

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09268

研究課題名(和文)慢性腎臓病における創薬ターゲットとしての内因性リガンドMRP8の役割の検討

研究課題名(英文)The role of MRP8 as a therapeutic target in chronic kidney disease

研究代表者

桑原 孝成 (Kuwabara, Takashige)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：00393356

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)：慢性腎臓病(CKD)は国民の8人に1人の割合で存在し、進行すると透析に至り、さらなる治療法の開発が強く求められる代表的疾患の一つである。我々は糖尿病性腎症をはじめとするCKDにおける慢性炎症の役割について報告してきた。本研究ではCKDの原疾患の中でも重篤なものの一つである半月体形成性腎炎における炎症メディエーターMRP8の役割について検討を行った。その結果、MRP8の主な産生源である骨髄細胞特異的なMRP8の欠損はマクロファージ形質に影響を与えることで、腎炎を軽減できる可能性が示唆された。MRP8という炎症メディエーターが腎炎の新しい治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is one of the most prevalent diseases and leading to the necessity of renal replacement therapy, whose novel therapeutic strategy is eagerly awaited. We have previously reported the role of chronic inflammation in CKD as well as diabetic nephropathy. In this study, we investigated the role of MRP8, one of the inflammatory endogenous ligands, in the crescentic glomerulonephritis. Our results suggested that ablation of MRP8 in myeloid cells ameliorated crescentic glomerulonephritis through affecting macrophage polarity. MRP8 could become as a therapeutic target in glomerulonephritis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性炎症 MRP8 半月体形成性腎炎 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は本邦において1300万人を超え、CKDから透析へ移行する患者数は年間38000人前後を推移しており、生活の質および医療経済などといった面で多大な影響を及ぼしている。その克服は大きな課題であり、RAS阻害を主体とする適切な降圧療法や生活指導などに加えて新しい観点からの治療法開発が望まれている。内因性リガンドと病原体センサー間の相互作用による慢性炎症(自然炎症)は生活習慣病やガンなど現代病の発症に重要であることが明らかされつつある中で(Donath MY. Nat Rev Immunol 2011)、腎臓における役割は不明であった。我々は自然炎症に重要な役割を果たすTLR4が糖尿病性腎症の進展に重要であることを明らかにし、TLR4の強力な内因性リガンドの一つであるMRP8がその病態に重要な可性を報告した(Kuwabara T. Diabetologia 2012)。MRP8の主要産生細胞はマクロファージ(Mφ)を主体とする炎症細胞であり、様々な機序が糖脂肪毒性によるMRP8発現誘導に関わっていることが明らかとなっている(Kuwabara T. Clin Exp Nephrol 2014)。1型糖尿病患者において、末梢血白血球MRP8発現が腎症を含む種々の臓器合併症のリスクと関わる最上位の分子であることも報告されている(Jin Y. Diabetes Care 2013)。

一方、これらの検討の中で糖尿病高脂血症合併モデルマウス腎組織に浸潤したMφを系球体とそれ以外に分けてMRP8陽性率を計測したところ、明らかに系球体浸潤MφのMRP8陽性率が高い現象を観察していた。このことはMRP8が糖脂肪毒性によって全身性に発現誘導されるだけでは説明がつかず、系球体でMRP8発現を促進する何らかの機序を考慮すべきであることを示唆している。さらに系球体優位なMRP8発現がヒト糖尿病性腎症腎組織でも認められることを報告(Kuwabara T. PLoS One 2014)、ヒトANCA関連腎炎でも同様の傾向が報告されている(Pepper RJ. Kidney Int 2013)。

このように疾患あるいは組織特異的に増加する内因性リガンドMRP8を治療標的とする新しい概念は腎疾患治療薬としても有用な可能性があり、本分子をターゲットとした創薬が期待される。実際、同様の創薬コンセプトで近年実用化に至った例(Denosumab, 抗RANKL抗体)もある。

2. 研究の目的

内因性リガンドMRP8が慢性腎臓病進展に果たす役割を明らかにすることで、創薬ターゲットあるいは病態反映マーカーとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 半月体形成性系球体腎炎モデルにおいて骨髄細胞特異的MRP8欠損(MyMRP8KO)マウ

