

総説 (第23回徳島医学会賞受賞論文)

腸管トランスポーターを分子標的とした腎疾患治療法の確立をめざして

菊地 浩子¹⁾, 山本 浩範¹⁾, 田中 更沙¹⁾, 中橋 乙起¹⁾, 桑原 頌治²⁾,
新居 佳孝³⁾, 宮本 賢一²⁾, 竹谷 豊¹⁾, 武田 英二¹⁾

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部医療栄養科学講座臨床栄養学分野,

²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部栄養医学講座分子栄養学分野, ³⁾徳島県立工業技術センター

(平成21年11月13日受付)

(平成21年11月30日受理)

1. はじめに

近年, 糖尿病患者数の増加などの原因も重なり, 慢性腎不全 (Chronic kidney disease:CKD) の患者数や透析患者数の増加が問題となっている。CKD は透析や移植を必要とする末期腎不全 (end-stage kidney disease: ESKD) の危険因子であると同時に, 心血管疾患 (Cardiovascular disease: CVD) の危険因子であることが広く認識されている^{1,2)}。腎臓は, 栄養素の排泄や再吸収に関わり栄養代謝の恒常性維持に重要な役割を担うだけでなく, レニンやエリスロポエチン, 活性型ビタミンDの産生などの内分泌臓器としても重要な臓器であるため, CKD で生じる高血圧症, 骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD), 腎性貧血, 栄養障害などがCKDの危険因子とされている³⁻⁸⁾。腎疾患の治療法には, 腎機能の悪化および合併症を防止する目的で, 食事療法や薬物療法, または併用療法が重要とされており, 特に食事療法においては病態に応じてエネルギー, タンパク, ミネラル, ビタミンなど多種栄養素項目の制限や補給, そして降圧剤や尿毒素吸着剤, リン吸着剤, カリウム吸着剤などの薬物との相互作用を考慮する必要がある⁹⁻¹²⁾。そのため, 特にCKDにおいて腸管での栄養素や薬物の吸収および代謝の変動を把握することが病態治療に重要と考えられる (図1)。本研究では, CKDにおける腸管機能を把握し, 腸管遺伝子を標的とした腎疾患治療法を開発することを目的とし, DNAマイクロアレイ法を用い腎不全ラット腸管遺伝子の網羅的発現プロファイリングを行った。本稿では, その知見について述べたい。

2. 治療標的臓器としての腸管

腸管は栄養素の消化, 吸収, 代謝を担う臓器であるだ

けでなく, 腸管免疫や他臓器の機能調節を行う栄養センサーとしての機能も有している^{13,14)}。そのため, 病態における腸管機能を考慮した治療法は, 治療効果の向上だけでなく副作用などを防ぐことが可能と考えられる。これまでに, CKDでは腸管消化吸収機能が障害されることや^{25,26)}, CKDモデル動物を用いた研究において薬物代謝に関わる遺伝子群 (P450酵素) や栄養素吸収に関連するペプチドトランスポーター (PepT1), 薬物輸送に関連するP糖タンパク (P-gp) および多剤耐性関連タンパク (MRP) の発現変化が報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら, CKDにおける腸管消化吸収機能および腸管遺伝子発現の変動に関する理解は未だ十分でない。

3. 腎不全モデル動物

疾患に対する治療法の開発には, モデル動物を用いた試験が必須であり, これまでに腎不全モデル動物として, アデニンの経口投与により腎臓に2, 8-デヒドロキシア

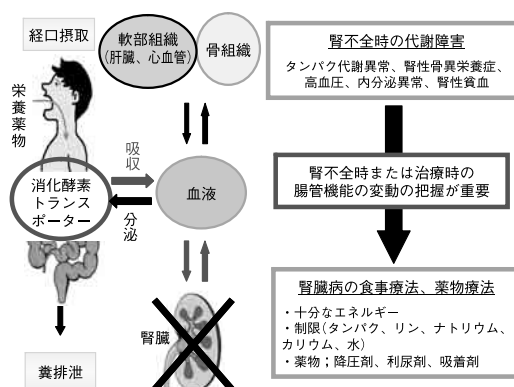


図1 腎不全治療における腸管機能の把握の重要性

デニンとして沈着し、腎機能不全が誘導されるアデニン誘発腎不全ラットおよび5/6または7/8腎摘出により腎機能低下を誘導する部分腎摘出ラットが用いられている¹⁸⁻²¹⁾。本研究では、CKDモデルとしてアデニン誘発腎不全ラットを作成し、血液生化学検査および病理解析を行った。その結果、CKD群ではコントロール群と比して、著しい血中尿素窒素およびクレアチニン、リンの濃度上昇、副甲状腺ホルモン濃度の上昇、活性型ビタミンD濃度の低下を示した。さらに、von kossa 染色により心臓および大動脈血管中膜の石灰化を呈することを確認した(図2)。このように、本研究で作成したアデニン誘発腎不全ラットはヒトにおけるCKDの病態と類似した所見を示した。

