

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09247

研究課題名(和文) 糖尿病関連代謝性ストレスに対する糸球体足細胞骨格維持機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of maintenance of podocyte cytoskeletal structure against metabolic stress associated with diabetes and Development of novel therapeutic strategies

研究代表者

和田 健彦 (WADA, Takehiko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90447409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、従来の糸球体足細胞傷害研究を基盤として糖尿病に関連する様々な代謝性ストレスが細胞骨格構造を変化させ、蛋白尿を惹起・増悪する機構を明らかにするべく研究を進めてきた。in vitroの系でマウス温度感受性培養糸球体足細胞において酸化ストレス・高グルコースストレス・TGF- $\beta$ 1といった糖尿病関連ストレスに応じた細胞骨格の変化や足細胞関連分子発現の変化を検出した。また、この現象に関連する機序として、細胞周期調節蛋白の発現の変化が観察された。それらに加えて、これらのストレスの消去系として活性型ビタミンDがこれらの経路を介して効果を示すことも見出した。

研究成果の概要(英文)：We have carried out this project to determine the mechanisms of cytoskeletal derangement associated with metabolic stresses in podocytes leading to development and increase of proteinuria. In this project, we observed the changes in cytoskeletal architecture and migration of podocytes in response to several metabolic stress associated with diabetes. Interestingly, we found that altered expression of several cell cycle regulators were associated with those cellular changes. Moreover, our experimental data suggest that vitamin D might have a protective role against diabetic metabolic stresses through these pathways. We hope that novel therapeutic strategies against diabetic kidney disease will be developed by advance in this research project.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糸球体足細胞 蛋白尿 細胞骨格 高グルコース TGF- $\beta$ 1

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、慢性透析患者数は 30 万人に迫る状況であったが現時点においてはさらに約 3 万人増加し、依然として医学的にも医療財政的にも深刻な問題である。1998 年以降、透析導入原疾患として糖尿病性腎症が最多であり(43.8 %)、研究終了時点でも同様である。

研究開始当初までも、糖尿病性腎症における足細胞傷害の重要性については、これまでも注目され多くのグループで精力的に研究が行われてきたが、その分子機序は不明な点が多かった。足細胞の糸球体基底膜からの脱落や細胞死が糸球体硬化の進行に強く関わっていることは足細胞傷害モデル動物を通じた実験やヒト腎生検組織における検討ですでに明らかにされていたため、足細胞の基底膜との結合の変化やアポトーシスの機序を理解することが腎不全進行の病態を理解するために重要と考え、本研究を立案した。

なお、研究代表者は研究開始時までに TGF- $\beta$ 1 の直接的細胞傷害効果に細胞周期調節蛋白 p21 の関与 (Wada T, et al. *Kidney Int* 2005)、p53・Bcl2 関連蛋白による足細胞アポトーシスと、糖質コルチコイドによる阻害機序 (Wada T, et al. *J Am Soc Nephrol* 2005)、この系における MAPK シグナル伝達経路の関与 (Wada T, et al. *Nephron Exp Nephrol* 2008) 赤血球造血刺激因子製剤による足細胞保護作用を介した蛋白尿抑制効果 (Eto N, et al. *Kidney Int* 2007)、cortactin の脱アセチル化と足細胞骨格保持機構 (Motonishi S, et al. *J Am Soc Nephrol* 2014) を報告しており、これらの研究を進展させ、本研究課題に取り組むこととした。

### 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では糖尿病環境下で足細胞にかかる代謝性ストレスが細胞骨格関連分子の局在や機能を変化させる機序を明らかにし、これを利用した新規の蛋白尿・糸球体硬化の治療戦略の開発を行うことを目的とした。

研究開始当初、本研究で明らかにすべき点として以下の項目を立案した。

- ◆ 糖尿病に関連して足細胞内で増強する代謝性ストレス
- ◆ 糖尿病条件下で起こる細胞骨格関連分子の翻訳後修飾状態の変化
- ◆ 糖尿病関連代謝性ストレス下におけるヒストン脱アセチル化酵素活性の変化
- ◆ 細胞骨格関連分子 (例:  $\alpha$ -actinin 4, cortactin) が翻訳後修飾とともに局在の変化と細胞骨格の脆弱性を惹起する機序
- ◆ 代謝性ストレス環境下における翻訳後修飾の異常に対する治療的介入の可能性: 翻訳後修飾の変化により細胞骨格・スリット膜の状態を変化させることが

できるか?

