

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K00890

研究課題名(和文) プロスタサイクリン欠損による腎血管障害発症機序の解明と改善・予防へのアプローチ

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of renal angiopathy due to prostacyclin deficiency and approaches to improvement and prevention

研究代表者

横山 知永子 (YOKOYAMA, CHIEKO)

神奈川工科大学・健康医療科学部・教授

研究者番号：90200914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタサイクリン(PGI₂)欠損マウスにおける腎血管障害の発症機構は明らかではない。本研究ではPGI₂合成酵素遺伝子改変マウスを用いて腎障害の発症時期と情報伝達経路を明らかにすることを目指した。また、培養脂肪細胞を用いて脂肪組織との関連性を検討した。PGI₂欠損は生後28日までに腎組織の炎症性サイトカインの発現を上昇させることが明らかとなった。また、腎機能の維持にPGI₂-PPAR- δ を介した情報伝達系が重要である可能性が示唆された。炎症惹起による脂肪細胞の炎症性アディポサイトカインの発現上昇は、n-3系多価不飽和脂肪酸により抑制され、腎血管障害発症予防の可能性が予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PGI₂の欠損あるいは産生レベルの低下が、腎臓に炎症を起こしやすい状況を生じることや腎機能の維持にPGI₂-PPAR- δ を介するシグナル伝達機構が重要な役割を果たす可能性を示唆する本研究結果は、近年我が国において問題となっている生活習慣病による慢性腎臓病や血管の老化に伴う腎機能低下の病態改善、発症・進展予防の研究の基盤として役立つものである。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic mechanism of renal angiopathy in prostacyclin (PGI₂) deficient mice is unclear. In this study, we aimed to clarify the onset time and signal transduction pathway of renal disorder using PGI₂ synthase gene-modified mice. In addition, the relationship with adipose tissue was examined using cultured adipocytes. It was revealed that PGI₂ deficiency increased the expression of inflammatory cytokines in renal tissue by 28 days after birth. It was also suggested that the signal transduction system via PGI₂-PPAR- δ may be important for the maintenance of renal function. The increased expression of inflammatory adipocytokines in adipocytes due to inflammation was suppressed by n-3 polyunsaturated fatty acids, and it was expected that the onset of renal vascular disorders could be prevented.

研究分野：病態生化学、栄養学、薬理学

キーワード：プロスタサイクリン PGI₂ プロスタグランジン 腎血管障害 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

必須不飽和脂肪酸のアラキドン酸からは、プロスタグランジンやロイコトリエンをはじめとするエイコサノイドと呼ばれる強力な生理活性脂質が産生される。これらのうち、プロスタサイクリン(プロスタグランジン(PG)I₂)は、血小板の凝集抑制作用、平滑筋の弛緩作用、細胞増殖制御能を持つ強力な生理活性脂質で、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって産生されたプロスタグランジン H₂ を PGI₂ に変換する PGI₂ 合成酵素によって産生される。この酵素は、主に血管内皮細胞で発現しているが、老化に伴い酵素活性は低下する。これまでに我々は、PGI₂ 合成酵素が血管以外の組織でも発現し、心血管系の恒常性維持、炎症、疼痛、生殖など、様々な作用に関わることを示してきた。また、世界に先駆けて PGI₂ 合成酵素欠損マウスを作製し、PGI₂ を産生できないこのマウス (PGI₂ 欠損マウス) が腎障害や大動脈の中膜平滑筋層や外膜の肥厚を発症することを明らかにし、PGI₂ が循環器系の恒常性維持に重要な役割を担っていることを示した[1]。また、PGI₂ が骨代謝に関わることも明らかにしており[2]、さらに、血管障害や肺高血圧のモデル動物に本酵素の遺伝子を導入すると、血管壁の肥厚ならびに血行動態や生存率が改善されることを示している。

近年我が国では、糖尿病、肥満、高血圧など生活習慣病から動脈硬化そして慢性腎臓病に陥り、透析治療を余儀なくされる人が著しく増加しており、国民の健康維持を目指す上で大きな問題となっている。興味深いことに申請者が所有する PGI₂ 欠損マウスは、加齢に伴い形態変化を生じ、慢性腎臓病様の腎血管障害を発症する。以前に我々は、PGI₂ が細胞膜上の IP 受容体に結合して作用するだけでなく、核内受容体の 1 つであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR)-delta の内在性リガンドとしても作用することを細胞レベルで明らかにした[3]。実際、IP 受容体の欠損マウスでは、PGI₂ 欠損でみられるような腎血管障害は報告されていない。一方、腎臓での PGI₂ 産生には、プロスタグランジン産生の初発反応を触媒するシクロオキシゲナーゼのアイソザイムのうち 2 型酵素 (COX-2) が関与しており、COX-2 欠損マウスの表現型や COX-2 選択的阻害薬の副作用として腎障害がある。このことは、腎臓での PGI₂ 産生量が著しく減少するために生じると考えられ、PGI₂ 欠損マウスで腎障害が発症することと一致している。しかしながら、PGI₂ 欠損による腎障害の発症時期や PGI₂ の 2 種類の受容体が病態発症にどのように関わっているか、その詳細については明らかではない。

最近、PGI₂ 欠損マウスを用いて脂質代謝関連遺伝子の発現変化を観察したところ、野生型と比較して欠損マウスの腎臓でアディポネクチン遺伝子の著しい発現上昇を見出した。アディポネクチンは、脂肪細胞で産生・分泌され、インスリン抵抗性改善作用、血管保護作用などを持つ善玉アディポサイトカインである。また、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸など n-3 系多価不飽和脂肪酸が、脂質代謝異常改善効果、抗炎症作用、血管保護作用をはじめとする生活習慣病の予防効果を示すことは周知のとおりである。しかしながら PGI₂ 欠損による腎障害とアディポサイトカインとの関連性は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、PGI₂ 欠乏が惹起する腎血管障害について PGI₂ 欠損マウスならびに培養細胞を用いて解析し、障害の発症機序に関わる情報伝達経路、腎および血管保護作用における PGI₂ とアディポネクチンとの関連性、n-3 系多価不飽和脂肪酸による病態改善・予防効果を明らかにすることを目的とした。これらの点を明らかにすることは、慢性腎臓病や血管の老化に伴う腎機能低下の病態改善や発症・進展予防の研究に役立つものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス (PGIS^{+/+})、PGI₂ 合成酵素遺伝子欠損マウス (PGIS^{-/-})、PGI₂ 合成酵素遺伝子欠損ヘテロ接合体マウス (PGIS^{+/-})、および、PGIS^{-/-} に PGIS 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (PGIS^{-/-}/tg/tg、以下 PGIS⁻/tg と記す) の加齢ならびに幼若マウスを用いて比較解析を行った。各臓器における遺伝子発現レベルは、TaqMan 法による qPCR、ウエスタンブロット法、ならびに ELISA による定量により調べた。血漿中の PGE₂、6-keto PGF₁-alpha、サイトカイン等は、市販の ELISA 測定キットを用いて測定した。

(2) PGIS^{-/-} マウスに IP 受容体あるいは PPAR-delta に対するアゴニストの投与実験は、離乳後 20~34 日齢までマウスに腹腔内投与 (1 回/日) し、35 日齢で解剖した。コントロール群は生理食塩水を投与した。PGIS^{+/-} マウスは、高齢となっても腎臓に主な障害は認められなかったため、この実験では同腹で得られた PGIS^{+/-} マウスと PGIS^{-/-} マウスを比較した。

(3) 脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞は常法に基づき脂肪細胞へ分化させ、各アディポサイトカインの mRNA 発現を TaqMan 法による qPCR を用いて相対的定量を行った。アラキドン酸 (AA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の影響は、各脂肪酸の処理時期を変えながら検討を行った。

4. 研究成果

(1) PGI₂ 合成酵素遺伝子破壊のヘテロ接合体(PGIS^{+/-})では、ホモ接合体(GIS^{-/-})で認められる腎障害は組織学的には観察されない。一方、ホモ接合体にPGIS 遺伝子を導入したPGIS^{-/tg}マウスはPGIS^{-/-}より軽度ではあるものの同様の腎障害を発症する。腎臓におけるPGISの発現をウエスタンブロット法で解析した結果、PGIS^{-/tg}での発現レベルはPGIS^{+/-}の20-30%程度であった。加齢マウスの腎臓における炎症性サイトカインのmRNA発現レベルを調べた結果、野生型と比較してPGIS^{+/-}で発現上昇が観察された。またPGIS^{-/tg}ではPGIS^{+/-}より高い発現が認められた。他の臓器について検討したところ、肝臓では野生型、PGIS^{+/-}、PGIS^{-/tg}において炎症性サイトカインの発現レベルに差は見られなかった。

PGI欠損による腎障害の発症時期を明らかにするために、28日齢と35日齢幼若マウスの腎臓における炎症性サイトカインのmRNA発現レベルを検討した結果、PGIS^{-/-}では28日齢で有意な発現上昇が認められた。PGIS^{-/tg}における発現は、28日齢ではPGIS^{-/-}より有意に低いレベルであったが、35日齢ではPGIS^{-/-}と同レベルまで発現は上昇していた(図1)。これらのことから、PGIS^{-/-}マウスにおける腎障害は生後28日までは発症が惹起されること、PGIS^{-/-}では腎臓に肉眼的な異常は観察されないが、炎症性サイトカインレベルは高いことが明らかになり、またPGI欠損は腎臓特異的に炎症を惹起する可能性が高いと考えられる。

(2) 腎血管障害発症に関するPGI₂シグナル伝達経路に関して、IP受容体およびPPAR- δ のアゴニストを投与した幼若マウスを用いて検討した結果、PGIS^{-/-}にPPAR- δ 選択的アゴニスト(GW501516)を投与した群において腎臓での炎症惹起因子の発現レベルは有意に低下した。一方、IP受容体アゴニスト(Carbacyclin)を投与した群では非投与群と差は認められなかった(図2)。これらの結果から、腎機能の維持にPGI₂-PPAR- δ を介するシグナル伝達経路が重要な役割を果たしているものと考えられる。

(3) n-3系多価不飽和脂肪酸のPGI₂欠損マウスの腎血管障害に与える影響について検討するために、エイコサペンタエン酸(EPA)投与実験を予定していたが、繁殖飼育の問題等により実験は断念した。腎組織内には脂肪が存在している領域がある。そこで培養細胞を用いてn-3系多価不飽和脂肪酸による炎症抑制作用を検討した。EPA含有培地で培養維持した3T3-L1由来脂肪細胞は、炎症性アディポサイトカインの発現に低下傾向がみとめられた。また、炎症を惹起した脂肪細胞は、EPA存在下では炎症性アディポサイトカインの発現上昇は抑制された。腎組織でEPAによる炎症惹起抑制効果が認められれば、PGI₂産生レベルが低下した腎臓においてEPAが腎障害発症を抑制する可能性があるのではないかと思われる。

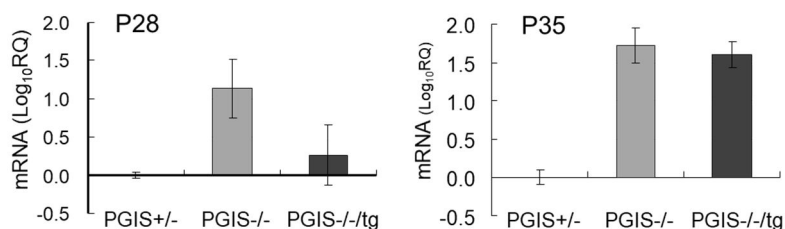


図1. 28日齢および35日齢マウス腎臓におけるIL-6 mRNA発現レベル

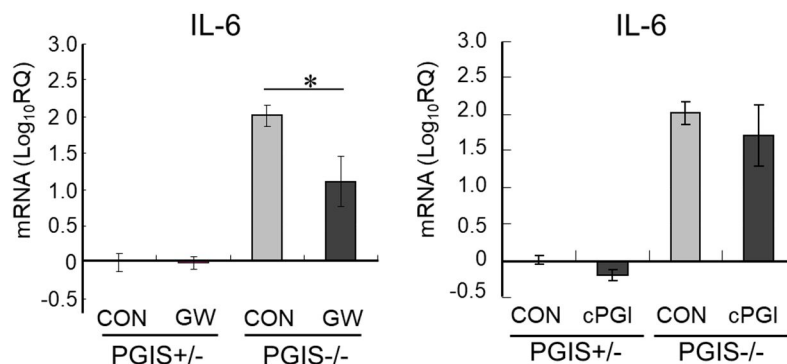


図2. 腎臓IL-6mRNA発現レベルに対するPGI₂受容体アゴニストの影響

CON, control; GW, GW501516; cPGI, carbacyclin

引用文献

1. Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. Yokoyama C et al. *Circulation* 106:2397-2403, 2002
2. Increased bone mass in adult prostacyclin-deficient mice. Nakalekha C, Yokoyama C et al. *J Endocrinol.* 204:125-133, 2010
3. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. Hatae T, Wada M, Yokoyama C et.al. *J Biol Chem.* 276:46260-46267, 2001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------