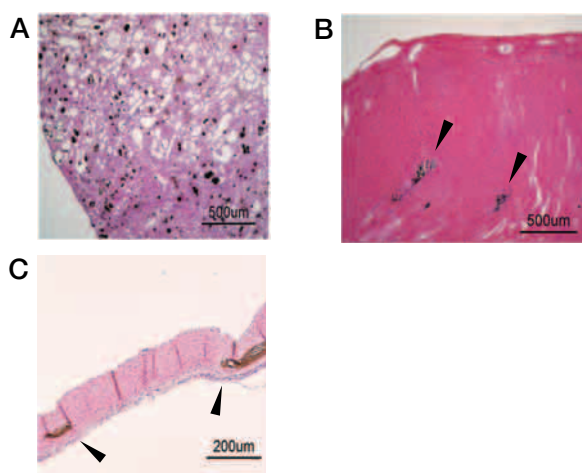


図2 腎不全モデルラットにおける異所性石灰化

各臓器をカルノア液により固定後、パラフィン封理しミクロトームで2mmの切片を作成した。組織の石灰化評価は von kossa 染色により行った。矢印は石灰化部位を示す。A；腎臓，B；心臓，C；大動脈

4. 腎不全モデルラット腸管遺伝子の網羅的発現解析

腎不全モデルラット腸管遺伝子の網羅的発現解析を行うため、CKD群およびコントロール群の腸管より全RNAを抽出し、約27,000種のラット遺伝子を含む Affymetrix rat gene chip を用いマイクロアレイ解析を行った。コントロール群に比しCKD群で発現が2倍以上変化した遺伝子を抽出した結果、コントロール群に比し、CKD群で約400遺伝子の発現が変動した(図3)。さらに、Gene Ontology 解析を行い、遺伝子の機能別に有意に変動する遺伝子群を抽出した。その結果、鉄イオン結合、アルコール代謝、有機酸代謝及び脂質代謝を含む17項目の遺伝子群が有意に変動することが明らかになった。さらに興味深いことに、栄養素トランスポーターとして働く SLC ファミリー遺伝子にはCKD群で約0.2から30倍に変動する遺伝子が多数見出された。

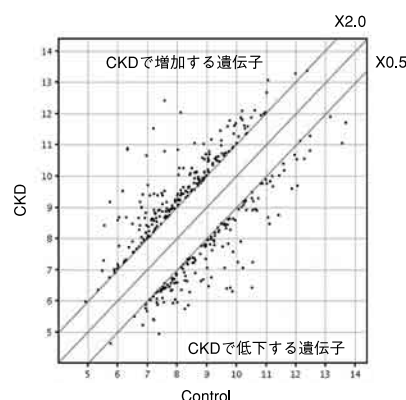


図3 腎不全モデルラット腸管におけるDNAマイクロアレイ解析

CKDおよびコントロールラットの十二指腸粘膜より抽出した全RNAはラットDNA chip (Affimetrix) を用い解析された。CKDの遺伝子発現量はコントロールラットと比較し、2倍以上変動する遺伝子をスカッタープロットで表した。

5. オミックス解析を用いた疾患治療法開発の研究戦略

DNAマイクロアレイ法は組織や細胞における遺伝子のRNA発現量を網羅的に解析する手法であり、疾患原因遺伝子の同定、代謝変動、治療薬の効果など、基礎研究から臨床研究まで幅広くさまざまな研究開発に応用されている^{22,23)}。また、近年、クロマチン免疫沈降法を用いたエピゲノム解析や質量分析法によるタンパク質の同定や代謝産物の高速かつ定量的な同定が可能であり、ゲノミクス、トランスクリプトーム、プロテオミクスおよびメタボロミクス解析を組み合わせた“オミックス”解析が可能になっている^{24,27)}。このことから、疾患モデル動物を用いたオミックス解析により代謝変動や遺伝子発現変動を情報化し、統合データベースを構築し、それらを利用することで疾患関連遺伝子群の同定、発症機構の解明そして特定遺伝子を標的とした新規薬剤、栄養剤の開発が可能と考えられる(図4)。

