

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16090

研究課題名(和文)炎症・ERストレスに着目した生活習慣病関連腎症にMRP8が果たす役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of MRP8 through inflammation and ER stress in metabolic syndrome related nephropathy

研究代表者

水本 輝彦 (Mizumoto, Teruhiko)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80749193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MRP8に関して既報ではTLR4を介した炎症による報告であったが、今回の研究でIRF3を介した炎症が影響している可能性を見出した。しかし、機序がはっきりしなかったため、エクソソームに注目し、メサンギウム細胞のエクソソームでマクロファージが活性化されていることを見出した。さらにエクソソームを介した炎症を抑える薬物の同定を開始した。3300化合物の中から1次スクリーニングで、抑制率40%以上が得られた421化合物を2次スクリーニングへ進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病において進行を予防する手段は限られており、新規薬剤の開発が望まれている。糸球体内におけるエクソソームを介したマクロファージの炎症・ERストレスによる腎障害の進行の可能性を認めた。機序ははっきりしていないが、腎障害の進行を抑制する薬剤の同定を開始した。3300化合物の中から1次スクリーニングで、抑制率40%以上が得られた421化合物を同定し、更なるスクリーニングを進めている。すでに臨床使用されている薬剤も含まれており、早期に慢性腎臓病に使用可能な薬剤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the previous report, MRP8 inflammation was reported by TLR4 mediated inflammation, but in this study we found that IRF3 mediated inflammation may be affected. However, the mechanism was unclear. We focused on exosomes and found that macrophages were activated in exosomes of mesangial cells. Furthermore, identification of drugs that suppress exosome-mediated inflammation was started. Out of 3300 compounds, 421 compounds that have achieved 40% or more suppression of inflammation in the primary screening are advanced to the second screening.

研究分野：腎臓内科

キーワード：MRP8 糖尿病性腎症 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

慢性腎臓病(CKD)は増加しており、末期腎不全である透析患者は31万人を超えており、今後更なる増加が予想される。CKDの病態が十分に解明されていないことから根本的な治療法はないが、高血圧、高血糖、脂質異常などのメタボリックシンドロームの要素はCKDの進展に大きなリスクと報告されている。これまでレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系への阻害薬の有効性が、数多くの臨床試験において実証されているが、このような薬物治療を駆使してもCKDにおける腎障害の進行を予防しきれていないのが現状であり、新規治療薬の開発が望まれる。

これまでの報告で肥満、糖尿病において小胞体(ER)ストレス・慢性炎症は重要であることが示されている。我々は肥満によるERストレスはプロスタシンの発現を低下させ、切断を免れたTLR4を増加させることを見出した。発現増加したTLR4が飽和脂肪酸や腸内細菌のエンドトキシンによる慢性炎症を引き起こし、耐糖能異常を呈していることを示した。また、プロスタシンの発現の増強は耐糖能異常を回復させる

ことを示した(図1. Mizumoto T et al. *Nature Communications* 2014)。

腎障害においても糖尿病性腎症(DN)、肥満腎症(ORG)や糸球体腎炎(GN)による腎障害の進展にERストレス、慢性炎症の関与が示唆されている。慢性炎症において一端を担うのがMRP8である。MRP8はCa結合蛋白として同定されたが、ERストレス下で細胞外にdamage-associated molecular patterns(DAMPs)として分泌され、種々の病態へ関わっていることが注目されている分子である。

MRP8は糖尿病性腎症における糸球体で優位に増加し、1年後の尿蛋白量を独立して予測したという報告がある(Kuwabara T et al. *PloS One* 2014)。MRP8に関してはTLR4のリガンドとしての作用が報告されているがMRP8/TLR4シグナルについてははっきりと解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的はMRP8の自然炎症を介したCKD進展の機序を明らかにし、そして新規治療法開発への応用性を探る事である。

