

令和元年6月13日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16105

研究課題名(和文)ATP/P2Y2受容体経路による糖尿病性腎症の新規進展機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of the progression of glomerular injury via ATP/P2Y2 receptor pathway in diabetic kidney disease.

研究代表者

城所 研吾(Kidokoro, Kengo)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50435020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎臓病(DKD)の糸球体障害進展過程において、血管内皮由来ATPが糸球体上皮細胞におけるCa²⁺流入を誘導し、上皮障害を促進するとの仮説を立てこれを検証した。内皮障害糖尿病(eNOS-KO/STZ)マウスでは血漿中ATP濃度は有意な上昇を認めており、尿中アルブミン排泄量も著明な増加を認めた。同時に糸球体上皮細胞内のCa²⁺濃度が増大していることが、上皮細胞特異的Ca²⁺感受性蛍光蛋白質発現マウスを用いた検討で示された。DKDにおける上皮細胞障害の障害進行には細胞内Ca²⁺濃度の増大が関与しており、内皮障害により増強されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎臓病(DKD)は透析に至る疾患の第一位であり、その発症・進展機序の解明および治療法の確立は喫緊の課題と認識されている。これまでの腎臓病研究の多くが単一細胞に焦点を当てたものであるが、生理的機能の維持あるいは病態進展過程においても細胞間の相互作用の存在が強く示唆されている。本研究は内皮-上皮連関に着目し、障害内皮から放出されるATPが糸球体上皮細胞障害を増強させる可能性があることを見出し、新規治療開発に寄与しうる研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have hypothesized that ATP release from endothelial cells with low NO bioavailability was increased, and endothelium-derived ATP induces Ca²⁺ influx in glomerular epithelial cells and promotes epithelial dysfunction in the process of glomerular injury in diabetic kidney disease (DKD). In diabetic mice with endothelial dysfunction (eNOS-KO / STZ), plasma ATP levels and urinary albumin excretion were significantly increased compared to STZ mice. In eNOS-KO / STZ mice, Ca²⁺-sensitive fluorescent protein expression in podocyte was higher than in STZ. These results suggest that the progression of epithelial cell injury in DKD is related to increased intracellular Ca²⁺ concentration and enhanced by endothelial injury.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎臓病 内皮-上皮連関 内皮細胞障害 ATP in vivo imaging

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

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は腎障害のみならず心血管病 (Cardiovascular Disease: CVD) のリスクとなり、これら血管障害の基盤には血管内皮障害が存在している。我々はこの内皮機能障害に着目し、内皮細胞の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)-一酸化窒素 (Nitrogen oxide: NO) の不均衡が、早期糖尿病性腎症進展における主な要因であることを見出し、不均衡は正により腎障害進展抑制、アルブミン尿現象効果を報告している¹。一方で、内皮酸化ストレスの亢進が糸球体上皮細胞障害をより早期に惹起することも報告している²。これらの研究結果では血管内皮障害が糸球体病変の初期病巣と強く関連することが明らかとなってきたが、実際の細胞間連関の分子メカニズムに関しては依然不明である。

糸球体上皮細胞内 Ca^{2+} 濃度は、収縮、骨格維持、顆粒分泌、遺伝子翻訳やアポトーシスと深く関係する。糸球体上皮細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入は細胞骨格の remodeling を誘導し、結果アルブミン尿が出現する。近年 TRPC6 や TRPC5 などが糸球体上皮細胞内への重要な Ca^{2+} 流入経路として報告されており³、また ATP 感受性イオンチャネル型受容体 (Purinergic receptor) である P2 受容体も、糸球体上皮細胞間の傷害伝播 (Ca^{2+} 伝播) に重要な役割を果たしていることが報告されている⁴。障害内皮細胞から放出される ATP は糸球体上皮細胞上の P2 受容体を刺激し、過剰な Ca^{2+} 流入を惹起することが想定される。しかし糖尿病における *in vivo* での糸球体上皮細胞 Ca^{2+} 濃度変化と上皮障害における病因的関与や ATP/P2 受容体の病態進展における寄与についての検討はされていない。

2. 研究の目的

慢性腎臓病 (CKD) における糸球体障害進展過程での糸球体内皮-上皮連関の分子機序を解明し、新規治療法構築に資することを目的とする。障害内皮からの ATP 放出あるいは糸球体上皮 ATP 感受性イオンチャネル型受容体 (Purinergic receptor) P2 受容体に着目し、糖尿病細小血管障害の最早期病変である血管内皮機能障害と糸球体上皮細胞障害の連関機序を解明する。具体的には、高血糖状態下における内皮障害と細胞外 ATP 放出変化について検討する。内皮細胞から放出される ATP により、糸球体上皮細胞内カルシウム流入増大が、上皮細胞障害、糸球体透過性制御に及ぼす影響及びその分子機序について検討する。

糸球体上皮細胞の P2 受容体阻害ないし ATP 放出制御による糖尿病性腎症進展抑制の可能性を検討する。

3. 研究の方法

1) 高血糖下における障害内皮細胞からの ATP 放出・産生変化と分子機序の検討

ヒト糸球体内皮細胞 (hGEC) を用いて高血糖刺激 (normal glucose (NG); 5mM, high glucose (HG); 30mM) による ATP 産生能・放出の変化とその機序を解析する。内皮機能障害を想定し NOS (NO 合成酵素) 阻害薬 (L-NAME; 500 μ M)、PKG 阻害薬 (500nM) 添加群、及び ATP 放出に關与する Pannexin1 の阻害作用を持つ Probenecid 添加群も作成する。24 時間刺激後、上清中の ATP 濃度測定を行う。

2) 糖尿病モデル動物における血漿中 ATP 濃度と糸球体細胞アポトーシス及びアルブミン尿の解析

内皮機能障害モデルとして eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用い、高血糖下での糸球体障害への影響を検討する。糖尿病モデル作成には Streptozotocin (STZ) の腹腔内投与を行い、STZ、STZ/eNOS-KO マウスを作成する。血糖上昇後 3-4 週間で血漿中 ATP 濃度、尿中アルブミン排泄を測定、TUNEL 染色により糸球体細胞アポトーシスの評価を行う。

3) 内皮障害糖尿病モデルにおける生体内糸球体上皮細胞カルシウム動態の *in vivo* imaging による解析

Podocin-Cre マウスと、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパクである GCaMP の flox マウス (GCaMP3) を交配させ、Pod-GCaMP3 マウスを作成する。これらのマウスを内皮障害モデルマウス (eNOS-KO) と交配させることにより、eNOS-KO/Pod-GCaMP3 マウスを作成し、STZ 糖尿病モデルを作成し検討を行う。*in vivo* serial imaging により上皮細胞 Ca^{2+} 濃度、糸球体透過性制御の変化を評価する。

4. 研究成果

HG 群での hGEC 培養上清中における ATP の濃度は、NG 群と比較して有意に高値であった。Probenecid は HG 群の上清中 ATP レベルを有意に低下させた。L-NAME、PKG 阻害薬では高血糖状態でも上清中 ATP レベルは有意に上昇していた。Probenecid 添加群では、上清中の ATP レベル上昇は有意に抑制されていた。高血糖刺激、あるいは内皮機能障害を有する糸球体内皮細胞では、ATP 放出が亢進していることが示さ

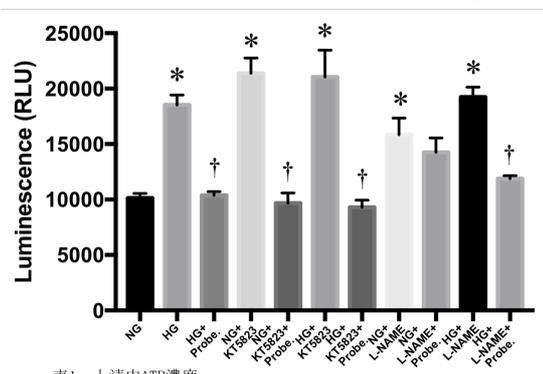


表1. 上清中ATP濃度

NG: normal glucose: 5mM, HG: high glucose: 30mM, KT5823: PKG阻害薬: 500nM, L-NAME: 500 μ M, Probenecid: 200 μ M