### 3. 研究の方法

本研究課題では糖尿病性腎症において腎臓にかかる代謝性ストレスが足細胞骨格異常をきたして蛋白尿・糸球体硬化に至る機序を、特に翻訳後修飾の観点から詳細に解析し、その機序を制御することによる新規治療法の基盤を構築することを目指した。具体的には以下について検討を行った。なお、研究途中より、ビタミン D の足細胞保護作用に着目した実験を開始した。

- (1) 培養細胞: 研究代表者が米国・ワシントン大学留学中に Stuart J. Shankland 教授とともに確立したマウス温度感受性培養糸球体足細胞を使用した。この温度感受性培養糸球体足細胞は、特定の培養条件下(分化条件)では増殖が停止し、特徴的な突起形成・足細胞関連蛋白発現が観察されるようになるという特徴を有する。
- (2) 動物: 動物モデルとして糖尿病モデルとして確立している streptozotocin 投与マウスを使用した。C57BL6 マウス(雄・5 週齢)に対して 250mg/kgBW で streptozotocin を投与し、投与 7 日後の血糖が 400mg/dL を超えるものを糖尿病モデル動物として使用した。研究の途中より、ビタミン D が足細胞保護作用を有する可能性についての検討を行うため、活性型ビタミン D2 アナログである paricalcitol を 3 種類の用量 (5, 50, 500ng/個体)で STZ 糖尿病誘導 7 日目以降週 3 回腹腔内投与を行った。
- (3) 病理組織学的評価: 腎組織の変化を評価する際には、PAS 染色及び標的分子に関する免疫組織化学的染色を行った。前者はホルマリン固定組織の切片を、後者はホルマリン固定もしくは methyl Carnoy's 固定液による固定組織切片および凍結切片を用いた。
- (4) 遺伝子発現に関する評価: 培養糸球体足細胞を回収し、RNA 抽出キット (RNAqueous RNA purification kit) を用いて total RNA を抽出し、SuperScript III First Strand Synthesis System を用いて cDNA を合成した。それぞれの分子に対して設計されたプライマーとプローブを用いて TaqMan Gene Expression Assays kit を用いて定量 PCR を行った。
- (5) 足細胞の形態学的評価: 生体内における蛋白尿発現機序として重要である可能性のある足細胞の形態学的変化については、突起形成不全(主としてアクチン線維の異常による)や、これに関連する足細胞関連蛋白局在異常について検討を行い評価した。チャンバースライドに培養し種々の介入を行った足細胞を固定した後、アクチン線維を

Phalloidin 染色で検討するとともに、免疫蛍光染色により各種足細胞関連蛋白の発現・局在を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖尿病モデル動物における蛋白尿とその抑制機構に関する検討

- 糖尿病モデル動物である streptozotocin マウス (STZ マウス) を作成し、その腎障害について検討を行った。血糖レベルは 500 - 880mg/dL 程度を維持し 12 週後まで観察した。この結果、経時的なアルブミン尿の増加が認められた。なお、活性型ビタミン D の投与により、このアルブミン尿増加が抑制されるとの結果も得られ、また生命予後改善に関する予備データも得られた。

