

機関番号： 14301
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2008~2010
課題番号： 20590955
研究課題名 (和文)
非ペプチド性生体内有機化合物による上皮形質誘導保持作用の分子機構の解明
研究課題名 (英文)
Molecular mechanism of epithelialization by non-peptide, endogenous siderophores
研究代表者
森 潔 (MORI KIYOSHI)
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授
研究者番号： 60343232

研究成果の概要 (和文)：

neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal or LCN2) の腎保護効果は大腸菌 siderophore により増強される [J Clin Invest 2005]。mammalian siderophore は catechol 及びその誘導体であり、catechol は生体内の鉄分布を調節する [Nat Chem Biol 2010]。Ngal は腎虚血再灌流障害に対しては保護的、腎垂全摘後腎肥大に対しては腎障害的に働く [J Clin Invest 2010]。尿中 Ngal は腎臓での産生・白血球からの放出・近位尿細管での再吸収不全にて規定される [Kidney Int 2009]。尿中 Ngal は慢性腎臓病の病勢・治療効果の評価に有用である [Nphol Dial Transplant 2009]。Ngal reporter mice により Ngal 発現の時間的空間的発現制御、疾患治療薬による発現変化をリアルタイムに可視化できる [Nat Med 2011]。

研究成果の概要 (英文)：

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal or LCN2) has a renoprotective activity, which is enhanced by the presence of enterochelin, an *E. coli*-derived siderophore [Mori et al. J Clin Invest 2005]. Purification of mammalian siderophores lead to identification of catechol and its derivatives [Bao et al. Nat Chem Biol 2010]. Catechol largely affects tissue distribution of iron in mammals. Ngal plays a renoprotective role in renal ischemia-reperfusion injury, whereas enhances renal hypertrophy and kidney injury in 3/4 subtotal nephrectomy [Viau et al. J Clin Invest 2005]. Urinary Ngal levels are determined by renal synthesis, release from neutrophils, and impaired reabsorption at proximal tubules [Kuwabara et al. Kidney Int 2009]. Urinary Ngal is useful for the evaluation of disease severity and treatment efficacy of chronic kidney disease [Kasahara et al. Nephrol Dial Trasplant 2009]. Ngal reporter mice allow real-time visualization of spatiotemporal regulation of Ngal expression, and its changes by treating reagents [Paragas et al. Nat Med 2011].

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研ひの分科・細目： 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード： 腎臓学、生体分子、鉄、有機化学、腎不全、リポカリン、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

申請者はラット胎児腎臓における分化誘導因子として neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal)を同定した(Yang, Mori et al. Mol Cell 2002)。さらに Ngal には腎保護作用があること、Ngal の腎分化誘導能、腎保護能は鉄結合性化合物 siderophore の共存により著しく増強されることを明らかにして(Mori et al. J Clin Invest 2005)、Ngal:siderophore:Fe 複合体が鉄代謝に関わる新しい細胞機能調節因子である可能性を提唱した(Barasch and Mori, Nature 2004; Mori and Nakao, Kidney Int 2007)。また鉄濃度の低い条件下では、Ngal 蛋白が鉄キレート剤として働き、細胞のアポトーシスを誘導することを報告した(Lee, Mori et al. J Immunol 2007)。そこで本研究では申請者らが最近同定に成功した mammalian siderophore を用いて、その生体内での分布・代謝動態、鉄代謝への影響を検討すると共に、Ngal 欠損マウスを用いて mammalian siderophore:Ngal 蛋白複合体の上皮細胞、腎臓への作用を解析した。

2. 研究の目的

本研究では siderophore による上皮形質誘導保持作用の分子機構を解明するために、① mammalian siderophore の同定及び生体内鉄代謝における意義の解明、②遺伝子改変動物を用いた Ngal の上皮細胞・腎臓への作用の解析、③Ngal の生体内での発現調節・分布・代謝・排泄に関する検討を行った。

3. 研究の方法

Mammalian siderophore の同定には正常のマウスおよびヒトの尿を材料に、retention assay と名づけた siderophore 測定法(Mori

et al. J Clin Invest 2005)、X線結晶構造解析、蛍光リガンド法などを用いた。

急性腎障害のマウスモデルとして腎虚血再灌流障害、慢性腎不全のモデルとして 3/4 腎全摘を用い、Ngal 遺伝子破壊やリンコンビナント Ngal の影響とその分子機構を検討した。

マウスの糸球体、近位尿細管、遠位ネフロンを障害する病態を作成し、Ngal の産生、分泌、再吸収、排泄動態を検討した。また腎疾患患者における血中、尿中 Ngal を ELISA 法にて測定し、慢性腎臓病における測定の臨床的意義を検討した。腎臓における Ngal 発現の時間的空間的な解析には Ngal プロモーターの下流に蛍光リポーターを接続させたコンストラクトを作成し、遺伝子相同組み換えにより knockin マウスを樹立した。

4. 研究成果

(1) 【mammalian siderophore の同定及び生体内鉄代謝における意義の解明】

Retention assay と名付けた siderophore 測定法、化学的スクリーニング、X線結晶構造解析、蛍光リガンド法などにより、マウス及びヒトの尿中より mammalian siderophore の精製、分子量決定、構造推定を行った結果、mammalian siderophore は catechol 及び非常に多彩なその誘導体化合物群であることが明らかとなった[Bao, Mori et al. Nat Chem Biol 2010]。Ngal:catechol:Fe-55 の triple complex をマウスに腹腔内投与すると、主に腎近位尿細管の内腔側に Fe-55 の集積を認めた。一方、クエン酸:Fe-55 を投与すると主に肝臓に集積した。以上のことより mammalian siderophore は生体内で鉄の分布の恒常性維持に関与しているものと考えられた。

(2) 【遺伝子改変動物を用いた Ngal の上皮細胞、腎臓への作用の解析】

まず急性腎不全のモデルとして、C57BL/6 background の野生型マウスにおいて Ngal 蛋白:enterochelin:Fe 複合体の腹腔内投与は腎虚血再灌流障害を軽減させたが[Mori et al. J Clin Invest 2005]、Ngal の作用には近位尿細管への鉄の運び入れ、尿細管細胞の増殖促進・アポトーシス抑制、細胞保護的な heme oxygenase-1 の発現誘導、N-cadherin の分解抑制などが関わっていると考えられた。次に慢性腎不全のモデルとして、FVB/N background のマウスで 3/4 腎全摘を検討した。野生型マウスでは、EGF 受容体活性化により HIF1 α 依存性に Ngal 発現が誘導され、代償性の尿細管細胞増殖を惹起し炎症細胞浸潤が遷延して腎障害が進行するが、Ngal KO マウスでは腎障害が軽度であった[Viau, Mori et al. J Clin Invest 2010]。癌およびインスリン抵抗性に対する Ngal の作用が context-dependent であることが知られているが、腎臓への作用についても同様であると考えられた。

(3) 【Ngal の生体内での発現調節・分布・代謝・排泄に関する検討】

マウスの糖尿病性腎症や一側尿管結紮を詳細に検討した結果、尿中 Ngal 濃度は腎臓での Ngal 産生・白血球からの Ngal 分泌・近位尿細管での血液由来 Ngal の再吸収不全などにて規定されることを報告した[Kuwabara, Mori et al. Kidney Int 2009]。高血圧症に対するレニン・アンジオテンシン系降圧薬での治療、あるいは慢性糸球体腎炎に対するステロイド治療により尿中 Ngal が鋭敏に減少し、慢性腎不全の病勢・治療薬の効果の評価に有用であると考えられた[Kasahara, Mori et al. Nephrol Dial Transplant 2009]。Ngal の転写調節領域にレポーターを連結して Ngal reporter mice を樹立したところ、腎虚血再灌流障害やシスプラチン腎症の惹起にて、速やかに腎臓でのレポーターの発現が誘導された[Paragas et al. Nat Med 2011]。またレポーターマウス由来の腎尿細管培養細胞では、細菌感染や細胞障害により Ngal レポーターがオンとなり、抗生物質や NF κ B 阻害薬の添加によりオフとなったため、Ngal 発現量の増減をリアルタイムに可視化することができた。

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 21 件、英文誌 12 報は査読あり。*corresponding author)

1. N Paragas, A Qiu, Q Zhang, B Samstein, SX Deng, KM Schmidt-Ott, M Viltard, W Yu, CS Forster, G Gong, Y Liu, R Kulkarni, K Mori, A Kalandadze, AJ Ratner, P Devarajan, DW Landry, V D'Agati, CS Lin, and J Barasch. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. Nat Med 17:216-222, 2011.

2. K Mori*, M Mukoyama, and K Nakao. Searching for novel intercellular signal-transducing molecules in the kidney and their clinical application. Clin Exp Nephrol 14:523-527, 2010.

3. A Viau, K El Karoui, D Laouari, M Burtin, C Nguyen, K Mori, E Pillebout, T Berger, TW Mak, B Knebelmann, G Friedlander, J Barasch, and F Terzi. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. J Clin Invest 120:4065-4076, 2010.

4. G Bao, M Clifton, TM Hoette, K Mori, SX Deng, A Qiu, M Viltard, D Williams, N Paragas, T Leete, R Kulkarni, X Li, B Lee, A Kalandadze, AJ Ratner, JC Pizarro, KM Schmidt-Ott, DW Landry, KN Raymond, RK Strong, and J Barasch. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. Nat Chem Biol 6:602-609, 2010.

5. H Yokoi, M Kasahara, M Mukoyama, K Mori, K Kuwahara, J Fujikura, Y Arai, Y Saito, Y Ogawa, T Kuwabara, A Sugawara, and K Nakao. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. Nephrol Dial Transplant 25:2120-2124, 2010.

6. T Kuwabara, K Mori*, M Mukoyama, M Kasahara, H Yokoi, Y Saito, T Yoshioka, Y Ogawa, H Imamaki, T Kusakabe, K Ebihara, M Omata, N Satoh, A Sugawara, J Barasch, and K Nakao. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal and distal nephrons. Kidney Int 75:285-294, 2009.

7. M Kasahara, K Mori*, N Satoh, T Kuwabara, H Yokoi, A Shimatsu, A Sugawara, M Mukoyama, and K Nakao. Reduction in urinary excretion of

neutrophil gelatinase-associated lipocalin by angiotensin receptor blockers in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 24:2608-2609, 2009.

8. LT Zheng, S Lee, GN Yin, K Mori, and K Suk. Down-regulation of lipocalin 2 contributes to chemoresistance in glioblastoma cells. *J Neurochem* 111:1238-1251, 2009.

9. S Lee, JY Park, WH Lee, H Kim, HC Park, K Mori, and K Suk. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *J Neurosci* 29:234-249, 2009.

10. T Nagae, K Mori*, M Mukoyama, M Kasahara, H Yokoi, T Suganami, K Sawai, T Yoshioka, M Koshikawa, Y Saito, Y Ogawa, T Kuwabara, I Tanaka, A Sugawara, T Kuwahara, and K Nakao. Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int* 74:70-80, 2008.

11. TL Nickolas, MJ O'Rourke, J Yang, ME Sise, PA Canetta, N Barasch, C Buchen, F Khan, K Mori, J Giglio, P Devarajan, and J Barasch. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 148:810-819, 2008

12. H Yokoi, M Mukoyama, K Mori, M Kasahara, T Suganami, K Sawai, T Yoshioka, Y Saito, Y Ogawa, T Kuwabara, A Sugawara, and K Nakao. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int* 73:446-455, 2008.

1. 森 潔*, 栗原孝成, 今牧博貴, 笠原正登, 川西智子, 横井秀基, 向山政志, 中尾一和. 急性腎障害(AKI)の診療: Ngal. *Modern Physician* 31: 87-89, 2011. (新興医学出版社)

2. 森 潔*, 中尾一和. 急性腎障害のバイオマーカー. *腎疾患透析 最新の治療* 2011-2013. pp. 295-298, 2011. (南江堂)

3. 森 潔*, 向山 政志, 中尾一和. 微生物の鉄捕捉分子と生体の防御機構. *日本内科学会雑誌* 99: 1188-1193, 2010. (日本内科学会)

4. 森 潔*, 向山政志, 中尾一和. AKI・急性腎不全の早期診断マーカーの開発. *日本腎臓学会誌* 52: 566-571, 2010. (日本腎臓学会)

5. 森 潔*, 栗原孝成, 今牧博貴, 川西智子, 笠原正登, 横井秀基, 向山政志, 中

尾一和. 新規バイオマーカー尿中Ngalによる慢性腎臓病の重症度、治療効果及び予後の評価. *腎臓* 33: 109-112, 2010. (日本腎臓財団)

6. 森 潔*, 向山政志, 中尾一和. AKIの診断・バイオマーカー (AKIとCKDのすべて). *腎と透析* 69: 341-343, 2010. (東京医学社)

7. 森 潔*, 向山政志, 中尾一和. siderophore結合蛋白の生物学——分化誘導、組織障害、癌、感染、造血の新しい接点——. *臨床血液* 50: 519-526, 2009. (日本血液学会)

8. 森 潔*, 向山政志, 栗原孝成, 笠原正登, 横井秀基, 中尾一和. CKDにおける新規バイオマーカーNgalの意義. *日本臨牀* 67: 1233-1241, 2009. (日本臨牀社)

9. 森 潔*, 向山政志, 中尾一和. 多彩な生命現象に関わる鉄結合性小化合物 siderophoreの意義. *細胞工学* 27: 226-230, 2008. (秀潤社)

[学会発表] (計 23 件)

1. K. Mori et al. Mechanism of albuminuria in diabetic nephropathy -- urinary intact albumin and incomplete tubular compensation model. 日本糖尿病学会学術集会 (招待講演) 2010年5月28日. 岡山

2. H. Imamaki, K. Mori et al. Reverse epidemiology of circulating Ngal (or lipocalin 2) levels in end-stage renal disease. International Society of Nephrology (ISN) Nexus Symposium. April 17, 2010. Kyoto, Japan

3. K. Mori et al. The kidney and neutrophil as the sources of an acute kidney injury biomarker Ngal. International Society of Nephrology (ISN) Nexus Symposium. April 17, 2010. Kyoto, Japan

4. K. Mori et al. Incomplete tubular compensation model for albuminuria in diabetic nephropathy. International Society of Nephrology (ISN) Nexus Symposium. April 16, 2010. Kyoto, Japan

5. K. Mori et al. How can we improve renal outcome by use of heart hormones? International Meeting of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (招聘講演) April 1, 2010. Nara, Japan

6. H. Imamaki, K. Mori et al. Association of Serum Neutrophil-Gelatinase Associated Lipocalin Levels with Nutritional Status and Circulating White Blood Cell Counts in Maintenance Hemodialysis Patients. *Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (CVEM)*. April 1, 2010. Nara, Japan

7. K. Mori et al. Neutrophils are the predominant source of circulating Ngal in normal conditions and during infection, but not in acute kidney injury. International Congress of Endocrinology (ICE). March 30, 2010. Kyoto, Japan

8. J. Barasch, K. Mori et al. The kidney is an exocrine organ: Rapid expression of NGAL defends the urinary tract. International Congress of Endocrinology (ICE). March 29, 2010. Kyoto, Japan

9. H. Imamaki, K. Mori et al. Nutritional status but not iron determines serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) levels in maintenance hemodialysis patients. International Congress of Endocrinology (ICE). March 28, 2010. Kyoto, Japan

10. M. Kasahara, K. Mori et al. Angiotensin receptor blocker (ARB) reduces urinary concentrations of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) in diabetes and obesity. International Congress of Endocrinology (ICE). March 28, 2010. Kyoto, Japan

11. 森 潔. 尿中バイオマーカーによる急性腎障害、慢性腎臓病の新しい考え方. 日本臨床化学会近畿支部総会 (招待講演) 2009年12月26日. 大阪

12. H. Imamaki, K. Mori et al. Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Levels are Determined by Nutritional Status and White Blood Cell Counts but Not by Iron in Maintenance Hemodialysis Patients. American Society of Nephrology (ASN). Oct. 31, 2009. San Diego, USA

13. N. Paragas, K. Mori et al. Renal Medullary NGAL Is Essential To Suppress Urinary Tract Infection. American Society of Nephrology (ASN). Oct. 30, 2009. San Diego, USA

14. K. Mori et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Urinary Biomarker of Diabetic Nephropathy and its Response to Angiotensin Receptor Blocker. The Endocrine Society (ENDO). June 12, 2009. Washington, DC; USA

15. 森 潔. 腎臓における新規細胞間情報伝達分子の探索と臨床応用. 日本腎臓学会学術集会 (招待講演) 2009年6月3日. 横浜

16. K. Mori et al. Urinary Excretion of an AKI Biomarker Ngal is Increased in Diabetic Nephropathy by Impaired Tubular Reabsorption, Which Can Be Attenuated by Angiotensin Receptor Blockade. World Congress of Nephrology (WCN). May 25, 2009.

Milan, Italy

17. A. Viau, K. Mori et al. Progression of renal lesions after nephron reduction: role of lipocalin 2. American Society of Nephrology (ASN). Nov. 8, 2008, Philadelphia

18. T. Kuwabara, K. Mori et al. Reduction of urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) by angiotensin receptor blockers (ARBs) in diabetic or obese subjects. American Society of Nephrology (ASN). Nov. 8, 2008, Philadelphia.

19. 森 潔ほか. siderophore結合蛋白の生物学へ分化誘導、組織障害、癌、感染、造血の新しい接点へ. 日本血液学会学術総会 (招聘講演) 2008年10月10日. 京都

20. K. Mori et al. Urinary Ngal is a kidney injury biomarker which integrates information of damage in glomeruli, proximal tubules and distal nephrons. International Society of Hypertension (ISH). Jun. 19, 2008, Berlin.

21. T. Nagae, K. Mori et al. Adrenomedullin gene transfer in rat kidney inhibits connective tissue growth factor, extracellular signal-regulated kinase, and renal fibrosis. The Endocrine Society (ENDO). June 16, 2008, San Francisco.

22. 森 潔ほか. 尿中Ngal濃度の解析から考えられる理想の腎障害マーカー像 : Kidney Biomarkerology. 日本腎臓学会学術集会 (招聘講演) 2008年6月1日. 福岡

23. K. Mori et al. Urinary Ngal as an early biomarker for diabetic nephropathy in mice. The Shiga International Symposium on Diabetic Nephropathy. Mar. 20, 2008, Otsu, Japan

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/jpn/research/kidney.html>

6. 研究組織

研究代表者

森 潔 (MORI KIYOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・特定准教授

研究者番号 : 6 0 3 4 3 2 3 2