

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09276

研究課題名(和文) 腎疾患におけるウロモジュリンの治療効果

研究課題名(英文) Therapeutic effects of uromodulin in renal diseases

研究代表者

伊與田 雅之 (Iyoda, Masayuki)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：20384365

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)：ウロモジュリン(UMOD)は抗GBM抗体腎炎において抗炎症効果を発揮し、予防効果のみならず治療効果も認められた。この結果は、UMODの新規腎炎治療薬としての可能性を示すものであった。また、UMODの近位尿細管上皮細胞における抗炎症効果を明らかにした。UMODは近位尿細管上皮細胞でSRB-1に結合しp38 MAPK阻害によりTNF- α により誘導されたMCP-1分泌を抑制し、尿細管障害に保護的に作用すると考えられた。さらに、ANCA関連腎炎患者における血清UMODはeGFRと正相関、蛋白尿、血清Cr値と逆相関を示し、重度糸球体病変群の独立した規定因子であることが証明された。

研究成果の概要(英文)： We showed that uromodulin (UMOD) had preventive and therapeutic effects in experimental anti-GBM glomerulonephritis via anti-inflammatory effects. These results suggest that UMOD may be a novel therapeutic strategy for anti-GBM glomerulonephritis. In addition, we found that UMOD binds to SRB-1 in proximal tubular epithelial cells and inhibits TNF- α -induced MCP-1 protein and mRNA expressions via p38 signaling pathway inhibition. These results indicate that UMOD acts protectively against renal tubular injury. Furthermore, we clarified the clinical significance of UMOD in ANCA-associated glomerulonephritis (AAG). A negative correlation between serum UMOD levels and the urinary protein levels as well as serum Cr levels, and positive correlation between serum UMOD levels and eGFR were found. Lower serum UMOD levels predicted severe pathological classes independently of serum Cr levels.

研究分野：腎炎・ネフローゼ

キーワード：ウロモジュリン 抗GBM抗体腎炎 近位尿細管上皮細胞 抗炎症効果 p38 MAPK MCP-1 ANCA関連腎炎

1. 研究開始当初の背景

各種腎炎の発症メカニズムに関して数多くの研究がなされ、解明が進められてきたが、その治療は未だステロイドや免疫抑制薬に頼るところが大きい。より安全で効果の高い新規腎炎治療薬の開発が急務である。Uromodulin (Tamm-Horsfall protein: UMOD) は尿細管由来糖化蛋白質であり、ヘンレループの太い上行脚に発現している。これまで様々な角度から UMOD の生体内での作用が検討されてきたが、一定の見解を得ていない。Hoyerらは、UMODをラットに投与すると、尿細管間質障害を引き起こすことを報告した。ヒト末梢血を用いた *in vitro* の検討では、IFN- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が亢進するとの報告が数多く存在する。*In vivo*においても、UMODがTNF- α などの炎症性サイトカインを惹起し、樹状細胞を活性化することが報告されている。一方で、ヒト末梢血を用いた *in vitro* における実験では、T細胞増殖抑制作用や、炎症性サイトカインや細菌抗原との結合作用が示されている。また、UMODノックアウトマウスと野生型マウスの腎虚血再灌流モデルでは、UMODノックアウトマウスで腎臓の尿細管間質障害が著明に増悪することが報告された。最近では、UMODが *in vitro*でNLRP3インフラマソームを活性化し、炎症・線維化促進作用を持つM1マクロファージにpyroptosisを引き起こし、M2マクロファージへシフトさせる可能性が報告された。しかし、腎疾患モデルにUMODを直接投与し、治療効果を検証した報告は皆無である。また、培養尿細管細胞を使用し、直接的な抗炎症効果を検証した報告も無い。さらに慢性腎臓病(CKD)患者における血清・尿中UMOD (sUMOD・uUMOD)レベルの検討ではeGFRとの正相関が明らかにされているが、他の腎疾患における臨床的な検討は十分になされていない。

2. 研究の目的

(1) 未だ解明されていない糸球体腎炎におけるUMODの作用を詳細に検討し、UMODが糸球体腎炎の新規治療薬となる可能性に関して、ラット半月体形成性糸球体腎炎モデルを使用し探る。

(2) 腎虚血再灌流によるAKIモデルにおいてヘンレループの太い上行脚から分泌されたUMODが間質から近位尿細管S3セグメントへ抗炎症効果を及ぼしている可能性が示唆されており、今回培養近位尿細管細胞を用いてUMODの直接的な抗炎症効果を明らかにする。