3. 研究の方法

MRP8/IRFのシグナルに関する糸球体上皮細胞における検討

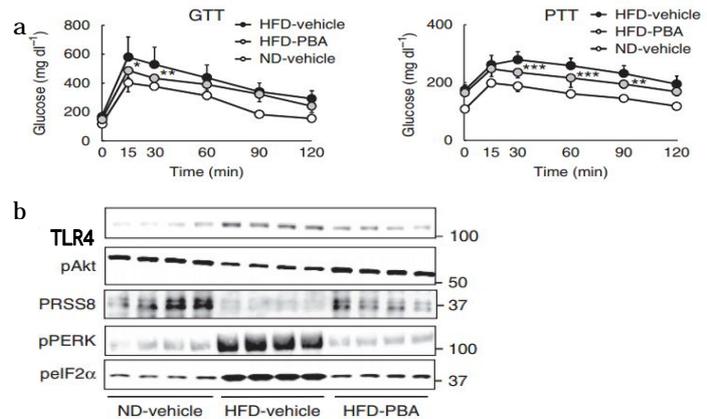


図1. a.HFD、HFD-PBA投与による GGT、PTT、b.HFD、HFD-PBA投与マウスにインスリン投与後の肝臓 TLR4、pAKT、PRSS8、pPEARK、pElF2 の発現

a.HFDにより悪化した血糖がPBA投与によるERストレス阻害で改善していた。b.HFDではERストレス(pPERK、pElF2)が増加し、PRSS8が低下、TLR4が増加し、インスリンシグナル(pAKT)を低下させたが、ERストレス阻害薬はそれを改善し、インスリン抵抗性を改善した。

我々の予備検討では MRP8 単独では NF B を活性化させず、IRF を活性化させ炎症シグナルを増強している可能性を見出した。マウスマクロファージ細胞である Raw264.7 に MRP8、LPS を投与し、すでに入手済みの TLR4 阻害薬を投与し、MRP8 の IRF の活性化に TLR4-TRIF 活性化のみを活性化しているかを検討した。

エクソソームによるマクロファージ活性化の検討

培養メサンギウム細胞の細胞上清を THP1-dual reporter に投与し、NF B、IRF の活性化について検討した。その後、上清中のエクソソームを抽出し、THP-1 細胞に投与した。脂溶性カルボシアニンで染色したメサンギウム細胞由来エクソソーム(Dio-exo)を RAW264.7 に投与し、細胞への取り込みを検討した。また、Dio-exo を RAW264.7 細胞に投与し、フローサイトメトリーで取り込みの割合を検討した。エンドサイトーシス阻害薬であるサイトカラシン D により細胞内取り込みを抑制したものと比較した。

マクロファージに対する化合物の探索

エクソソームを介した慢性炎症を阻害する薬物を同定するため、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)に応募、研究計画が承認され、東京大学創薬機構より提供を受けた既存薬ライブラリの化合物スクリーニングを開始した。既存薬を含む約 3300 化合物について、前述のレポーターアッセイにより HG MC-exo による NF B-SEAP 誘導の抑制効果のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

MRP8 は TLR4 のリガンドとしての報告があるが我々の検討では MRP8 単独では直接 NF B を活性化させず、IRF を活性化させ炎症シグナルを増強していた。(図 2)そこで同様の系に TLR4 阻害薬を用いた検討で MRP8 は TLR4 を介して IRF を活性化させ炎症シグナルを増強している可能性を見出した。これら

の結果を踏まえて MRP8 阻害効果のある中和抗体の検討を追加したが、目的の抗体を得ることが難しく、MRP8 発現誘導を効果的に抑制する治療を念頭とする検討を行うこととした。