##### (2) 糸球体足細胞における代謝性ストレスが及ぼす変化とその機序に関する検討

- 酸化ストレス: マウス温度感受性不死化糸球体足細胞において、過酸化水素による酸化ストレスによって、phalloidin 染色によるアクチン細胞骨格の変化、足細胞マーカーである WT-1, podocin, CD2AP の発現低下が観察された。また、高強度の酸化ストレスではアポトーシスによる細胞死も惹起された。
- 糖尿病の代謝性ストレスに関連の強い TGF- $\beta$  1 を用いて、足細胞の変化を観察したところ、phalloidin 染色によるアクチン細胞骨格の変化とともに、紡錘形への形態変化が観察された。
- TGF- $\beta$  1 刺激に対する足細胞の分子生物学的変化を検討したところ、CD2AP mRNA の低下が認められた。これと同様に、細胞周期調節蛋白 cyclin B1 や cyclin D1 も mRNA レベルの減少が観察された。一方で、cyclin I や p21 に加えて Wnt1 の mRNA 発現亢進が認められた。
- 活性型ビタミン D による刺激で、足細胞でのビタミン D 受容体 mRNA 発現は増強するが、TGF- $\beta$  1 によってこの増強効果は抑制された。
- 培養液のグルコース濃度を変化させ、高血糖ストレスを観察した実験では、極度の高グルコース環境下で細胞骨格の変化とともに足細胞形態変化が認められた。
- 低酸素環境下における足細胞の反応を観察した実験においては、分化条件での培養によっても、低酸素条件下で培養した足細胞では細胞周期が停止した細胞が通常酸素条件下で培養した細胞に比べて少なく、低酸素条件が足細胞の細胞周期調節に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。
- 以上の結果より、糖尿病に関連する複数のストレスが、それぞれに異なる機序により、最終的にアクチン骨格の変化を伴う形態変化を誘導し、アルブミン尿・蛋白尿を誘

導し得ることが示された。この分子メカニズムとしては、本研究においては、細胞周期調節蛋白の関与が示唆され、過去の報告を考慮すると、その因果関係が存在する可能性が高いと考えられるが、阻害薬や siRNA などを用いた実験で今後検証する必要がある。

- また、この研究から派生した事項として、活性型ビタミン D 製剤による足細胞障害抑制作用を検討しているが、ビタミン D 受容体 mRNA レベルを明らかに上昇させ、ビタミン D 受容体シグナル伝達系路を活性化する可能性が見出された。現在は、このシグナル伝達経路と細胞周期調節因子や Wnt- カテニン系の関係について検討を進めている段階である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

- Ohigashi M, Kobara M, Takahashi T, Toba H, Wada T, Nakata T. Pitavastatin suppresses hyperglycemia-induced podocyte injury via bone morphogenetic protein-7 preservation. Clin Exp Pharmacol Physiol 査読有 2017; 44(3): 378-85. doi: 10.1111/1440-1681.12716.
- Ishimoto Y, Inagi R, Yoshihara D, Kugita M, Nagao S, Shimizu A, Takeda N, Wake M, Honda K, Zhou J, Nangaku M. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Mol Cell Biol. 査読有 2017 doi: 10.1128/MCB.00337-17[Epub ahead of print]
- Okada A, Nangaku M, Jao TM, Maekawa H, Ishimono Y, Kawakami T, Inagi R. D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via GCN2 activation. Sci Rep. 査読有 2017;7(1):11168. doi: 10.1038/s41598-017-11049-8.
- Sugahara M, Tanaka T, Nangaku M. Prolyl hydroxylase domain inhibitors as a novel therapeutic approach against anemia in chronic kidney disease. Kidney Int. 査読有 2017 92(2):306-312.doi: 10.1016/j.kint.2017.02.035.
- Nangaku M, Hirakawa Y, Mimura I, Inagi R, Tanaka T. Epigenetic Changes in the Acute Kidney Injury-to-Chronic Kidney Disease Transition. Nephron. 査読有 2017;137(4):256-259.doi: 10.1159/000476078
- Tanaka S, Tanaka T, Kawakami T, Takano