(3) 尿中UMODレベルはCKD患者においてeGFRと相関し、尿中UMOD低値はCKD進行のリスク因子と報告されている。今回ANCA関連腎炎(AAG)における血清・尿中UMOD (sUMOD・uUMOD)と臨床病理学的所見との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 計36匹の雌WKYラットを使用し、予防効果はコントロール群(CON)と治療群(UMOD)に分けPBS、UMODを静注、直後にラビット抗ラットGBM抗血清を静注し(Day0)、Day4で検討した。治療効果はDay4に治療開始し、Day10で検討した。投与期間終了後に屠殺前日夕方から翌日まで代謝ケージ内にて採尿後、麻酔下にて血液及び腎臓を摘出し、治療効果を検討した。

(2) ヒト近位尿細管上皮細胞(HK-2)をUMODで前処置し(0, 0.1, 1, 3, and 5 μ g/ml)、細胞傷害性、TNF- α 刺激(10 ng/ml)によるMCP-1、IL-6、IL-8産生やsignaling pathway (MAPK)への影響を *in vitro*でRT-PCR、ELISA、Western blotにより評価した。また、UMOD受容体であるSRB-1の阻害薬acetylated LDLの前処置で、それらの効果が減弱するかを検討した。

(3) 腎生検と施行されAAGと診断された62名のsUMOD・uUMODレベルをELISA (BioVendor, Candler, NC)にて測定し、eGFR、血清クレアチニン(Cr)、蛋白尿、尿中NAG・2MGとの相関関係を検討した。また、糸球体病変でfocal、crescentic、mixed、scleroticの4群に、間質障害でmild、moderate、severeの3群に分け病理学的所見との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) UMODのラット抗GBM抗体腎炎抑制効果を検討した。予防実験では、UMOD群で有意に1)蛋白尿減少(63.65 \pm 10.90 vs. 21.17 \pm 5.81 mg/day, $p < 0.01$) 2)血清Cr値低下(0.29 \pm 0.0061 vs. 0.24 \pm 0.0053 mg/dl, $p < 0.01$) 3)壊死性半月体形成糸球体数減少(% crescentic glomeruli: 59.0 \pm 1.86 vs. 34.83 \pm 1.95 %, $p < 0.001$) 4)糸球体内ED1+(SEM-Q-S for ED1: 1.87 \pm 0.041 vs. 1.58 \pm 0.045 %, $p < 0.001$)、CD8+細胞数減少(6.75 \pm 0.18 vs. 6.18 \pm 0.18, $p < 0.05$) 5)血清MCP-1値低下(72.50 \pm 4.45 vs. 23.17 \pm 4.46 pg/ml, $p < 0.01$)を認めた。治療実験では、UMOD群で有意に1)蛋白尿減少(Day 7, 74.41 \pm 3.71 vs. 59.78 \pm 2.76 mg/day, $p < 0.01$; Day 10, 74.34 \pm 5.60 vs. 50.61 \pm 3.34 mg/day, $p < 0.01$) 2)半月体形成糸球体数減少(% crescentic glomeruli: 68.62 \pm 1.65 vs. 57.43 \pm 0.053 %, $p < 0.001$) 3)糸球体内ED1+細胞数減少を認めた。また、3h後の検討ではUMOD群でIL-6が血中(11.18 \pm 6.17 vs. 1154.91 \pm 726.85 pg/ml, $p < 0.05$)、糸球体内(1.62 \pm 0.37 vs. 37.03 \pm 14.44, $p < 0.05$)ともに著明に上昇し、糸球体内ED1+細胞の減少を認めた(SEM-Q-S for ED1: 1.29 \pm 0.034 vs. 1.10 \pm 0.035 %, $p < 0.001$)。UMODはラットNTS-Nで劇的に蛋白

尿、半月体形成、糸球体内マクロファージ浸潤を抑制した。UMOD による一つの治療機序として抗炎症効果が考えられた。

(2) UMOD の尿細管における抗炎症効果を明らかにした。1)UMOD はヒト近位尿細管上皮細胞(HK-2)においてTNF- 刺激によるMCP-1産生を容量依存的抑制した(ELISA: 24h: 19.26 ± 2.35 vs. 14.09 ± 1.13 vs. 2.99 ± 1.9 , pg/ml, TNF- vs. UMOD ($1 \mu\text{g/ml}$) + TNF- vs. UMOD ($3 \mu\text{g/ml}$) + TNF-) (PCR: 12h: 22.96 ± 3.00 vs. 13.52 ± 0.39 vs. 8.85 ± 1.21 , TNF- vs. UMOD ($1 \mu\text{g/ml}$) + TNF- vs. UMOD ($3 \mu\text{g/ml}$) + TNF-)。2)TNF- 刺激によりMAPK (p38, ERK1/2, JNK)、NF-kBの活性化を認めたが、UMOD 前処置でp38とNF-kBのみ活性化が抑制された。3) UMOD 受容体であるSRB-1の阻害薬 acetylated LDLの前処置で、UMODによるMCP-1産生抑制効果の減弱、p38とNF-kBの活性化抑制阻害を認めた。UMODはHK-2でp38/NF-kB経路阻害によりMCP-1産生を抑制し、尿細管障害に保護的に作用すると考えられた。

(3) AAGにおけるsUMOD・uUMODと臨床病理学的所見との関連を明らかにした。AAG患者62例の検討で、sUMOD値はeGFR ($p=0.0004$, $r=0.44$)、uUMOD値 ($p=0.03$, $r=0.34$)と正相関、蛋白尿($p=0.016$, $r=-0.31$)、血清Cr値 ($p=0.0005$, $r=-0.43$)と逆相関を示した。sUMOD高値群は、有意にfocal群、間質mild群が多く($p<0.0001$)、crescentic群が少なかった($p=0.026$)。10年での累積腎生存率はfocal群と重度糸球体病変群(crescentic, mixed, sclerotic)で有意差を認め($p=0.02$)、Cox比例ハザードモデルの多変量解析にてsUMOD値のみが重度糸球体病変群の独立した規定因子であった($p=0.0008$)。

<引用文献>

Hoyer JR. *Kidney Int.* 17,284-292,1980

Saemann MD, et al. *J Clin Invest* 115,468-475,2005

Hession C, et al. *Science* 18,1479-1484,1987

El-Achkar TM, et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 29, F534-544,2008

Darisipudi MN, et al. *J Am Soc Nephrol.* 23,1783-1789,2012

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0件)

[学会発表](計8件)

橘翔平、伊與田雅之、鈴木泰平、柴田孝則. 培養近位尿細管上皮細胞におけるウロモジュリンの抗炎症効果. 第21回腎間質障害研究会(2017年9月、東京).

Tachibana S, Iyoda M, Suzuki T, Shibata T: Uromodulin inhibits TNF- induced MCP-1 expression in human renal proximal tubular epithelial cells via the inhibition of p38 activation. ERA-EDTA 54th Congress 2017 (May, Madrid).

橘翔平、伊與田雅之、鈴木泰平、柴田孝則. 培養近位尿細管上皮細胞におけるウロモジュリンの抗炎症効果. 第60回日本腎臓学会学術総会(2017年6月、仙台).

鈴木泰平、伊與田雅之、橘翔平、日原桂、井芹健、山本康隆、齋藤友広、和田幸寛、松本啓、柴田孝則. ウロモジュリンのラット抗GBM抗体腎炎抑制効果とそのメカニズムの検討. 第17回東京腎炎・ネフローゼ研究会(2016年7月、東京).

Suzuki T, Iyoda M, Matsumoto K, Wada Y, Yamamoto Y, Saito T, Iseri K, Hihara K, Tachibana S, Shibata T: Uromodulin exerts potent preventive and therapeutic effects in WKY rats with anti-GBM glomerulonephritis via IL-6 activation. ERA-EDTA 53rd Congress 2016 (May, Vienna).

鈴木泰平、伊與田雅之、橘翔平、日原桂、井芹健、山本康隆、齋藤友広、和田幸寛、松本啓、柴田孝則. ウロモジュリンのラット抗GBM抗体腎炎抑制効果とそのメカニズムの検討. 第59回日本腎臓学会学術総会(2016年6月、横浜).

Suzuki T, Iyoda M, Matsumoto K, Wada Y, Yamamoto Y, Saito T, Iseri K, Hihara K, Shibata T: Preventive and therapeutic effects of uromodulin in anti-GBM glomerulonephritis induced in WKY rats. ERA-EDTA 52nd Congress 2015 (May, London).

鈴木泰平、伊與田雅之、日原桂、井芹健、山本康隆、齋藤友広、久野芳裕、和田幸寛、松本啓、柴田孝則. ラット抗GBM抗体腎炎におけるウロモジュリンの予防および治療効果の検討. 第58回日本腎臓学会学術総会(2015年6月、名古屋).

[図書](計2件)

伊與田雅之・橘翔平・鈴木泰平・柴田孝則. ウロモジュリンの腎疾患への関与と新規治療薬としての可能性. *BIO Clinica* 32(5), 88-93, 2017

伊與田雅之・橘翔平・鈴木泰平・柴田孝則. ウロモジュリンの腎疾患への関与と新規治療薬としての可能性. 細胞 49(10), 41-45, 2017

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊與田雅之 (IYODA, Masayuki)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号：20384365

(2) 研究分担者

柴田孝則 (Shibata, Takanori)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：70221299

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()