本研究において、われわれは、DNAマイクロアレイ解析によりCKDモデルラットの腸管では栄養素代謝に関わる腸管遺伝子群、特にトランスポーター遺伝子が多

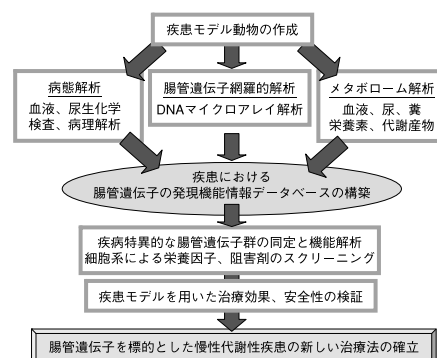


図4 腸管遺伝子を分子標的とした新しい疾患治療法の研究開発

数発現変動していることを明らかにし、これら変動がCKDにおける栄養代謝に影響を及ぼしている可能性を見出した。今後、CKDにおける腸管栄養代謝異常の発症機序を明らかにすると共に、腸管上皮系細胞株を用いたトランスポーター機能や発現制御に関わる因子および阻害剤の探索を行うことで腸管トランスポーターを標的とした治療薬および機能性食品の同定、開発が期待される。また、われわれは、本研究基盤を用いることで栄養療法や薬物療法の疾病に対する有効性及び安全性の検証も可能と考えている。

6. おわりに

本研究は、腎不全時の腸管全体の機能評価を行う統合的データベース構築と腸管遺伝子を分子標的とした新しい治療法の研究開発基盤の確立をめざすことを目的としたものである。さらに、本研究を糖尿病や肝疾患などの生活習慣病に対応させれば、疾患別の腸管遺伝子情報データベースの構築にも展開できるだけでなく、動物モデルの解析に加え、ヒト組織を用いた臨床研究も可能となれば、疾患時における腸管のオミックス解析と栄養療法を融合させ新たな“オミックス栄養療法”の臨床基礎研究領域の創成にもつながると期待している。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言を頂きました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学分野の諸先生方ならびに同講座の皆様は厚く御礼申し上げます。また、腎不全モデル動物の作成、マイクロアレイ解析および糞中ミネラル濃度の測定においてご指導、ご鞭撻頂きました同分子栄養学分野の桑原頌治先生、宮本賢一先生、同総合研究支援センターの堀川秀昌先生、徳島県立工業技術センターの新居佳孝先生に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kaisar, M., Isbel, N., Johnson, D.W.: Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Minerva. Urol. Nefrol.*, 59(3) : 281-297, 2007
- 2) Ikizler, T. A.: Epidemiology of Vascular Disease in Renal Failure. *Blood Purif.*, 20 : 6-10, 2002
- 3) Lea, J., Greene, T., Hebert, L., Lipkowitz, M., *et al.*: The Relationship Between Magnitude of Proteinuria Reduction and Risk of End-stage Renal Disease. *Arch. Intern. Med.*, 165 : 947-953, 2005
- 4) Courtney, A. E., Maxwell, A. P.: Critiques of Clinical Guidelines in Nephrology: Anaemia Nephron Clin. Pract., 110 : 115-125, 2008
- 5) EI-Kishawi, A. M., EI-Nahas, A. M.: Renal Osteodystrophy: Review of the Disease and its Treatment. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.*, 17(3) : 373-382, 2006
- 6) Regidor, D. L., Kopple, J. D., Kovesdy, C. P., Kilpatrick, R. D., *et al.*: Associations between changes in hemoglobin and administered erythropoiesis-stimulating agent and survival in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17(4) : 1181-91, 2006
- 7) Muntner, P., He, J., Astor, B. C., Folsom, A.R., *et al.*: Traditional and Nontraditional Risk Factors Predict Coronary Heart Disease in Chronic Kidney Disease: Results from the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16 : 529-538, 2005
- 8) Ogata, H., Koiwa, F., Kinugasa, E., Akizawa, T.: CKD-MBD: impact on management of kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.*, 11 : 261-268, 2007
- 9) Clinical Practice Guidebook for Diagnosis and Treatment of Chronic Kidney Disease. *Clin. Exp. Nephrol.*, 13 : 187-256, 2009
- 10) Kusano, K., Segawa, H., Ohnishi, R., Fukushima, N., *et al.*: Role of low protein and low phosphorus diet in the progression of chronic kidney disease in uremic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 54(3) : 237-243, 2008
- 11) Mohammed, I. A., Hutchison, A. J.: Phosphate binding therapy in dialysis patients: focus on lanthanum carbonate. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 4(5) : 887-893, 2008
- 12) Fujii, H., Nishijima, F., Goto, S., Sugano, M. *et al.*: Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 24(7) : 2089-95, 2009
- 13) Mason, K. L., Huffnagle, G. B., Noverr, M. C., Kao, J. Y.: Overview of gut immunology. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 635 : 1-14, 2008
- 14) Shimizu, M.: Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*, 21(1-4) : 43- 7, 2004
- 15) Leblond, F.A., Petrucci, M., Dube, P., Bernier, G., *et al.*: Downregulation of Intestinal Cytochrome P450 in Chronic Renal Failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13 : 1579-1585, 2002
- 16) Yuriko, S., Satohiro, M., Kumiko, N., Lin, J., *et al.*: Increased protein level of PEPT1 intestinal H⁺-peptide cotransporter upregulates absorption of glycylsarcosine and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 288 : 664-670, 2005
- 17) Naud, J., Michaud, J., Boisvert, C., Desbiens, K., *et al.*: Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 320(3) : 978-85, 2007