スを用いた系球体障害進展に果たすMRP8の役割の検討

(2) MyMRP8KOマウスから作成したMRP8欠損Mφを用いた系球体内細胞間クロストークに果たすMRP8の役割の検討

4. 研究成果

(1) 半月体形成性系球体腎炎モデルにおいて骨髄細胞特異的MRP8欠損(MyMRP8KO)マウスを用いた系球体障害進展に果たすMRP8の役割の検討

Nephrotoxic serum (NTS: rabbit IgG)により、半月体形成性腎炎を誘導したところ、controlと比較してMyMRP8KOマウスでは半月体部分のMRP8陽性シグナルの抑制および尿蛋白の減少が認められた(図1)。

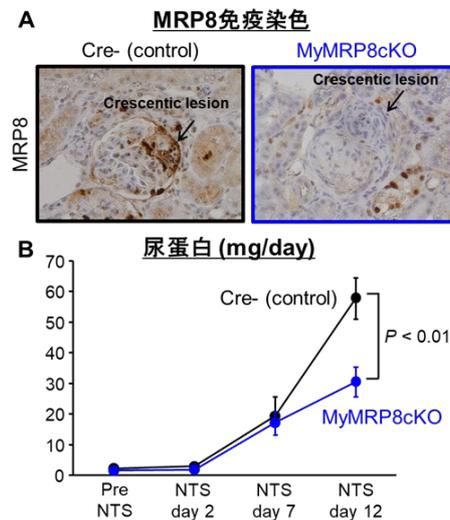


図1: 半月体形成性腎炎モデルにおけるMRP8免疫染色、尿蛋白の検討

骨髄系細胞特異的MRP8 cKOマウスでは半月体部分のMRP8陽性細胞の集積が抑制される(A)と同時に尿蛋白が有意に軽減していた(B)。

また、Masson's Trichrome染色で赤色に認められる滲出性病変(図2)、そして腎組織における炎症性遺伝子発現、NFκBシグナルなどの抑制も確認された(図3)。

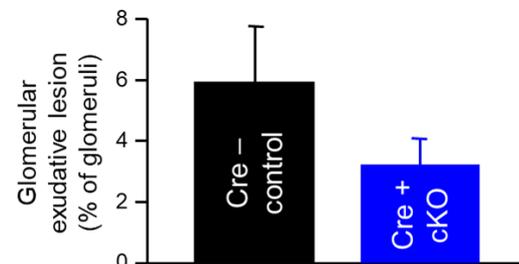


図2: Masson's Trichrome染色による滲出性病変の定量的検討

Cre+MyMRP8KOマウスでは滲出性病変の抑制傾向が認められた。

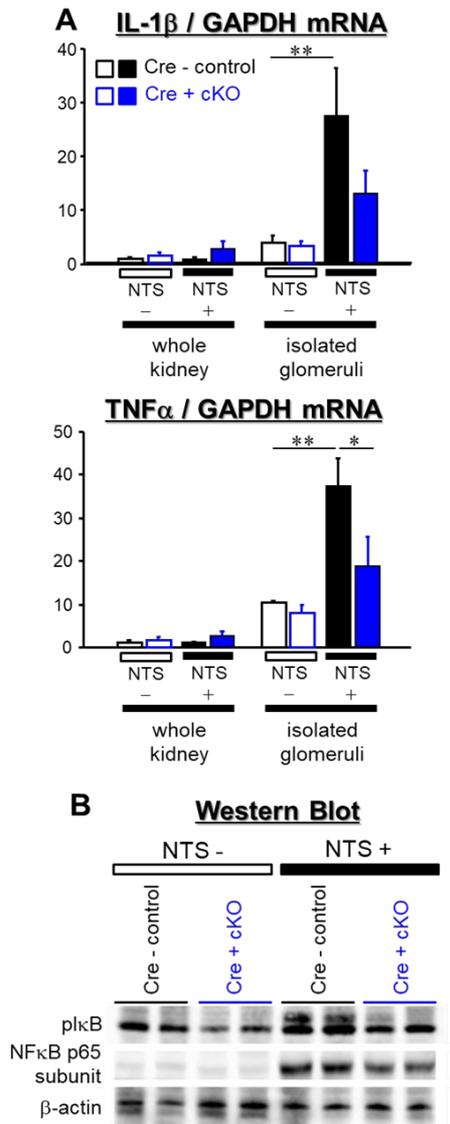


図3:腎組織における炎症性サイトカイン遺伝子発現およびNF κ Bシグナルの検討 (A) NTS投与により認められるIL- β , TNF α mRNA発現増加は、特に単離糸球体分画においてCre+, MyMRP8KOマウスで抑制が認められた。(B) NTS投与により認められるリン酸化I κ Bおよびp65蛋白の増加はCre+, MyMRP8KOマウスで抑制が認められた。

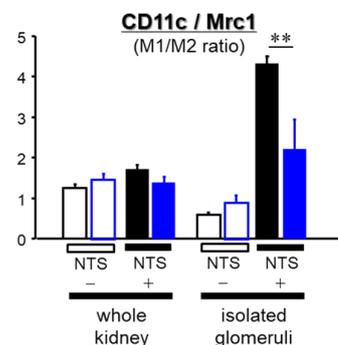


図4:腎組織におけるマクロファージM1/M2比の検討 NTS投与により認められる単離糸球体分画のCD11c/Mrc1 ratio (M1/M2 ratio)の上昇は、MyMRP8KOマウスで抑制されていた。

腎組織におけるマクロファージ浸潤について評価を行ったが、control, MyMRP8KO マウス間で F4/80 mRNA 発現に有意な差を認めなかったが、CD11c/Mrc1 による M1/M2 比の検討を行ったところ、MyMRP8KO マウスでは糸球体においてM1/M2比の抑制が認められた(図4)。

(2) MyMRP8KO マウスから作成した MRP8 欠損 M ϕ を用いた糸球体内細胞間クロストークに果たす MRP8 の役割の検討

前半のマウスを用いた検討において、骨髄細胞特異的な MRP8 の欠損が半月体形成性腎炎を軽減、M1 優位な浸潤マクロファージ形質に影響している可能性が示唆された。MRP8 欠損がマクロファージ形質に与える影響を確認する目的で、control および MyMRP8KO マウスの骨髄を採取、マクロファージへ分化誘導し(BMDM)、in vitro での検討を行った。我々はこれまでの検討により、メサンギウム細胞培養上清(Mes-sup)がマクロファージの MRP8 および炎症性サイトカイン遺伝子発現を強く誘導することを確認していたため、BMDM に Mes-sup 刺激を行い、MRP8 欠損による効果を検討した。その結果、Mes-sup 刺激により上昇する M1/M2 比は MyMRP8KO マウスから作成した MRP8 欠損 BMDM で抑制傾向を認めた(図5)。

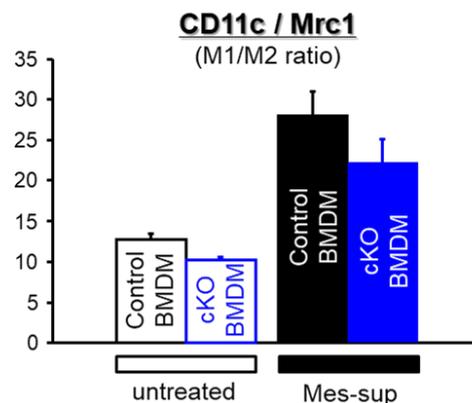


図4: マクロファージのMRP8欠損がマクロファージ形質変化に与える影響の検討。ControlおよびMyMRP8KOマウスの骨髄からマクロファージを分化誘導(BMDM)、メサンギウム培養上清(Mes-sup)刺激を行い、M1/M2比を検討した。MRP8欠損BMDMはMes-sup刺激によるM1/M2比の上昇を抑制する傾向が認められた。

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13件)

