

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590961

研究課題名（和文）

慢性腎臓病進展における TRPC6、NFκB、NFAT の分子連関の役割の解明

研究課題名（英文）

The study on the molecular relationships between TRPC6, NFκB, and NFAT in the progress of chronic kidney diseases

研究代表者

林 松彦 (HAYASHI MATSUHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60129608

研究成果の概要（和文）：

慢性腎臓病の進展機序解明のために、先天性巣状糸球体硬化症の原因遺伝子として同定され、後天性疾患においてもその役割が示唆されている TRPC6 と、その情報伝達に関わる NFAT、NFκB の役割をラットの腎障害モデルで検討した。その結果、最近、慢性腎臓病進行を促進することが示されているアルドステロンによる腎障害モデルでは NFκB 活性化抑制薬が腎障害進行を軽減したが、TRPC6、NFAT の関与は明らかではなかった。以上より、NFκB 活性化が一部の慢性腎臓病において重要な役割を果たし、その阻害薬が治療に有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the mechanisms of progression of chronic kidney diseases, the roles of TRPC6, which was reported to be a causative gene for one type of congenital focal segmental sclerosis and related some forms of renal diseases, and NFAT and NFκB, TRPC6-related signal transduction protein, were examined in the rat models of renal diseases. The inhibitor of NFκB ameliorated renal impairment by aldosterone, which is recently reported to play a role in the renal injury of chronic kidney diseases, whereas TRPC6 and NFAT did not show significant changes. In the present study, it was suggested that NFκB activation plays important roles in certain types of kidney diseases and its inhibitor may be a candidate for the treatment of chronic kidney disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、腎臓学

キーワード：慢性腎臓病、NFκB、NFAT、TRPC6

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病から腎不全にいたり透析導入となる患者数は年間 3 万人を越え患者総数は 25 万人以上となり、臨床的にも、医療経済面でも重要な問題となっている。レニン・アンジオテンシン系の阻害薬が一定の効果を示し、慢性腎臓病進行進行を非常に抑制できる

ようになってはいるが、治癒させることはできず、新たな治療薬の開発が重要な課題である。一方、TRPC6 は先天性巣状糸球体硬化症によるネフローゼ、腎不全を生じる原因遺伝子として同定され、その臨床面での重要性を指摘する報告も見られてきていた。

2. 研究の目的

慢性腎臓病の進展抑制に有効な治療薬を開発するために、その進展における TRPC6 の役割を検討することを目的とした。さらに、TRPC6 活性化により細胞内カルシウム濃度が上昇し、calcineurin、さらにその下流にある NFAT の活性化が想定されたことから、その変化も合わせて検討した。一方、NFκB は様々な炎症性サイトカイン刺激により活性化される情報伝達物質であり、これまでも我々の検討により腎障害進行に重要な役割を果たすことが示されてきた。様々な病態において、この NFκB と NFAT が連関する可能性が指摘されており、上記に加えて TRPC6、NFAT との分子連関を明らかとして慢性腎臓病治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アルドステロン持続注入ラットにおける検討

雄 Wistar ラット 6 週齢を購入し、代謝ケージに入れ、実験を行った。ラットをケージに慣れさせるため、3-4 日間飼育後、血圧、尿量等の基礎値を測定した。その後、ラットの片腎を摘出、同時にアルドステロン含有 (0.75μg/h で持続投与となる濃度にて) の osmotic minipump を背部に包埋した。飲料水として、0.9%NaCl 水を与えた。餌は 1 日 20 g に制限し、spironolactone (200mg/kg BW)、IMD1041 (100mg/kg BW、医薬分子設計株式会社より供与) を混餌により投与した。1 週毎に血圧、尿量、尿蛋白量を測定し、手術 3 週後以降に屠殺して、血液、腎臓を採取した。採取した腎臓は病理標本作製、凍結切片作成および RNA と蛋白抽出に供した。

腎組織は Masson-trichrome 染色を行い、腎糸球体硬化、間質線維化について観察し、scoring を行った。また、凍結切片は、angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)、meqalin に対して蛍光染色を行った。抗体はいずれも市販のものを用いた。腎組織から Western blotting を行うために、細胞質蛋白と各蛋白を各々抽出した。その後、細胞質蛋白を用いて ACE2 を、核蛋白を用いて Sp1 と p65 を、各々の Western blotting を行い、画像解析ソフトにより定量化した。採取した尿において、尿蛋白排泄量の測定を行った。また、腎組織から抽出した RNA を用いて real-time PCR 法により、fibronectin、collagen type I、osteopontin、PAII、TRPC6 を各々同定した。

(2) 慢性腎炎モデルにおける検討

アルドステロン注入の実験と同様にラットを代謝ケージに入れ飼育した。先ず、片腎摘出を行い、その 1 週間後に基礎値を測定後、抗 Thy1.1 抗体 (新潟大学医学部河内教授供与) を尾静脈より投与した。その後毎週血圧、体重、尿量を測定し、8 週後に屠殺して腎組

織を採取した。腎組織は病理標本作製、蛋白・RNA 抽出に供した。腎組織は Masson-trichrome 染色を行い、腎糸球体硬化、間質線維化について観察し、scoring を行った。腎組織から各蛋白を抽出して、p65、NFATc1 に対して Western blotting を行った。採取した尿において、尿蛋白排泄量の測定を行った。また、抽出した RNA に対して、アルドステロンモデルと同様に real-time PCR 法により各 mRNA 発現量を定量化した。

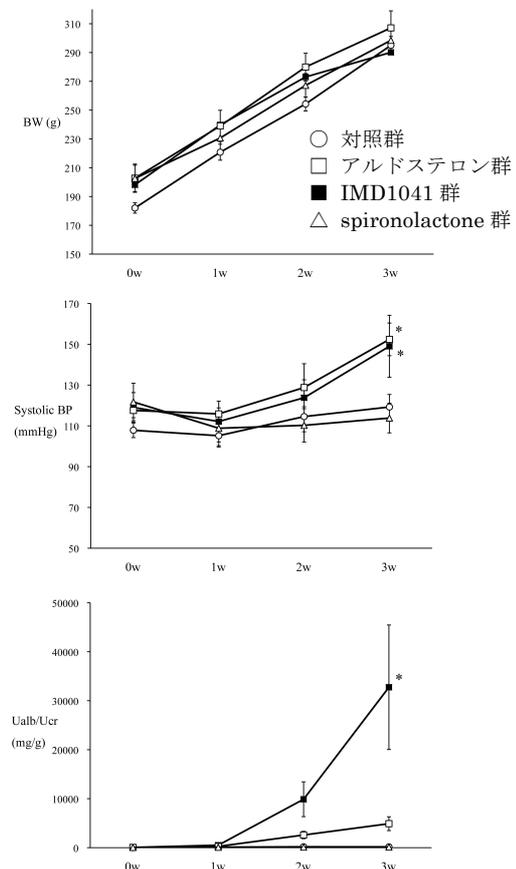
(3) TRPC6、dnNFAT の足細胞特異的強制発現マウスの作成

マウスの TRPC6、および dnNFAT (マウス NFAT3 のアミノ酸 1-130 より構成され、NFAT 活性化に対して dominant negative な作用を有する; Mol Cell Biol 19:2300,1999)、の各 cDNA に標識蛋白である FLAG の cDNA をつなぎ、promotor として hNPHS2 (足細胞特異的発現 promotor; J Am Soc Nephrol 14: 1998, 2003) を加えたベクターを作成した。その後、マウス受精卵を用いて通常通りの方法により各強制発現マウスを作成した。その後、スクリーニングを行い、mRNA 発現量が明らかに増加しているマウスを選択した。

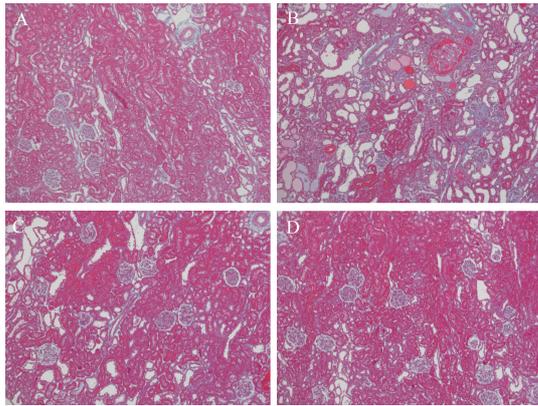
4. 研究成果

(1) アルドステロン持続注入ラットにおける検討

アルドステロン持続注入により、血圧、尿アルブミンとともに投与 3 週後に有意の上昇を示した。



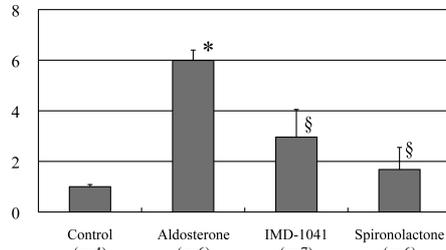
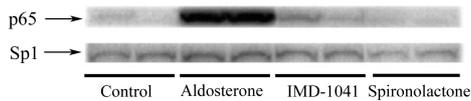
尿中アルブミン排泄量は IMD-1041 投与において有意の低下を示したが、血圧には有意の変化を与えなかった。



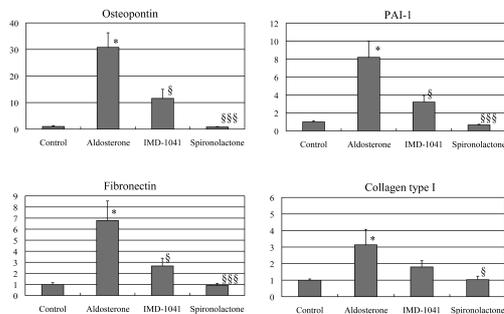
A:対照群、B:アルドステロン群、C:IMD-1041群、D:スピロノラクトン群

また、Masson trichrome 染色により腎の組織変化を検討したが、アルドステロンによる腎障害は IMD-1041、および spironolactone により著しく改善した。

さらに、NFκB 活性を核蛋白分画の p65 蛋白量により検討した。

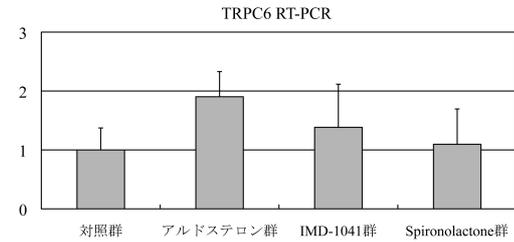


その結果、図に示した通り、p65 はアルドステロンにより、有意の増加を示し、IMD-1041 投与、spironolactone 投与により有意の減少を示した。腎線維化あるいは炎症に關与するサイトカインなどの mRNA を real time PCR 法により検討した。

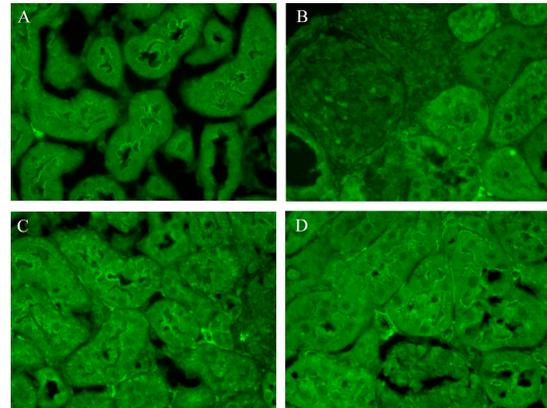


Osteopontin、Fibronectin、PAI-1、Collagen type 1 の各 mRNA はアルドステロンにより増加し、

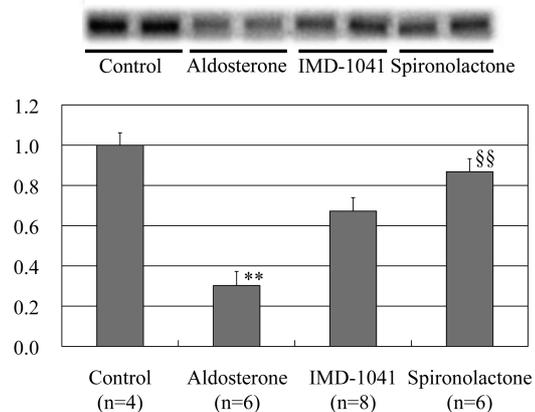
IMD-1041、spironolactone により有意に減少した。一方、TRPC6 は 4 群間で有意の変化を示さなかった。



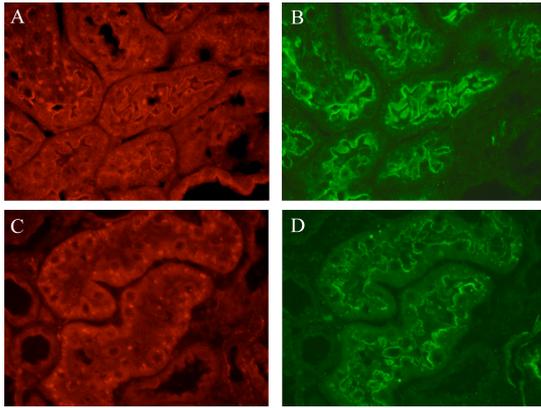
ACE2 の蛍光抗体法による染色結果を下図に示したが、アルドステロンにより管腔膜側の ACE2 染色は減弱し、IMD-1041、spironolactone 投与により改善した。



A:対照群、B:アルドステロン群、C:IMD-1041群、D:spironolactone 群



ACE2 の蛋白発現量変化は、Western blotting によっても確認された。上図に示したように Aldosterone 投与により有意の減少を生じ、IMD-1041 投与群では対照群と有意差はなく、また、spironolactone によりほぼ対照群と同世の値となった。



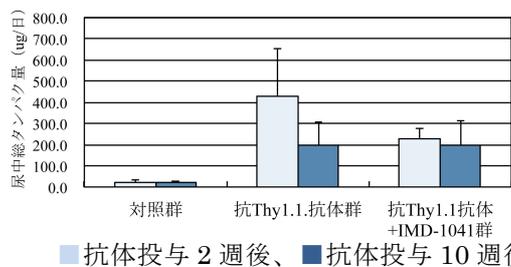
A, C: ACE2、B, D: megalin
A, B: 対照群、C, D: アルドステロン群

管腔膜の破壊による ACE2 発現低下の可能性を考慮して、近位尿細管管腔膜の指標である megalin と ACE2 の 2 重染色を行ったところ、megalin の染色性に 2 群間で有意差を認めず、ACE2 が特異的に発現低下していることが示された。

以上の結果から、アルドステロンにより腎の NFκB 活性化を生じることが示された。NFκB 活性化阻害薬である IMD-1041 がこのアルドステロンによる NFκB 活性化を抑制し、血圧を変化させることなく腎障害を改善したことから、NFκB 活性化が組織障害に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、ACE2 発現もアルドステロンにより減弱し、組織障害に ACE2 が何らかの役割を果たすことが示唆されたが、この点は、さらなる検討を要する。一方、TRPC6 の発現量はアルドステロンにより増加傾向を認めるも有意ではなく、少なくともこのモデルでは腎障害に TRPC6 が重要な役割を果たすことは否定的であった。

(2) 慢性腎炎モデルにおける検討

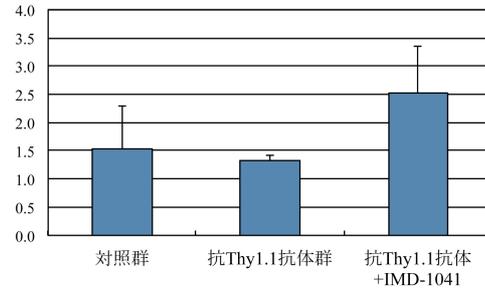
片腎摘出後抗 Thy1.1 抗体を投与すると、1 週間後位から尿蛋白が増加し、その後一時減少した後に再び増加することが知られている。今回の研究においても、同様の傾向が見られた。



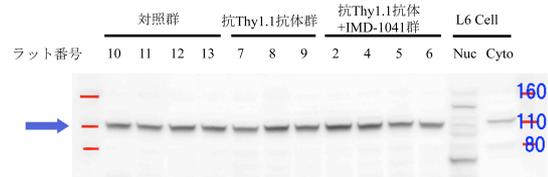
1 日尿蛋白量は、図に示したように、抗体投与群で、2 週間、10 週間ともに増加を示した。

抗体投与に加え、IMD-1041 投与により、2 週目の尿蛋白は少ない傾向が見られたが、10 週後に差異はみられず、慢性期には NFκB 活性化が重要な役割を果たしていないことが示唆された。

さらに、NFκB 活性化の状態と NFAT 活性化の可能性を検討、確認するために核蛋白を用いて Western blotting を行った。



図に示したように、核蛋白内での p65 の量は、SP1 に対して補正した状態において、対照群、抗 Thy1.1 抗体投与群、IMD-1041 投与群の 3 群間で有意の差を認めなかった。



上図に示したように NFAT3 の核蛋白における発現量に 3 群間で差異を認めず、これらの結果から、本腎炎モデルでは NFκB 活性化、NFAT 活性化ともに重要な役割を果たしていないことが示された。

(3) TRPC6、dnNFAT の足細胞特異的強制発現マウスの作成

TRPC6 強制発現マウスのスクリーニングを行い、DNA を尾から抽出して、遺伝子導入に成功したマウスを選択し、さらにその腎臓から TRPC6 の mRNA 発現量が野生型マウス腎に比べて 2 倍以上となる 2 系統を選別した。交配して個体数を増やした後、代謝ケージで飼育して尿蛋白量を定量したが野生型に比べて有意の差異を認めなかった。そこで、腎障害を生じた場合の差異を見る目的で、①と同様にアルドステロン持続注入、生理食塩水飲水による腎障害の程度の差異を検討した。しかし、このモデルにおいても尿蛋白に差異はなく、また、腎障害の程度にも差を認めなかった。TRPC6 はアンジオテンシン II の作用により活性化され腎障害を惹起する可能性が指摘されていることから、アンジオテンシン II を osmotic minipump により持続注入して腎、尿蛋白の変化を見たが有意の差を認めなかった。これらのマウスにおいて mRNA 発現量は明らかな増加を示したが、蛋白発現に何

らかの支障が出ている可能性を検討するために、腎の Western blotting と、免疫染色を行った。その結果、蛋白レベルでは明らかな発現量の差を認めず、RNA から蛋白への翻訳が障害されていると結論された。同様に NFAT 発現マウスも明らかな mRNA 増加を示す 2 系統のマウスが得られたが、蛋白レベルでは明らかな発現を見ることができなかった。本研究では、TRPC6、NFAT の強制発現マウスを用いて、これら蛋白の腎障害進行における役割を検討する計画であったが、有用なマウスを作成することができなかった。一方、①、②の結果から、NFκB 活性化は、最近注目されているアルドステロンによる臓器障害において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。これに対し、TRPC6 はこのモデルにおいても明らかな増加を示さず、したがって、NFAT 活性にも大きな差を認める可能性は低いと想定された。今後、臨床応用可能な NFκB 活性化阻害薬が開発されれば、慢性腎臓病に対する治療薬として期待される。

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 1 件)

(1) Fukuda S, Horimai C, Harada K, Wakamatsu T, Fukasawa H, Muto S, Itai A, Hayashi M. Aldosterone-induced kidney injury is mediated by NFκB activation. *Clinical & Experimental Nephrology* 15: 41-49, 2011 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 「腎内アンジオテンシン変換酵素 2 型 (ACE2) はアルドステロンにより抑制される」林 松彦、堀米ちひろ、福田誠一、原田香織、柳瀬健志、深澤弘志、武藤 進、板井昭子、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 16 日、神戸

(2) “Angiotensin-converting enzyme 2 and clusterin are regulated by aldosterone in the kidney.” Hayashi M, Horimai C, Fukuda S, Saito N, Yanase T, Fukasawa H, Muto S, Itai A, the 42th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 1, 2009, San Diego

(3) “NFκB activation is involved in aldosterone-induced tissue injury in the kidney but not in the heart.” Hayashi M, Fukuda S, Monkawa T, Saito N, Yanase T, Fukasawa H, Muto S, Itai A, Shimoda K, the 41th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 4, 2008, Philadelphia

(4) 「核転写因子 NF-κB を中心とした炎症進展と細胞死の相互作用の解明」高瀬 敦、菱

川慶一、林 松彦、Richard Quigg、藤田敏郎、第 31 回日本高血圧学会総会、札幌市、2008 年 10 月 9 日

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 松彦 (MATSUHIKO HAYASHI)
慶應義塾大学医学部・教授
研究者番号：60129608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし