彰秀、藤田敏郎「透析導入時大球性貧血を呈した腹膜透析患者の1例」第48回日本透析医学会学術集会総会（大阪）2003.6.20-22
 9. Krissanapong Manotham, 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川清, Julie R. Ingelfinger, 南学正臣, 藤田敏郎 "Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia." 第48回日本透析医学会学術集会総会（大阪）2003.6.20-22
 10. 大瀬貴元、太田樹、田中哲洋、Niamh Kieran、Catherine Godson、Hugh R Brady、山田耕永、藤田敏郎、南学正臣「Lipoxin A4 による抗GBM抗体腎炎モデルにおける腎炎抑制効果」第4回東京腎炎・ネフローゼ研究会（東京）2003.7.19
 11. Krissanapong Manotham、田中哲洋、松本真規子、大瀬貴元、宮田敏男、稲城玲子、黒川清、藤田敏郎、南学正臣 "The role of hypoxia in progressive renal disease" 第4回腎不全病態治療研究会（東京）2003.11.29
 12. 稲城玲子、宮田敏男、南学正臣、黒川清「ヒトメグシン高発現ラットは腎臓及び膵臓において小胞体ストレスを伴うセルピノパチーを発症する」第4回腎不全病態治療研究会（東京）2003.11.29
 13. 石川直愛、宮田敏男、南学正臣、黒川清「酸化的蛋白修飾阻害と腎保護」第4回腎不全病態治療研究会（東京）2003.11.29
 14. 稲城玲子、宮田敏男、上山浩、伊豆原優子、小野木博、南学正臣、黒川清「ヒトメグシン高発現ラットにおける腎セルピノパチーは小胞体ストレスを伴う糸球体障害を誘導する」第49回日本透析医学会学術集会総会（神戸）2004.6.18-20

15. 中里清一、宮田敏男、伊豆原優子、
小野木博、南学正臣、黒川清

「メグシン高発現ラットは腎・膵臓
においてセルピノパシーを発症す
る」

第49回日本透析医学会学術集会
総会（神戸）2004.6.18-20

厚生科学研究費補助金（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 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る長期透析合併症の新しい治療法の開発を行ってきた。

本年度の本研究では、新しいカルボニルストレス阻害剤を中心に、臨床応用を目指すための研究を行った。

酵素系の利用として、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グリオキサラーゼⅠの高発現動物がカルボニルストレスに抵抗性を持つことを示した。

また、カルボニル捕捉ビーズを開発し、これを用いて腹膜透析液を処理することで、透析液の生物学的適合性の向上が得られることを示した。

更に、我々の開発した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(ACEI)などが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捕捉が主ではなく、ラジカル消去作用および遷移金属イオンキレート作用によることが判明した。このようなカルボニルストレス抑制作用は、Ca拮抗薬、β遮断薬などの他の降圧剤では認められなかった。

同様に、我々の開発した新規カルボニルストレス阻害剤を、腹膜透析モデル動物の透析液に添加したところ、腹腔内カルボニルストレス軽減とともに腹膜機能保護効果が認められた。

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し、新規カルボニルストレス治療法の臨床応用への展望を開いたものと考えられる。

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応を受けて 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、今では腎不全を始め、動脈硬化、アルツハイマー病、関節リウマチなどの幅広い疾患においてその関与が注目され、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) を形成することが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行っている。

B. 研究方法

1. グリオキサラーゼ I トランスジェニック動物

ヒト グリオキサラーゼ I 遺伝子を高発現するトランスジェニックマウスおよびラットを作成し、トランスジェニック動物の各種臓器のカルボニル消去能を検討した。

2. カルボニルトラップビーズ

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を用いて実際に腹膜透析液を処理し、腹膜透析液の生体適合性に与える影響を調べた。

3. 新規カルボニルストレス阻害剤の in vitro 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、ラジカルの消去能、カルボニル化合物生成抑制能、カルボニル化合物トラップ能、キレート作用などについて検討し、その機序を解析した。

4. 新規カルボニルストレス阻害薬の腹腔内カルボニルストレスに対する効果の検討

我々の開発した新規カルボニルストレス阻害剤を、腹膜透析モデルラットの腹腔内に添加し、その効果を検討した。

C. 結果と考察

1. グリオキサラーゼ I トランスジェニック動物

グリオキサラーゼ I 高発現動物の臓器破砕液は、種々のカルボニル化合物と incubation した場合、野生型のコントロール動物の臓器破砕液に比べ、より高いカルボニル化合物消去能を示した。

2. カルボニルトラップビーズ

カルボニルトラップビーズによる処理は、腹膜透析液中のカルボニル化合物含有量を減少させるとともに、腹膜透析液の生物学的適合性の向上をもたらすことが示された。

3. 新規カルボニルストレス阻害剤の in vitro 解析

アミノグアニジンや OPB-9195 に代表される第一世代の AGE 阻害剤は、カルボニル化合物捕捉がその作用機序であり、総てのカルボニル化合物に反応するため、生体にとって生体にとって必要なピリドキサルなどのカルボニル基も捕捉してしまうという重大な副作用があり、臨床応用は実現しなかった。我々は、新しいカルボニルストレス阻害剤の評価方法を開発するため、蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目し、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阻害剤のスクリーニング系を樹立した。

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) などが、効率よくカルボニルストレスを抑制することが判明した。また、その機序はカルボニル捕捉が主ではなく、様々な自動酸化により発生するラジカルの消去作用あるいは遷移金属イオンのキレート作用によることが分かった。

4. 新規カルボニルストレス阻害薬の腹腔内カルボニルストレスに対する効果の検討

我々の開発した新規カルボニルストレス阻害剤を、腹膜透析モデルラットの腹腔内に添加したところ、効率よく腹腔内カルボニルストレスを抑制するとともに、腹膜機能に対する保護