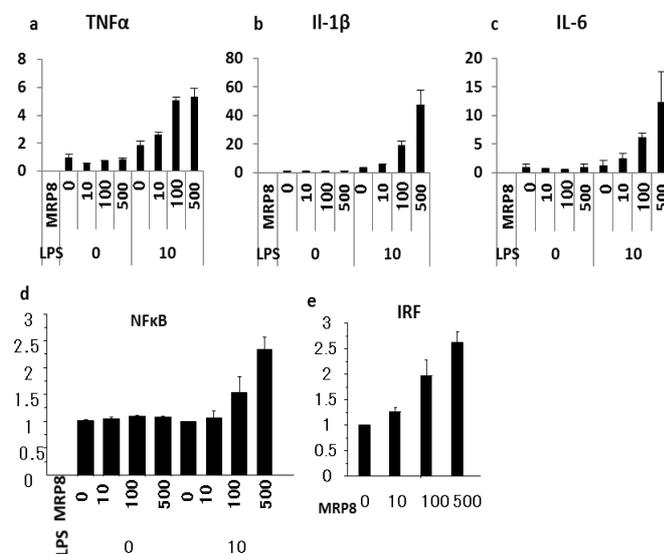


図 2. HEK293 細胞に LPS、MRP8 を投与した際の a.TNF , b.IL-1 , c.IL-6. d.TH-1 細胞に LPS、MRP8 を投与した際の NF B プロモーターのルシフェラーゼ活性, e.TH-1 細胞に MRP8 単独で投与した際の IRF プロモーターのルシフェラーゼ活性

a,b,c で MRP8 単独投与では炎症性サイトカインは上昇していないが、LPS との同時投与で炎症性サイトカインは MRP8 との濃度依存性に上昇した。

d.MRP8 単独投与では NF B を活性化していないが、LPS との同時投与で濃度依存的に活性が増加した。e.MRP8 は単独で IRF の発現を増加させた。

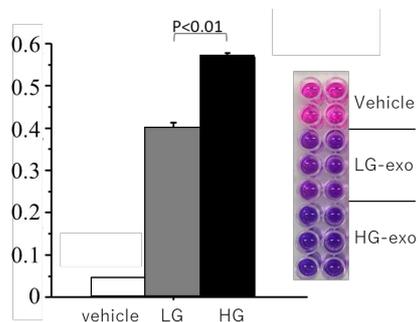


図 3. 高血糖(HG)、低血糖(LG)下の MC-exo 投与による THP-1 の NF-κB の発現量

LG と比較して HG でより NF-κB の発現が増加した。

糸球体病変の形成において、細胞間クロストークが重要な役割をはたしており、糖尿病性腎症の初期ではメサンギウム細胞、炎症細胞間が重要と考えられる。糖尿病性腎症の初期段階を仮定した高血糖下のメサンギウムの影響を検討すると、HG MC-exo による刺激は低糖濃度条件下で採取した LG MC-exo と比較して、有意に炎症反応を増強した (図 3)。高糖濃度(HG)条件下メサンギウム細胞培養上清(HG MC-sup)刺激がマクロファージの炎症を強く活性化させた。すなわち、高糖濃度に晒されたメサンギウム細胞由来液性因子の関与が示唆される。MRP8 との関連をはっきりさせることはできなかったが病像やこれまでの検討結果を踏まえると、液性因子として全身性よりは局所で作用する可能性を考慮し、培養上清からエクソソーム(HG MC-exo)を抽出して検討を行った。IRF と NF-κB のレポーターを有する THP-1 dual reporter 細胞、HG MC-exo を投与すると、NF-κB-SEAP, IRF-LUC を濃度依存性に活性化することが確認できた (図 4)。エクソソーム

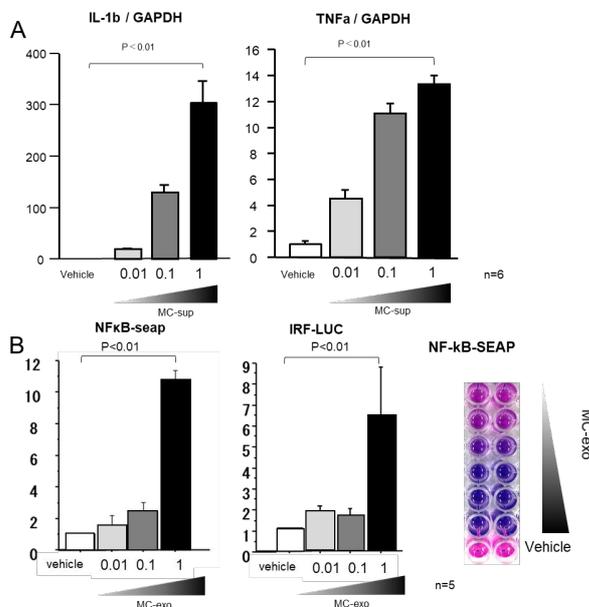


図 4. メサンギウム細胞培養上清(MC-sup)でマクロファージ (RAW264.7) を 24 時間刺激、炎症シグナルの mRNA を検討。

A: RAW264.7 にメサンギウム細胞培養上清を投与すると IL-1、TNF-α が上昇していることが示された。B: exo を投与しても濃度依存的に NF-κB、IRF の発現の増加を認めた。

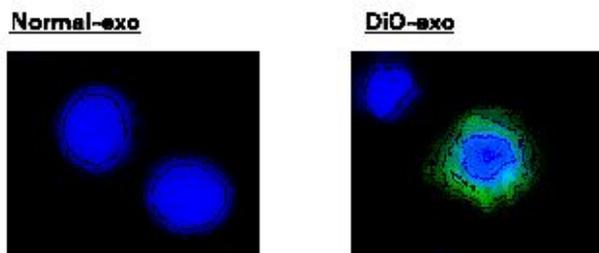


図 5. 脂溶性カルボシアニンでエクソソームを染色した MC-exo(Dio-exo) を投与したマクロファージ細胞 (RAW264.7)

RAW264.7 に Dio-exo を投与すると核周囲の細胞質に Dio-exo が取り込まれていた。(青: DAPI)

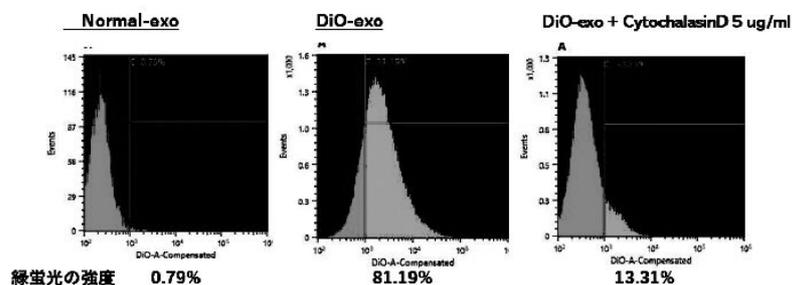


図 6. Dio-exo を投与した RAW264.7 の蛍光細胞の割合

通常の MC-exo(Normal-exo)ではほとんど検出されないが DiO-exo では 81%の細胞に蛍光標識されたエクソソームが取り込まれた。エクソソーム取り込み阻害薬の CytochalasinD を投与すると蛍光標識された細胞が減少した。

はパラクリンに作用する液性因子として主に腫瘍での解析が先行しているが、近年腎疾患における役割についても着目されている。Lin-Li LV らの報告では、尿管上皮細胞より放出されたエクソソームがマクロファージに作用し、アルブミン誘導性尿管間質の炎症を起こすことを報告している(Lin-Li Lv et al. *J Am Soc Nephrol.*

2018)。我々は、脂溶性カルボシアニンで染色したメサングウム細胞由来エクソソーム(Dio-exo)を用いた検討を行い、標的であるマクロファージに取り込まれた(図5)。

エクソソームの効果については、慎重に判断する必要があるため、取り込みに関して追加の確認を行った。標識 Dio-exo の取り込み像を図5に示したが、フローサイトメトリーにより、Dio-exo で処理したマクロファージの約8割に取り込まれ、さらにエンドサイトーシス阻害薬であるサイトカラシンDにより、取り込みが抑制された。末梢血の検討ではあるが、糖尿病マウスに静注投与した Dio-exo が末梢血中の単球分画に取り込まれていた。(図6)

エクソソームを介した慢性炎症を阻害する薬物を同定するため、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)より承認、東京大学創薬機構より提供を受けた既存薬ライブラリの既存薬を含む約3300化合物のスクリーニングを開始した。事前検討で設定した、MC-exo 刺激を効率よく検出・定量するための THP1-dual reporter アッセイ条件は、東京大学創薬機構の定めた CV 値、S/B 比、Z 値をクリアしており、優れたスクリーニング法を確立できている

と考えられた(図7)。3300化合物の中から1次スクリーニングで、抑制率40%以上が得られた421化合物(図8)を2次スクリーニングへ進めている。さらに、2次スクリーニング行い得られる化合物のうち、HG MC-exo による刺激に特異性の高い化合物を得ることを目的として3次スクリーニングを行う。具体的には、HG MC-exo 刺激と lipopolysaccharide (LPS)刺激による炎症誘導抑制効果を比較する。その後、同定された化合物を用いて in vivo における効果判定や作用機序の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakagawa T, Kakizoe Y*, Iwata Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Adachi M, Izumi Y, Kuwabara T, Suenaga N, Narita Y, Jono H, Saito H, Kitamura K, Mukoyama M.

Doxycycline attenuates cisplatin-induced acute kidney injury through pleiotropic effects

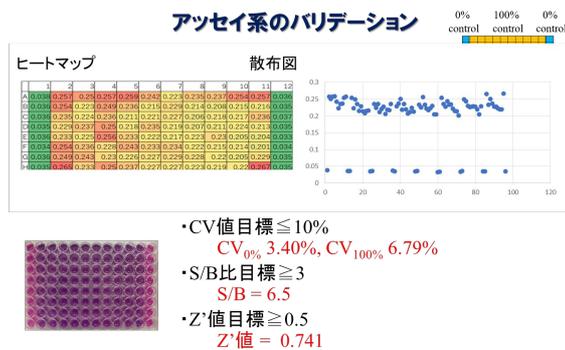


図7. MC-exo 刺激検出のための THP1-dual reporter アッセイのバリデーション

事前検討で定めたプロトコール条件により、高感度かつ再現性のあるスクリーニング系を確立できた

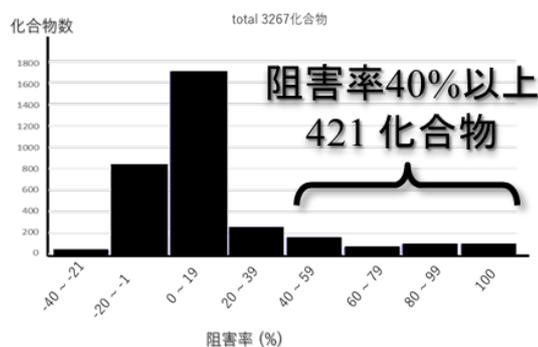


図8. MC-exo 投与下、THP-1 reporter 細胞に対する化合物のNF-κBの抑制率

3267化合物中、40%以上の抑制率が得られたものは421化合物であった。

〔学会発表〕(計3件)

藤本 大介、 栗原孝成、 梅本周朗、 神吉智子、 水本輝彦、 早田学、 泉裕一郎、 柿添豊、 向山政志

糸球体内クロストークにおけるメサングウム細胞由来因子によるポドサイト ER ストレス応答の検討

日本腎臓学会 2018年

神吉智子、 栗原孝成、 梅本周朗、 藤本大介、 水本輝彦、 早田学、 中山憲司、 宮崎有、 井上貴博、 小川修、 向山政志

CKDにおけるMRP8の化学修飾の探索とその意義の検討

日本腎臓学会 2018年

Daisuke Fujimoto, Takashige Kuwabara, Yusuke Hata, Shuro Umemoto, Tomoko Kanki, Yoshihiko Nishiguchi, Teruhiko Mizumoto, Manabu Hayata, Yuichiro Izumi, Yutaka Kakizoe, Masashi Mukoyama

Intraglomerular crosstalk between mesangial cells and podocytes inhibits normal ER-associated degradation processes and induces podocyte injury in diabetic nephropathy.

American Society of Nephrology 2019

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：向山 政志、 栗原 孝成、 梅本 周朗、 藤本 大介、 神吉 智子

ローマ字氏名：Masashi Mukoyama, Takashige Kuwabara, Syuro Umemoto, Daisuke Fujimoto, Tomoko Kanki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。