*p<0.05 vs NG, †p<0.05 vs HG

れた(表 1)。

内皮障害糖尿病(eNOS-KO/STZ)マウスでは、STZ マウスで尿中アルブミン排泄の有意な上昇を認めない時点で既に有意なアルブミン排泄の増加を認めていた。血漿中 ATP レベルも同様に他群と比較し有意な上昇を認めた。Probenecid の投薬(100mg/kg/day)により、血漿中 ATP 濃度、尿中アルブミン排泄量は共に低下していた(表 2,3)。TUNEL 陽性糸球体細胞数は eNOS-KO/STZ マウスにて多く観察されたが、細胞種までの同定には至らなかった。NO bioavailability が低下した状態では血漿中 ATP レベルは高値となり、Pannexin1 阻害による ATP レベル低下とともにアルブミン尿が抑制されたことから、この両者には関連があることが強く示唆された。糸球体上皮細胞内の Ca²⁺濃度評価を Ca²⁺感受性蛍光蛋白質(GCaMP5)発現マウスを用いて行なった。Control と比較して STZ マウスでは GCaMP 蛍光強度増大は見られなかったが、内皮障害糖尿病(eNOS-KO/STZ)マウスでは増大していた。上皮細胞 Ca²⁺濃度の増大は細胞骨格のリモデリングによる foot process の精緻構造消失を惹起する。このことが大量アルブミン尿出現に関与していると考えられた。この現象は内皮障害により増強されることが示唆された。

DKD におけるアルブミン尿の出現、上皮細胞障害進展には細胞内 Ca²⁺濃度の増大が関与しており、内皮障害により増強されることが示唆された。今後電子顕微鏡による詳細な形態学的変化の観察、macromolecule の糸球体透過性変化の評価、また遺伝学的手法による内皮 ATP 放出制御と合わせ、病態進展機序における上皮-内皮連関の重要性をより強力に評価していく必要がある。

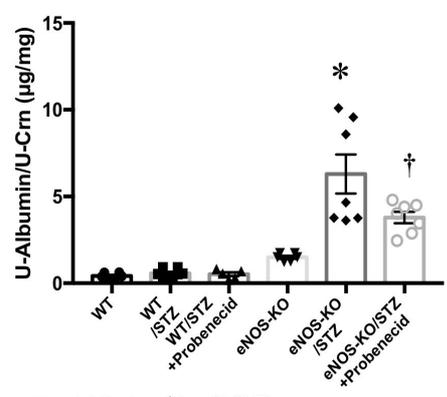


表2. 尿中アルブミン排泄量

*p<0.05 vs WT/STZ, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

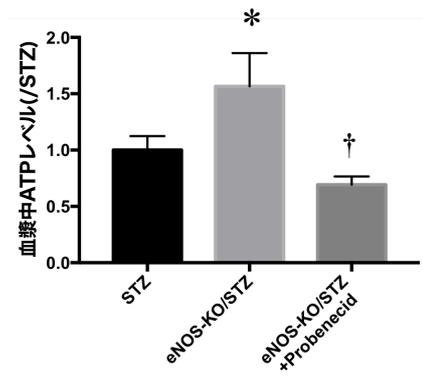


表3. 血漿中ATP濃度

*p<0.05 vs eNOS-KO, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

引用文献

- 1) J Am Soc Nephrol.24(7):1139-50,2013.
- 2) Lab Invest.96(1):25-36,2016
- 3) Nat Genet.37(7):739-44,2005.
- 4) J Clin Invest.124(5):2050-8,2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：

川崎医学会誌 44, 2018 第9回川崎医科大学 学術集会抄録

<http://kms.kms-igakkai.com/wp/wp-content/uploads/book/book44-1/html5.html#page=41>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：柏原 直樹

ローマ字氏名：Kashihara Naoki

研究協力者氏名：佐藤 稔

ローマ字氏名：Sato Minoru

研究協力者氏名：長洲 一

ローマ字氏名：Nagasu Hajime

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。