- 1) Miyasato Y, Yoshizawa T, Sato Y, Nakagawa T, Miyasato Y, Kakizoe Y,

- Kuwabara T**, Adachi M, Ianni A, Braun T, Komohara Y, Mukoyama M, Yamagata K. Sirtuin 7 Deficiency Ameliorates Cisplatin-induced Acute Kidney Injury Through Regulation of the Inflammatory Response. *Sci Rep*. 2018 Apr 12;8(1):5927.
- 2) Ishii A, Katsuura G, Imamaki H, Kimura H, Mori KP, **Kuwabara T**, Kasahara M, Yokoi H, Ohinata K, Kawanishi T, Tsuchida J, Nakamoto Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Obesity-promoting and anti-thermogenic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in mice. *Sci Rep*. 2017 Nov 14;7(1):15501.
 - 3) Guan Y, Nakano D, Zhang Y, Li L, Liu W, Nishida M, **Kuwabara T**, Morishita A, Hitomi H, Mori K, Mukoyama M, Masaki T, Hirano K, Nishiyama A. A protease-activated receptor-1 antagonist protects against podocyte injury in a mouse model of nephropathy. *J Pharmacol Sci*. 2017 Sep 14. pii: S1347-8613(17)30128-7.
 - 4) Izumi Y, Inoue H, Nakayama Y, Eguchi K, Yasuoka Y, Matsuo N, Nonoguchi H, Kakizoe Y, **Kuwabara T**, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells in the renal collecting duct. *PLoS One*. 2017 Aug 31;12(8):e0184185.
 - 5) Kato Y, Mori K, Kasahara M, Osaki K, Ishii A, Mori KP, Toda N, Ohno S, **Kuwabara T**, Tokudome T, Kishimoto I, Saleem MA, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Sci Rep*. 2017 Apr 21;7:46624.
 - 6) Toda N, Mori K, Kasahara M, Ishii A, Koga K, Ohno S, Mori KP, Kato Y, Osaki K, **Kuwabara T**, Kojima K, Taura D, Sone M, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Crucial Role of Mesangial Cell-derived Connective Tissue Growth Factor in a Mouse Model of Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis. *Sci Rep*. 2017 13;7:42114.
 - 7) Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, **Kuwabara T**, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Kuwahara K, Endo T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):278-289.
 - 8) Iwashita Y, **Kuwabara T**, Hayata M, Kakizoe Y, Izumi Y, Iiyama J, Kitamura K, Mukoyama M. Mild systemic thermal therapy ameliorates renal dysfunction in a rodent model of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310 (11): F1206-15
 - 9) Ohno S, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwahara K, Fujikura J, Naito M, **Kuwabara T**, Imamaki H, Ishii A, Saleem MA, Numata T, Mori Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. Ablation of the N-type calcium channel ameliorates diabetic nephropathy with improved glycemic control and reduced blood pressure. *Sci Rep*. 2016 7;6:27192.
 - 10) Yoshimura Y, **Kuwabara T**, Shiraishi N, Kakizoe Y, Tasaki M, Obayashi K, Ando Y, Mukoyama M. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy found with abnormal urinalysis at a general health checkup. *Nephrology* 2016 ;21(4):341-2.
 - 11) Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, **Kuwabara T**, Mori KP, Kato Y, Kuwahara T, Satoh M, Nakatani K, Saito Y, Tomosugi N, Sugawara A, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Mori K. Low Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Level as a Marker of Malnutrition in Maintenance Hemodialysis Patients. *PLoS One* 10;10(7):e0132539, 2015
 - 12) Koga K, Yokoi H, Mori K, Kasahara K, **Kuwabara T**, Imamaki H, Ishii A, Mori KP, Kato Y, Ohno S, Toda N, Saleem MA, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. MicroRNA-26a inhibits TGF- β -induced extracellular matrix expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in diabetic nephropathy. *Diabetologia* 58:2169-80, 2015.

- 13) Nakano D, Doi K, Kitamura H, **Kuwabara T**, Mori K, Mukoyama M, Nishiyama A. Reduction of Tubular Flow Rate as a Mechanism of Oliguria in the Early Phase of Endotoxemia Revealed by Intravital Imaging. *J Am Soc Nephrol*. 26(12):3035-44, 2015.

〔学会発表〕(計8件)

- 1) **栞原孝成**, シンポジウム ポドサイトパチーupdate 「ポドサイトとS100ファミリー分子」第46回日本腎臓学会西部学術大会、2016.10、シーガイアコンベンションセンター(宮崎)
- 2) **栞原孝成**, JES-CVEM 合同シンポジウム 2 腎臓における代謝制御と臓器連関 「糖尿病性腎臓病における腎局所炎症と小胞体ストレス応答障害」第91回日本内分泌学会学術総会、2018.4、シーガイアコンベンションセンター(宮崎)

〔図書〕(計6件)

- 1) 早田学、**栞原孝成**、向山政志：アディポサイトカインと腎障害．腎と透析 78: 541-547, 2015
- 2) **栞原孝成**、向山政志：特集 腎と老化「老化と体液量調節機構」．腎臓内科・泌尿器科 3: 325-328, 2016
- 3) **栞原孝成**、向山政志：主治医として診る高血圧診療「BNP, NT-proBNP」．Medicina 53: 1750-1754, 2016
- 4) **栞原孝成**、向山政志：肥満関連腎臓病．内分泌・糖尿病・代謝内科 43: 291-295, 2016
- 5) 早田学、**栞原孝成**、向山政志：CKD と脂質異常症-脂肪毒性の役割-．最新医学社 2398-2404, 2016
- 6) **栞原孝成**、向山政志：腎疾患研究の最前線「総論：腎疾患研究の最新の話題」．別冊 BIO Clinica 32 (5): 16-17, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumadai-nephrology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栞原 孝成 (Takashige Kuwabara)
熊本大学生命科学研究部 腎臓内科学
講師

研究者番号：00393356