

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16222

研究課題名(和文) 繊毛病に対するビタミンAの治療効果の検証および治療効果促進の試み

研究課題名(英文) Investigation of therapeutic effect of vitamin A on ciliopathy and promotion of its therapeutic effect

研究代表者

釘田 雅則 (KUGITA, Masanori)

藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究施設・講師

研究者番号：50440681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ネフロン癆(NPH)や多発性嚢胞腎症(PKD)は、繊毛に関連する遺伝子の変異に伴うタンパク質の機能異常が原因で発症するため、繊毛病と呼ばれる。申請者は繊毛病の特徴である嚢胞形成にビタミンAの代謝産物である9-cis retinoic acid(9cRA)をリガンドとするretinoid X receptorが関与しているという知見を得ている。そこで、繊毛病に対する9cRAの病態抑制効果を細胞およびモデル動物を用いて検証した。その結果、繊毛病にのみ効果を示す9cRAの至適濃度範囲が狭いこと、一定量以上の摂取は病態が悪化する可能性があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Nephronophthisis (NPH) and polycystic kidney disease (PKD) stemmed from abnormal function of cilia-related proteins which are coded by the gene including mutation. Therefore they are called ciliopathy. We found that retinoid X receptor (RXR) could relate to cystogenesis is a character of ciliopathy. A ligand of RXR is 9-cis retinoic acid (9cRA) of vitamin A metabolite. Therefore we investigated that the suppression effect of vitamin A on ciliopathy using cells and model animals for ciliopathy. We show that the narrow range of optimal concentration of 9cRA which has effect only on ciliopathy, and ingestion of a large amount of vitamin A could worsen pathological condition of ciliopathy.

研究分野：分子生物学

キーワード：繊毛病 RXR ビタミンA ビタミンK

1. 研究開始当初の背景

ネフロン癆(NPH)や多発性嚢胞腎症(PKD)は、繊毛に関連する遺伝子の変異に伴うタンパク質の機能異常が原因で発症するため、繊毛病と呼ばれる。NPHやPKDは遺伝病であり、その特徴として、腎臓に多数の嚢胞形成、細胞増殖の異常亢進、組織の線維化があげられる。近年、NPHやPKDモデル動物において治療効果が見られた抗利尿阻害薬トルバプタンがヒトPKDの治療薬として世界で初めて認可された。しかしながら、トルバプタンは尿量を著しく増加させるため、トイレのために行動が制限され、生活の質を低下させるという欠点がある。また、適応可能時期も制限されている。

繊毛病は遺伝病であるため、根本的な治療は難しい。そのため、長期的な視野に立ち、栄養学的に繊毛病の病態進行を抑制させる研究が行われている。今までに、イソフラボン、水、ビタミンKに繊毛病の病態抑制効果があることが報告されている。

申請者は、嚢胞形成に関与する新規遺伝子を探索するために、NPHのモデル動物であるCyラットの初期嚢胞腎を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、ビタミンAの代謝産物9-cis retinoic acid(9cRA)をリガンドとする核内受容体retinoid X receptor(RXR)を介した情報伝達経路が嚢胞形成に関与していることが示唆された。また、嚢胞腎においてRXRは嚢胞上皮細胞の核に局在しており、その発現量は正常対照と比べて増加していた。さらに嚢胞腎におけるRXRはリン酸化されていた。同様の結果が別のNPHPモデル動物であるjckマウスやpcyマウス、PKDモデル動物であるPCKラットからも得られた。これらは、RXRが嚢胞形成において重要な役割を担っていることを示唆する。

肝臓の癌細胞では、病変部の核にリン酸化RXRが蓄積するのに対して、その周りの通常細胞の核にはRXRの分解産物が蓄積することが報告されている。そのため、癌細胞の細胞増殖の亢進は、RXRがリン酸化され、分解されなくなることにより、その機能が正常に働くことが原因ではないかと考えられている。実際、RXRのリガンドである9cRAを癌細胞に添加するとRXRの機能が回復し、細胞増殖が抑制される。また、ビタミンKを投与し、RXRのリン酸化を阻害しても細胞増殖は抑制される。さらに、ビタミンAの代謝産物である9cRAとビタミンKの併用は、相乗抑制効果を示すことが報告されている。

嚢胞腎において、RXRの発現量が増加していること、嚢胞上皮細胞の核に局在していること、RXRがリン酸化していること、ビタミンKに病態抑制効果があることは、嚢胞形成機序と癌細胞における細胞増殖亢進機序が類似していることを示唆する。

2. 研究の目的

嚢胞形成機序と癌細胞の増殖機序は類似しており、RXRを介した細胞増殖機序が重要な役割を担っていると考えられる。癌細胞ではビタミンAの代謝産物である9cRAやビタミンKを用いて、栄養学的手法による病態抑制効果が示されている。そのため、繊毛病も癌細胞と同様に栄養学的手法により病態を抑制できる可能性がある。そこで、繊毛病における9cRA単独効果およびビタミンKとの併用効果を不死化細胞およびモデル動物を用いて検証することとした。

3. 研究の方法

市販されているヒトPKD患者の腎臓の嚢胞上皮由来の不死化細胞WT9-12を使用した。WT9-12細胞は、10%FBSを含んだDMEM(High Glucose)もしくはDMEM/Ham's F-12にて継代維持を行った。

飢餓状態にしたWT9-12細胞およびノーマル腎臓細胞に、RXRリガンドとして9cRA、RXRのリン酸化阻害剤としてビタミンK1(phyllloquinone)、ビタミンK2(Menoquinone)、ビタミンK3(Menadione)を単独および併用添加して48時間後の細胞増殖活性をMTT assayにより調べた。また、上記試薬に加え、MEK阻害剤としてU0126、RXRアゴニストとしてBexarotenを単独および併用添加して48時間後の細胞増殖活性をMTT assayにより調べた。上記試薬は各種濃度で組み合わせを行い、最適濃度を検証した。

投与実験には、NPHのモデル動物であるHan-SPRD Cyラットを使用した。Cyラットは当施設にて維持・繁殖が行われた。

一般飼育飼料(MF)、通常の3倍量のビタミンAを添加した飼料(VA3)、通常の6倍量のビタミンAを添加した飼料(VA6)を4週齢から11週齢まで与えた。その後、腎臓、血清を回収した。また、MFおよびVA3を4週齢から20週齢まで与え、腎臓、血清を回収した。腎体重比、嚢胞面積、血清尿素窒素量(SUN)を測定した。

4. 研究成果

WT9-12細胞において、9cRAが細胞増殖を抑制するという知見を得ている。しかしながら、その効果は約9%と弱い。そこで、9cRAの増量による細胞増殖抑制効果を検証した。1, 5, 10, 25, 50 μMの9cRAを添加した結果、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。しかしながら、5 μM以降、ノーマル腎臓細胞においても細胞増殖が抑制され、細胞毒性が懸念された。

9cRAの単独使用には限界があるため、併用による相乗抑制効果を検討することとした。ビタミンKはPKDの病態抑制効果が報告されている。そこで、9cRAとビタミンKの相乗抑制効果を検証することとした。ビタミンKは、K1、K2、K3の3種類に分けられる。ビタミンK3はPKDの病態抑制効果を示すが、副作用も

報告されているため、低濃度での効果を検証する必要がある。また、ビタミン K2 は、癌細胞において病態抑制効果が報告されているため、PKD での病態抑制効果を検証した。ビタミン K1 については、報告がないため、合わせて検証することとした。

ビタミン K3 は 5 μ M にて細胞増殖抑制効果を示したが、ノーマル腎臓細胞においても同様の効果を示すため、細胞毒性が懸念される。2.5 μ M では、細胞増殖抑制効果を示さなかった。そのため、PKD にのみ効果を示すビタミン K3 の至適濃度範囲は狭いと考えられる。ビタミン K1 および K2 は 100 μ M 添加しても細胞増殖抑制効果を示さなかった。ビタミン K1 および K2 と 9cRA を各種組み合わせで併用したが、いずれも相乗抑制効果を示さなかった。

次に栄養素以外の単独および併用の病態抑制効果を検証することとした。MEK 阻害剤 U0126 とビタミン K1 および K2 を併用したが、U0126 の細胞増殖抑制効果は増強されなかった。RXR アゴニストである Bexaroten は 1 μ M から濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示したが、ノーマル腎臓細胞においても同様の効果を示したため、細胞毒性が懸念される。100nM では、細胞増殖抑制効果を示さなかった。そのため、PKD にのみ効果を示す Bexaroten の至適濃度範囲は狭いと考えられる。しかしながら、Bexaroten は皮膚 T 細胞性リンパ腫の治療薬として使われているため、PKD へ転用できる可能性は高いと考えられる。

細胞と生体では反応性が異なるため、それぞれで検証を行う必要がある。9cRA を含むビタミン A の過剰摂取は副作用が報告されている。そこで、1 日に必要な量の 3 倍量 (VA3) と 6 倍量 (VA6) のビタミン A を混ぜた MF を Cy ラットに与え、病態への影響を検証した。

4 週齢から 11 週齢まで投与した結果、通常飼料を与えた MF 群の腎体重比が 2.73 ± 0.17 に対して、VA3 群は 2.31 ± 0.18 、VA6 群は 3.47 ± 0.39 であった。VA3 群において、腎体重比の減少傾向が見られたが、VA6 群では逆に増大傾向がみられた。嚢胞面積は腎体重比の結果と同様の関連性が見られた。腎機能の指標である SUN は、MF 群が 48.0 ± 2.6 に対して、VA3 群では 56.8 ± 5.6 となり、VA3 群において腎機能の悪化傾向が見られた。VA3 の効果を検証するために、投与期間を 4 週齢から 20 週齢まで延長した。その結果、MF 群の腎体重比が 1.78 ± 0.28 に対して、VA3 群は 1.92 ± 0.19 となり、若干の増加傾向が見られた。

11 週齢までの投与において、腎体重比の減少傾向が示されたため、ビタミン A には病態抑制効果があると考えられる。しかしながら、VA6 群や VA3 の 20 週齢投与において、腎体重比の増大傾向がみられることから、一定量以上の摂取は病態を悪化させると考えられる。また、腎機能が回復していないことから、ビタミン A は細胞増殖のみ抑制を行い、嚢胞形成の他の特徴である組織の線維化や嚢胞液

の蓄積には関与していないと考えられる。

本研究では、細胞およびモデル動物を用いて 9cRA を中心とした病態抑制効果を検証してきた。その結果、PKD にのみ効果を示す至適濃度範囲が非常に狭いこと、一定量以上の摂取は病態に悪影響を及ぼす可能性があることを示唆した。9cRA は上記理由により、嚢胞病の治療薬に使用するのは難しい。しかしながら、上記デメリットを減少させた RXR リガンド類似体もしくはアゴニストが癌細胞の治療薬として開発されている。そのため、それらが将来嚢胞病の治療薬に転用されることが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

1. Masanori Kugita, Tamio Yamaguchi, Yoichi Nagamura, Harold M Aukema, Shizuko Nagao. Increased salt intakes dose not deteriorate renal cystic disease progression in high water loaded PCK rats. Kidney week 2016. November 15-20, 2016, Chicago, IL, U.S.A.
2. 吉原大輔、釘田雅則、長尾静子 多発性嚢胞腎症モデル動物の腎臓における RXR の発現と局在 第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 6 月 17 日～19 日、横浜、パシフィコ横浜
3. 釘田雅則、吉原大輔、加藤由布、小木曾昇、下村恭代、西田修、長尾静子 多発性嚢胞腎症モデル動物の腎臓におけるレチノイド X 受容体の解析 第 63 回日本実験動物学会総会 2016 年 5 月 18 日～20 日、川崎、ミュージア川崎シンフォニー
4. 釘田雅則、吉原大輔、田代遥、加藤雅也、長尾静子 嚢胞性腎疾患モデル動物における有用性の比較 第 87 回東海実験動物研究会 2015 年 12 月 12 日、岐阜、岐阜大学
5. Daisuke Yoshihara, Masanori Kugita, Harold M Aukema, Tamio Yamaguchi, Shizuko Nagao. Retinoid X receptor pathway, a novel signaling cascade responsible for cystogenesis in three rodent models of polycystic kidney disease. Kidney week 2015. November 3-8, 2015, San Diego, CA, U.S.A.
6. 釘田雅則、吉原大輔、長尾静子 核内受容体を介した情報伝達経路の解析 第 1 回シーズ・ニーズ発表交流会 2015 年 7 月 23 日、豊明、藤田保健衛生大学
7. Daisuke Yoshihara, Masanori Kugita, Mai Sasaki, Shizuko Nagao. Expression and distribution of retinoid X

receptor in rodent models of polycystic kidney disease. 11th ASPR congress & the 118th annual meeting of the japan pediatric Society. April 15-18, 2015, Osaka, Japan.

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/CAMHD/LAS/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

釘田 雅則 (KUGITA, Masanori)

藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究施設・講師

研究者番号：50440681