

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590944

研究課題名（和文） 進行性腎障害における脂質転送蛋白と脂質応答性転写因子の抗炎症・抗線維化作用の解析

研究課題名（英文） Analysis for anti-inflammatory and anti-fibrotic actions of lipid transfer proteins and lipid-activated transcription factors in the progressive renal injury.

研究代表者

木村 秀樹 (KIMURA HIDEKI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：20283187

研究成果の概要：慢性腎臓病の主病変である腎間質線維化の機序を明らかにするため、抗炎症作用を有する脂質親和性受容体(グルコルチコイド受容体(GR)、ペロキシシーム増殖薬活性化受容体(PPAR))とそのリガンドの転送蛋白(脂肪酸結合蛋白：FABP)の炎症・線維化調節作用を炎症刺激下、低酸素下のヒト近位尿細管上皮で解析した。GR 活性化薬(グルコルチコイド)は、定常状態あるいは低酸素・TNF- α 誘導性の PAI-1(線維化促進因子)産生を増強した。これは、チロシナーゼ経路を介し GR 依存性であった。一方、同薬は、定常状態と低酸素誘導性の VEGF(血管新生因子)産生を GR 非依存性に抑制した。PPAR については、尿細管細胞に機能的 PPAR- γ 蛋白発現を確認した。その活性化薬(ヒポキサチン)は標的遺伝子である FABP,LXR 発現を誘導するとともに、ケロイ産生を抑制するかたちで抗炎症作用を呈した。TNF- α ,TGF- β 刺激では、PPAR- γ 発現とその標的遺伝子発現が抑制された。以上より、臨床で汎用されるグルコルチコイドには、抗炎症作用だけでなく、線維化促進作用、血管新生抑制作用が推察され、PPAR- γ については、障害腎における PPAR- γ 経路の変容、減弱が推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学、尿細管上皮細胞、腎線維化、PPAR、GR、FABP、TGF- β 、TNF- α

1. 研究開始当初の背景

尿細管間質の萎縮、線維化は腎不全進展への独立した危険因子であり (New Engl J Med, 1998)、腎間質線維化において尿細管上皮細胞、腎間質細胞の役割の重要性が指摘されている。間質線維化の要因としては、1)糸球体から漏出した脂質含有の尿蛋白、糸球体細胞からの分泌サイトカインによる尿細管・間質細胞の炎症・増殖刺激、2)糸球体硬化や糸球体過

剰濾過から由来する絶対的・相対的な尿細管上皮の虚血・低酸素が重要な因子と考えられている (JASN, 2006)。また、以前より脂質代謝異常も腎線維化の進展因子と考えられ、上述の尿蛋白に結合した脂質が、尿細管細胞に対して細胞障害性に作用し、炎症を誘導すると解釈されてきた (JASN, 1994; Am J Nephrol, 2004)。一方、生化学分野では、各種細胞内には多様な脂質と結合し、脂質の細胞内転送を担う脂質結合蛋白 (LTP) が存在することが

報告されていた (FASEB J, 1989)。さらに、近年では、脂質と結合することにより転写活性が増強する脂質応答性転写因子 (ペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体 (PPAR)、レノール受容体 (RXR)、ファルネイト受容体 (FXR) など) が発見され、その抗炎症・抗線維化作用が注目されている (PANS, 2003; Mol. Cell, 2000)。しかしながら、脂質と腎障害進展との関わりを検討する上で、脂質と細胞内の脂質転送蛋白 (LTP)、さらには脂質応答性転写因子が、どの様な分子メカニズムで腎線維化過程に影響しているのか、十分には解明されていない。また、重要な線維化促進因子である低酸素状態が上記の分子メカニズムにどのように作用するのかも不明である。

2. 研究の目的

(1) ヒト近位尿細管上皮の培養細胞 (HPTEC) において、線維化惹起性サイトカイン刺激と低酸素刺激の前後での各種脂質転送蛋白 (LTP) と脂質応答性転写因子群であるペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体 (PPAR)、グルコルチコイド受容体 (GR) の発現動態を検討する。さらに、同培養細胞における刺激反応系に、PPAR や GR の活性化薬が及ぼす影響を検討し、その活性化による抗炎症作用・抗線維化作用の有無を検討する。

(2) HPTEC に PPAR とそのリガンドである脂肪酸の転送蛋白 (FABP) を強制発現させ、PPRE 活性の変化を検討する。

3. 研究の方法

HPTECs (三光純薬; 第 3-5 継代細胞) を 12-well plate で REGM (増殖培地; 三光純薬) を用いコンフルントまで培養する。その後、0.5%FBS 含有 DMEM で 24 時間静止培養後、サイトカインあるいは低酸素で 6, 24, 48 時間刺激し、その総 RNA と上清を解析する。TNF- α は 10ng/ml, TGF- β は 5ng/ml で使用し、低酸素 (1%O₂) 環境は、1%O₂, 5%CO₂, 94%N₂ の混合ガスと低酸素チャンバー (Billups-Rothenberg 社製) で作製した。

(1) GR 活性化と PPAR- γ 活性化

GR アゴニストとしてハイドロコルチゾン (HC) とデキサメタゾン (DEXA) を 0.1 μ M~10 μ M で使用した。PPAR アゴニストとして Pioglitazone (Pio) を 3 μ M, 15d-プロスタグランジン J₂ (PGJ₂) を 5 μ M, Telmisartan (Telm) を 1, 10 μ M で用いた。GR の抑制には、GR 阻害薬 (RU-486) を 0.1 μ M~10 μ M で 30 分前培養した。シグナル経路の解析には、チロシンキナーゼ阻害薬 (Herbimycin A) の効果を解析した。

(2) 各種遺伝子発現と蛋白発現の検討

GR, FABP, PPAR, LXR, PAI-1, VEGF, MCP-1 の mRNA 発現を real time PCR 法 (ABI 社; Gene Expression assay) で測定。同蛋白量は、GR, PPAR についてはイムノブロット法 (細胞破碎液) で、これ以外は上清について免疫比濁法と ELISA で測定した。

(3) PPAR 発現とその機能の検討

HPTEC における PPAR- γ mRNA 量を Real time PCR 法で、同蛋白量をイムノブロット法で検出した。PPAR- γ 活性化薬 (Pio, PGJ₂, Telm) の PPRE 活性は、リポフェクティンで遺伝子導入した PPRE-luc の発現活性で評価した。PPAR- γ の機能発現の評価としては、標的遺伝子として L-FABP, LXR- α の mRNA 発現の変動を検討した。また、TNF- α ・TGF- β 刺激下で PPAR- γ , FABP, LXR- α 発現の変動を検討した。

(4) L-FABP 発現の PPRE 活性への影響の検討

L-FABP 発現ベクターと PPRE-luc を HPTEC にリポフェクティンで導入後 24 時間に、L-FABP の想定リガンドである PPAR- γ 活性化薬 (5 μ M PGJ₂) を添加して、PPRE 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 低酸素刺激下での GR, PAI-1, VEGF の発現の解析

培養ヒト近位尿細管上皮細胞 (HPTEC) において、GR の mRNA 発現と蛋白発現を確認した。低酸素下では、GR mRNA 量は有意に変化しなかった。イムノブロット法による GR 蛋白量も低酸素下と正常酸素下で変化はなかった。低酸素刺激は、PAI-1 発現と VEGF 発現を mRNA 量でも培養上清蛋白量でも、24 時間後でも、48 時間後においても有意に増加した (図 1、2)。