- H, Sugahara M, Saito H, Higashijima Y, Yamaguchi J, Inagi R, Nangaku M. Vascular adhesion protein-1 enhances neutrophil infiltration by generation of hydrogen peroxide in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 査読有 2017;92(1):154-164. doi: 10.1016/j.kint.2017.01.014
7. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Front Physiol.* 査読有 2017;8:99. doi: 10.3389/fphys.2017.00099
8. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Mechanisms of metabolic memory and renal hypoxia as a therapeutic target in diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig* 査読有 2017;8(3):261-271. doi: 10.1111/jdi.12624
9. Yamaguchi J, Tanaka T, Saito H, Nomura S, Aburatani H, Waki H, Kadowaki T, Nangaku M. Echinomycin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells in a HIF-independent manner. *Sci Rep.* 査読有 2017 26;7(1):6516. doi: 10.1038/s41598-017-06761-4
10. 和田健彦:「ポドサイト病」に対する液性因子研究の現状と展望. 腎と透析 査読無 2017; 82(2): 295-298.
11. 和田健彦:【腎臓学 この一年の進歩】腎炎・ネフローゼ症候群. 日腎会誌 査読無 2017; 59(1). 16-21.
12. Sawada K, Toyoda M, Kaneyama N, Shiraiwa S, Moriya H, Miyatake H, Tanaka E, Yamamoto N, Miyauchi M, Kimura M, Wada T, Fukagawa M. Upregulation of  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin in Podocytes in Early-Stage Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 査読有 2016;2016:9265074. doi: 10.1155/2016/9265074.
13. Hirakawa Y, Hanafusa N, Nangaku M. Correction of Metabolic Alkalosis and Elevated Calcium Levels by Sodium Chloride in a Hemodialysis Patient With Inadequate Chloride Intake. *Ther Apher Dial.* 査読有 2016;20(1):86-7. doi: 10.1111/1744-9987.12335
14. Wada T, Nangaku M. A circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis: the hunt continues. *Clin Kidney J.* 査読有 2015;8(6):708-15. doi: 10.1093/ckj/sfv090
15. Hirahashi J, Hanafusa N, Wada T, Arita M, Hishikawa K, Hayashi M, Nangaku M. Aspirin and Eicosapentaenoic Acid May Arrest Progressive IgA Nephropathy: A Potential Alternative to Immunosuppression. *Intern Med.* 査読有 2015;54(18):2377-82. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4623
16. Okamoto K, Honda K, Doi K, Ishizu T, Katagiri D, Wada T, Tomita K, Ohtake T, Kaneko T, Kobayashi S, Nangaku M, Tokunaga K, Noiri E. Glypican-5 Increases Susceptibility to Nephrotic Damage in Diabetic Kidney. *Am J Pathol.* 査読有 2015; 185(7):1889-98. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.03.025
17. Nangaku M, Mimura I, Yamaguchi J, Higashijima Y, Wada T, Tanaka T. Role of uremic toxins in erythropoiesis-stimulating agent resistance in chronic kidney disease and dialysis patients. *J Ren Nutr.* 査読有 2015;25(2):160-3. doi: 10.1053/j.jrn.2014.10.011
18. Hirakawa Y, Yoshihara T, Kamiya M, Mimura I, Fujikura D, Masuda T, Kikuchi R, Takahashi I, Urano Y, Tobita S, Nangaku M. Quantitating intracellular oxygen tension in vivo by phosphorescence lifetime measurement. *Sci Rep.* 査読有 2015;5:17838.
19. Yamaguchi J, Tanaka T, Eto N, Nangaku M. Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein. *Kidney Int.* 査読有 2015;88(2):262-75. doi: 10.1038/ki.2015.21
20. Higashijima Y, Tanaka T, Yamaguchi J, Tanaka S, Nangaku M. Anti-inflammatory role of DPP-4 inhibitors in a nondiabetic model of glomerular injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 査読有 2015;308(8):F878-87. doi: 10.1152/ajprenal.00590.2014
- 〔学会発表〕(計 2件)
1. 和田健彦. 「ポドサイト病」に対する液性因子研究の現状と展望. 第 110 回腎生理集談会 (2016年9月・東京)
2. 和田健彦. ネフローゼ症候群に対する治療の進歩と課題. よくわかるシリーズ. 第 59 回日本腎臓学会学術総会 (2016年6月・東京)
- 〔図書〕(計 0件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
東海大学腎内分泌代謝内科  
<http://u-tokai-nem.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 健彦 (WADA, Takehiko)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：90447409

### (2) 研究分担者

南学 正臣 (NANGAKU, Masaomi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90311620

稲城 玲子 (INAGI, Reiko)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：50232509

田中 哲洋 (TANAKA, Tetsuhiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90508079

加藤 秀樹 (KATO, Hideki)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90625237

川上 貴久 (KAWAKAMI, Takahisa)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10722093

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )