

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19451

研究課題名(和文)腎臓における小胞体ストレス応答に関連した甲状腺ホルモン受容体の作用解明

研究課題名(英文)The role of thyroid hormone receptor relating to ER stress response in the kidney.

研究代表者

高橋 和也 (TAKAHASHI, Kazuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：00646135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本邦におけるeGFR60未満の慢性腎臓病(CKD)患者は約1300万人に上るとされる。CKDの悪化により毎年約1万人に新規の透析導入が必要となっており、CKDの根治的治療の開発は急務である。本研究は、リガンド依存性転写因子である内因性甲状腺ホルモン受容体(TR)が有する腎障害抑制作用を明らかにするものであり、TR KOマウスを用いて、片側尿管結紮を行った慢性腎障害モデルにおける小胞体ストレス応答に注目し検討を行った。甲状腺ホルモン受容体が、腎臓の線維化進展に抑制的な作用を有していることを示唆する結果が得られ、現在その作用機序の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：There are 13 million chronic kidney disease (CKD) patients and ten thousand of them are required to start dialysis treatment every year in Japan. There is a need to develop curative treatments of CKD. This study was made to reveal the effects of endogenous thyroid hormone receptor (TR) on the progression of CKD. Therefore we focused on the endoplasmic reticulum stress pathway in the kidney of TR KO mice with unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced kidney injury model for CKD. Our experimental results suggested that endogenous thyroid hormone receptor has inhibitory effects on progression of kidney fibrosis.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ERストレス 甲状腺ホルモン受容体 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

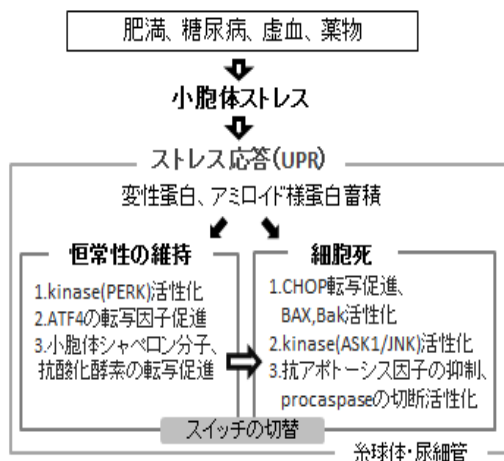
甲状腺ホルモン受容体(TR)には 2つのサブユニットが存在する。TR の遺伝子変異は甲状腺ホルモンに対する反応性を著しく低下させ、甲状腺ホルモン不応症(RTH)の病態を呈することが知られている。我々は RTH患者家系から同定された TR 遺伝子の点変異を Cre-LoxP system を用いて、遺伝子導入した変異 TR ( PV)マウス、変異 TR ( PV)マウスを作成した。TR 変異マウス ( PV および PV マウス)では、膵臓、肝臓、腎臓などの臓器の形成異常が認められ、TR が中胚葉由来臓器の形成に影響していると考えられている。

これまで我々は、dominant negative な変異 TR 蛋白が PI3K の調節サブユニットである p85 に結合し、PI3K を活性化してしまうことを明らかにしてきた。また、高脂肪食負荷を行った TR KO マウスの膵臓では TR を介した小胞体 (ER) ストレス応答が破綻を来し、高脂肪食負荷によって膵臓細胞のアポトーシスが亢進していることを明らかにした。

腎臓病モデル動物では、腎系球体や尿細管病変部において小胞体ストレスが増加し、小胞体ストレス応答経路が活性化されていることが明らかにされている。糖尿病モデルマウスの腎系球体の podocyte において、PI3K 経路の下流の mTOR の活性化がスリット膜蛋白 (slit diaphragm protein) の局在異常を引き起こし、podocyte における小胞体ストレス亢進を伴う上皮間葉転換を生じることが報告されている。

これらのことから、TR は腎臓における小胞体ストレス応答に重要な働きを有していて、小胞体ストレスに関連した腎障害進展の発症および進展に対して抑制的な働きをしている可能性があると考えた。

図1.小胞体ストレス応答



2. 研究の目的

(1) 糸球体や尿細管間質における小胞体ストレス応答蛋白と、その下流にあるアポトーシス関連蛋白の発現、キナーゼ活性に関して内因性 TR が有する作用を明らかにする。

(2) 腎臓における TR が有する PI3K の活性化に対する作用およびその下流の mTOR の活性化、podocyte への影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TR 遺伝子欠損マウスを用いた、小胞体ストレス下における腎臓の血管内皮細胞、メサンギウム細胞におけるストレス応答蛋白、アポトーシス関連蛋白の発現レベル、キナーゼ活性の検討 (in vivo)。

野生型マウスと TR KO マウスに片側尿管結紮 (UUO) を行い、急性腎障害のバイオマーカー、腎病理組織学的な検討を行った。ER ストレス応答に注目し、s ER ストレス応答蛋白の主要経路である PERK、eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP とその下流にあるアポトーシス関連蛋白 (Bcl-2、Caspase) の発現レベルを western blot、蛍光免疫染色法を用いて検討した。また、PERK、eIF2、ATF4 蛋白が有するキナーゼ活性につき、kinase assay kit を用いて評価した。

(2) 内因性 TR の遺伝子欠損により見られる細胞周期進展の分子生物学的機序の解明のため、細胞周期調節因子の蛋白、リン酸化蛋白の発現量について western blot を用いて定量的評価を行い、PI3K 経路とその下流にある cyclinD1/Rb/E2F 経路の活性化について検討を行った。

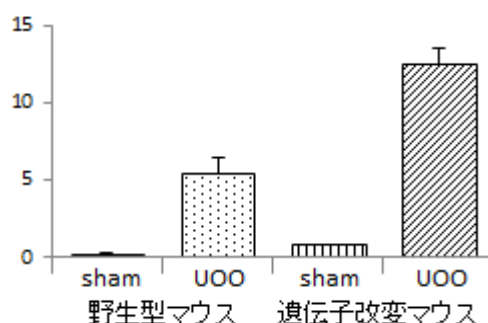
4. 研究成果

(1) 腎障害モデルにおける TR KO マウスの評価

通常飼育下 (非ストレス下) では TR KO マウスと野生型マウスの腎臓では、病理学的には形態的变化は認めなかったが、リアルタイム PCR による検討ではストレス応答蛋白の一つである ATF4 mRNA の発現レベルが TR KO マウスにおいて著しく低下していた。

野生型マウスと TR KO マウスに UUO を行ったところ、UUO 施行前の血清 Cr 値には差を認めなかったが、UUO 施行 2 週間後の血清 Cr 値は TR KO マウスが高い傾向がみられた。また、TR KO マウスの血中 NGAL 濃度が著明に増加することを確認した (図 2)。病理組織学的検討では、TR KO マウスの腎系球体、尿細管において、NGAL 蛋白はより強く発現していることを確認した。

図2. 血中 NGAL (U/ml)

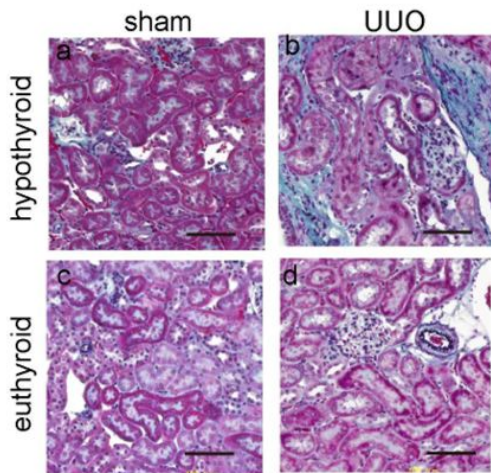


これらの結果から、TRは腎障害の進展抑制関する何かしらの機序を有している可能性が示唆された。

### (2) UUO後の腎におけるERストレス応答の検討

UUO施行2週間後の結紮側の腎臓では、RKOマウスでは生型マウスと比較し、より高度な腎線維化を認めた(図3)。

図3. Masson-trichrome

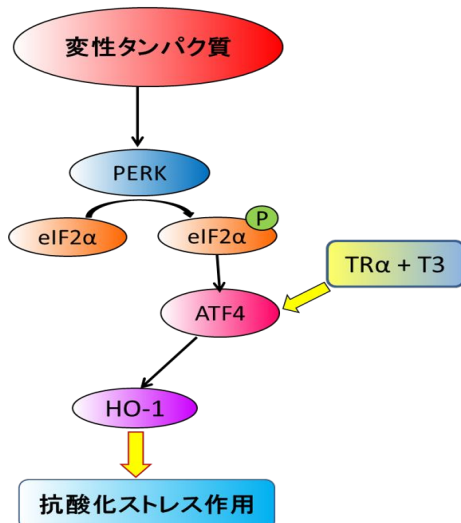


その機序として、ERストレスに注目し、ERストレス応答蛋白の発現レベル、キナーゼ活性について検討を行った。

結紮側の腎臓から皮質を取り出し、ERストレス刺激により、シグナリング蛋白の発現量をRT-PCR法およびwestern blotで評価した。

予備実験の結果より、ERストレス応答シグナリングの主要3経路のひとつである、PERK、eIF2、ATF4の経路に注目し検討を行った。PERKおよびその下流のリン酸化eIF2の発現は、TRKOマウスと野生型マウスにおいて差がみられなかったが、TRKOマウスにおいて、ATF4はmRNAレベル、蛋白質レベルともに著しく低下していることが明らかとなった。