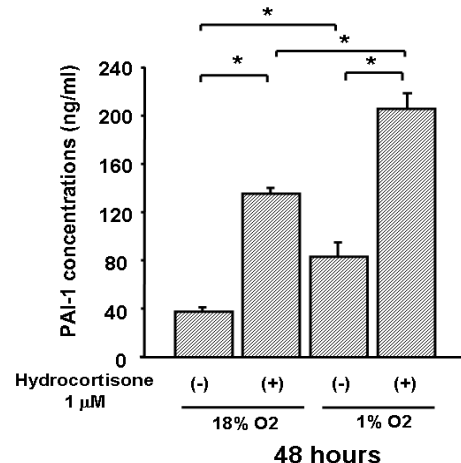


図 1. Hydrocortisone (HC) は正常・低酸素下の PAI-1 産生を亢進する。 (*P<0.001)。

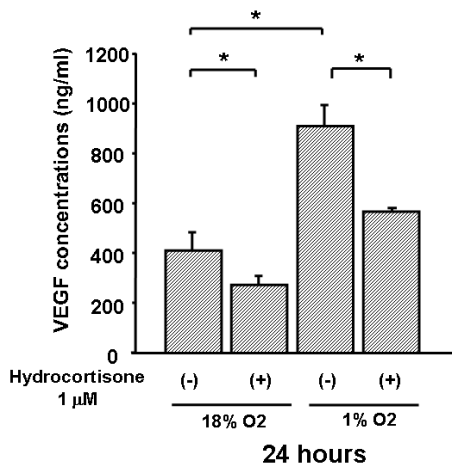


図2. Hydrocortisone (HC) は正常・低酸素下の VEGF 産生を減弱する。 (* $P < 0.001$)。

(2) GR アゴニストの GR、PAI-1、VEGF、L-FABP 発現への影響の解析

DEXA (1 μ M) では、GR mRNA が増加する傾向を示した ($P < 0.08$)。GR 活性化薬の HC (1 μ M) は、PAI-1 mRNA 量を刺激後 6 時間をピークに 48 時間まで、有意に増加した。HC (1 μ M) は上清 PAI-1 蛋白量を有意に増加させた (図 1)。DEXA (0.1 μ M) も、PAI-1 発現を増強させた。また、HC (1 μ M) は、低酸素誘導性の PAI-1 発現を mRNA 量でも蛋白量でも、さらに有意に増強した (図 1)。正常酸素下の HC の PAI-1 発現誘導作用は、GR 特異的阻害薬 (RU-486, 1 μ M) で完全に抑制され、ミチランコチン受容体阻害薬 (スピロラクトン; 2 μ M) では抑制されなかったため、GR 依存性と考えられた。HC の PAI-1 発現増強作用は、Herbimycin A で部分的に抑制されたため、一部チロシナーゼの活性化を介するものと推測された。VEGF 発現については、HC、DEXA とともにその発現を抑制した。HC は、低酸素誘導性の VEGF 発現も抑制した。HC の VEGF 発現抑制作用は GR 非依存性であった。

肝型 FABP (L-FABP) の mRNA 発現は、DEXA (1、5 μ M) により有意に抑制 (41% と 56%) された。

(3) PPAR 発現とその機能の検討

HPTEC において、PPAR の mRNA 発現と蛋白発現を確認した。HPTEC に PPRE-luc 発現ベクターを導入して、代表的な PPAR- γ 活性化薬である pioglitazone (Pio), 15d-PGJ2 (PGJ2) で 20 時間程度刺激したところ、両者ともに約 6 倍程度の PPRE 活性の増強が認められた (図 1)。また、PPAR- γ 活性化作用を有すると報告されるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の telmisartan (Telm) でも PPRE 活性の 3.5 倍程度の増加が確認できた (図 1)。

24 時間の Pio (3 μ M) 刺激は、PPAR- γ の標的遺伝子である心型 (H-)・肝型 (L-) 脂肪酸結合蛋白 (FABP)、liver X 受容体- α (LXR- α) の

mRNA 発現を増強した。H-FABP mRNA は 2.3 倍に、L-FABP mRNA は 2.4 倍に増加し、LXR- α mRNA は 1.2 倍に増加した。24 時間の Telm (10 μ M) 刺激は、H・L-FABP 発現には影響しなかったものの、LXR- α 発現を 1.4 倍に増強した。腎障害に関与するサイトカイン (TNF- α と TGF- β) の PPAR- γ と標的遺伝子の mRNA 発現への影響を検討したところ、24 時間の TNF- α 刺激では PPAR- γ が 43%、L-FABP が 90%、H-FABP が 60% 減少した (図 2)。TGF- β (5 ng/ml) 刺激でも、L-FABP は 90% 以上、H-FABP は 80% 減少した。炎症、線維化を誘導するとされるサイトカインは、HPTEC に内在する PPAR- γ 経路を変容あるいは減弱する可能性が示された。

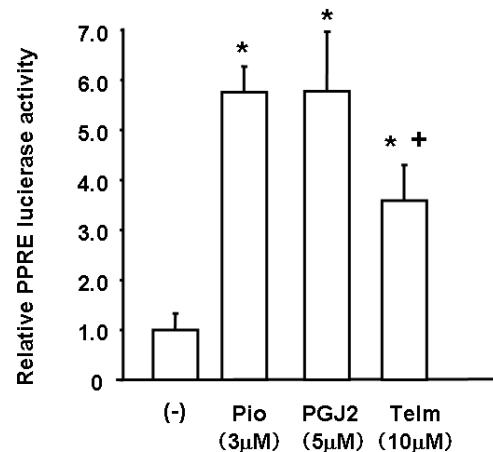


図3. PPAR- γ 活性化薬は PPRE-luc 発現を増強する。 (* $P < 0.001$ vs. control, + $P < 0.05$ vs. Pio and PGJ2)

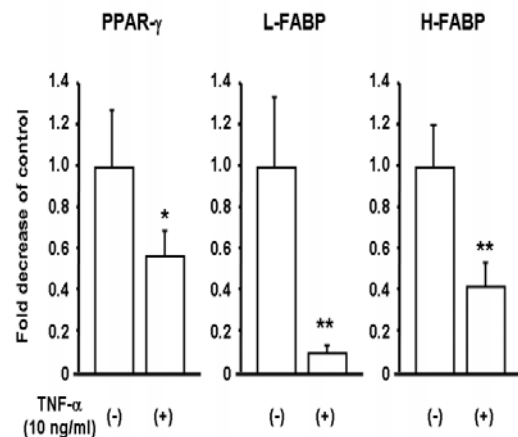


図4. TNF- α は PPAR- γ 、FABP の mRNA 発現を減弱する。 (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. control)

(4) L-FABP 発現の PPRE 活性への影響の検討

HPTEC では、L-FABP の mRNA 発現量が少な

かったため、L-FABP 発現ベクターにより、その蛋白発現の増強を試みた。その結果、同 mRNA は 1000 倍程度に増強した。L-FABP の過剰発現は、PGJ2 の PPRE 活性を約 20%程度増強した。

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 6 件)

- ① Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Kamiyama K, Mikami D, Takahashi N, Yoshida H : Dexamethasone enhances basal and TNF- α -stimulated production of PAI-1 via the glucocorticoid receptor regardless of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 status in human proximal renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Jan 18. [Epub ahead of print] 査読有
- ② Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Takahashi N, Fujii H, Ishihara S and Yoshida H: A natural PPAR- γ agonist, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2, may act as an enhancer of PAI-1 in human proximal renal tubular cells under hypoxic and inflammatory conditions. *Nephrol Dialysis Transplant.*, 23:2496-2503, 2008, 査読有
- ③ Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ookoshi T, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H: Growth of beta(2)-microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH. *Biochem J*. 416:307-315, 2008 査読有
- ④ Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H. : Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol Dial Transplant*. 23:3247-3255, 2008, 査読有
- ⑤ Li X, Kimura H, Hirota K, Sugimoto H, Kimura N, Takahashi N, Fujii H, Yoshida H: Hypoxia reduces the expression and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human proximal renal tubular cells. *Nephrol Dialysis Transplant* 22:1041-1051, 2007, 査読有
- ⑥ Katano K, Kimura H (9 番目), Yoshida H (10 番目): Endocapillary proliferative glomerulo-nephritis with crescent formation and concurrent tubulointerstitial nephritis complicating retroperitoneal fibrosis with a high serum level of IgG4. *Clin Nephrol*. 68:

308-314, 2007, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kimura Hideki, Pro-fibrotic and anti-angiogenic effects of glucocorticoids in human proximal renal tubular cells under hypoxic conditions. The American Society of Nephrology Renal Week 2008, Nov. 5, 2008, Philadelphia, USA.
- ② Hideki Kimura, Adrenal Steroids Enhance the Hypoxia-Induced Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Via Their Specific Receptors Independently of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases (HSDs) in Human Proximal Renal Tubular Epithelial Cells (HPRTs). The American Society of Nephrology Renal Week, Nov. 1, 2007, San Francisco, USA.
- ③ Hideki kimura, Serum Levels of Small Dense Low Density Lipoprotein-Cholesterol (sdLDL-C) and Total Homocysteine (tHcy) Are Independently and Positively Associated with Serum Levels of Lysophosphatidic Acid (LPA) and Lysophosphatidyl Choline (LPC) in Hemodialysis (HD) Patients. The American Society of Nephrology Renal Week, Nov. 2, 2007, San Francisco, USA .
- ④ Naoki Takahashi, The Relationship between Plasma Concentrations of Lysophospholipids (LPLs) and Dialysis-Related Amyloidosis in Hemodialysis Patients. The American Society of Nephrology Renal Week 2008, Nov. 6, 2008, Philadelphia, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 秀樹 (KIMURA HIDEKI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：20283187

(2) 研究分担者

吉田 治義 (YOSHIDA HARUYOSHI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：80135574
藤井 博 (FUJII HIROSHI)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：90165340
広田 喜一 (HIROTA KIICHI)
京都大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00283606
(平成 20 年度：連携研究者)
菅谷 健 (SUGAYA TAKESHI)
東京歯科大学・歯学部・客員講師
研究者番号：40381561
(平成 20 年度：連携研究者)