- 18) Katsumata, K., Kusano, K., Hirata, M., Tsunemi, K., *et al.*: Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney International*, **64** : 441-450, 2003
- 19) Tamagaki, K., Yuan, Q., Ohkawa, H., Imazeki, I., *et al.* : Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21** : 651-659, 2006
- 20) Padagas, J., Colloton, M., Shalhoub, V., Kostenuik, P., *et al.* : The receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor osteoprotegerin is a bone-protective agent in a rat model of chronic renal insufficiency and hyperparathyroidism. *Calcif. Tissue Int.*, **78**(1) : 35-44, 2006
- 21) Kazama, J. J., Iwasaki, Y., Yamato, H., Murayama, H., *et al.* : Microfocus computed tomography analysis of early changes in bone microstructure in rats with chronic renal failure. *Nephron. Exp. Nephrol.*, **95**(4) : 152-157, 2003
- 22) Sieberts, S. K., Schadt, E. E. : Moving toward a system genetics view of disease. *Mamm. Genome*, **18** : 389-401, 2007
- 23) Voduc, D., Kenney, C., Nielsen, T. O. : Tissue Microarrays in Clinical Oncology. *Semin. Radiat. Oncol.*, **18** (2) : 89-97, 2008
- 24) Jain, K. K. : Challenges of drug discovery for personalized medicine. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **8**(6) : 487-92, 2006
- 25) Denneberg, T., Lindberg, T., Berg, N.O., Dahlqvist, A. : Morphology, dipeptidases and disaccharidases of small intestinal mucosa in chronic renal failure. *Acta. Med. Scand.*, **195** : 465-470, 1974
- 26) Haines, D. J., Swan, C. H., Green, J. R., Woodley, J. F. : Mucosal peptide hydrolase and brush-border marker enzyme activities in three regions of the small intestine of rats with experimental uraemia. *Clin. Sci. (Lond.)*, **79** : 663-668, 1990
- 27) Park, P. J. : ChIP-seq : advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.*, **10**(10) : 669-80, 2009

The establishment of therapy targeting the intestinal transporter genes for chronic kidney disease

Hiroko Kikuchi¹⁾, Hironori Yamamoto¹⁾, Sarasa Tanaka¹⁾, Otoki Nakahashi¹⁾, Shoji Kuwahara²⁾, Yoshitaka Nii³⁾, Ken-ichi Miyamoto²⁾, Yutaka Taketani¹⁾, and Eiji Takeda¹⁾

¹⁾Department of Clinical Nutrition, and ²⁾Department of Molecular Nutrition, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School ; and ³⁾Food Technology Division, Tokushima Prefecture Industrial Technology Center, Tokushima, Japan

SUMMARY

The understanding of intestinal function in chronic kidney disease (CKD) has been important elements in the clinical management of CKD with dietary and drug therapy. Numerous studies have indicated that CKD patients or model rats have enzymatic abnormalities and impairments of absorptive function in the small intestine. However, it has been still unclear how different of the intestinal function in CKD. In this study, we demonstrated the microarray analysis of global gene expression in intestine of adenine-induced CKD rat. DNA microarray analysis using Affymetrix rat gene chip revealed that CKD caused great changes in gene expression in the rat duodenum : about 400 genes exhibited more than a two-fold change in expression level. Gene ontology analysis showed that a global regulation of genes by CKD involved in iron ion binding, alcoholic, organic acid and lipid metabolism. Furthermore, we found markedly changes of a number of intestinal transporters gene expression. These results suggest that CKD may alter some nutrient metabolism in the small intestine by modifying the expression of specific genes. The intestinal transcriptome database of CKD might be useful to develop the novel drugs or functional foods targeting several intestinal genes including transporters for the management of CKD.

Key words : CKD, intestinal transporter gene, DNA microarray