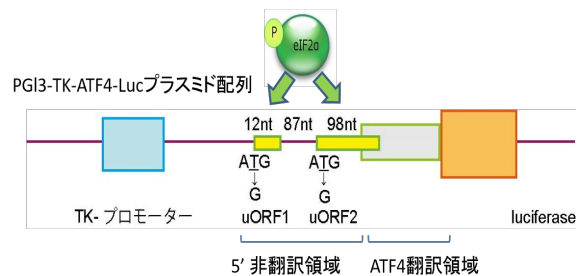
図4. TRα存在下でのERストレス応答



ATF4の下流では、酸化ストレス防御因子であるHO-1の発現が低下していた。UUOにより惹起されたERストレスに対して、ストレス応答の破綻を来し、細胞に酸化ストレスを惹起することが示唆された(図4)。

リン酸化eIF2はATF4の5'非翻訳領域に結合し翻訳を誘導することが明らかにされている。本研究とは別に、我々は脾細胞のcell lineであるMIN6細胞において、TRノックダウン下ではリン酸化eIF2の発現量に関わらず、ATF4の発現が誘導されないことを確認している。

図5. リン酸化eIF2αはATF4の5'非翻訳領域に結合し翻訳(translation)を誘導する

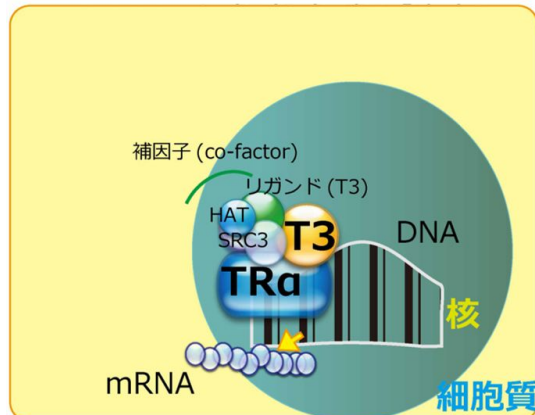


### (3) 腎線維化進展におけるTRが有する機序の検討

UUO後の腎線維化 UUOを施行した後、3日、7日、14日後にそれぞれ腎障害マーカー、腎病理組織学的検討を行った。3日目の時点では腎線維化はみられず、尿細管間質への炎症細胞浸潤を認め、それは野生型マウスでより高度であった。また、血中NGAL値も野生型マウスで高い傾向がみられた。UUO施行7日目の時点では、TRKOマウスと野生型マウスでは、腎の炎症細胞浸潤、線維化に明らかな差を認めなかった。UUO施行14日目には、野生型マウスと比較し、TRKOマウスの腎臓では炎症細胞浸潤、繊維化が高度であり、血中NGAL値も高値であることを確認した。

これらの結果は、TRKOにおいてERストレス応答の破綻によって腎障害が進展したとする当初の仮説では、説明が困難であると考えられた。

図6. 核内ホルモン受容体リガンド依存性転写因子



UUO による腎線維化の進展において、組織障害性マクロファージが重要な働きを有していることが知られている。UUO 施行後の腹腔内マクロファージを回収し、4 方向セルソーティングによって解析したところ、TR K0 マウスでは野生型マウスと比較し、組織障害性マクロファージの割合が高い傾向にあった。このことは、内因性 TR がリガンド依存性転写因子として、マクロファージの分化誘導に重要な役割を有している可能性を示唆するものと考えられ、現在、解析を進めている。

**(4)腎臓における TR が有する PI3K、mTOR の活性化への作用、podocyte への影響の検討。**

今後、検討を行っていく予定である。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 和也 (TAKAHASHI, Kazuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号： 00646135

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

古屋 文彦 (FURUYA, Fumihiko)

研究者番号： 90456450

北村 健一郎 (KITAMURA, Kenichiro)

研究者番号： 10304990