

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度
 課題番号：21591020
 研究課題名（和文）小胞体ストレスを介した糸球体足細胞傷害機序の解明と治療戦略への応用
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms underlying podocyte injury through endoplasmic reticulum stress and Development of novel therapeutic strategies for glomerular diseases
 研究代表者
 和田 健彦（WADA TAKEHIKO）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：90447409

研究成果の概要（和文）：

本研究では糸球体足細胞の傷害機序として小胞体ストレスの関与を検討した。種々の代謝に関する刺激の中で、特に低酸素負荷に対して培養糸球体足細胞の小胞体ストレス応答が著しく、そのうちCHOPが最終的に関与するアポトーシス誘導経路においてBcl-2ファミリー蛋白等の様々な分子が複雑に関与していた。関連して、カルボニル化合物が直接的に足細胞を傷害することも見出され、低酸素・小胞体ストレス・カルボニルストレスが互いに関連しながら足細胞を傷害する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the implication of endoplasmic reticulum (ER) stress in the process of podocyte injury. Cultured growth-restrictive podocytes showed enhanced unfolded protein response under hypoxia, one of the metabolic stresses we tested. The apoptosis pathway associated with CHOP, which is one of the ER stress-related molecules, included a complicated network with Bcl-2-related proteins. Furthermore, we found that methylglyoxal, a carbonyl compound, directly damaged podocytes. Those results suggest that hypoxia, ER stress and carbonyl stress may have a crosstalk with each other and promote podocyte injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：腎臓学・糸球体足細胞・小胞体ストレス・蛋白尿・アポトーシス・分子シャペロン・低酸素・グルコース

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病（特に糖尿病性腎症）の現状
 研究開始時点で我が国の慢性透析患者数は 27 万人を突破し、中でも透析導入疾患として

糖尿病性腎症が最多であり（43.4%）、医学的のみならず医療経済的にも解決すべき重要な課題である。糖尿病性腎症を含む各種腎疾患において尿蛋白は単なるマーカーではな

く腎障害増悪因子として治療標的となっている。一方で、慢性腎臓病患者においては末期腎不全に至る前から心血管事故による死亡のリスクが高く、蛋白尿を合併すると更にリスクが高まることが報告されている。したがって、糖尿病性腎症並びに蛋白尿対策として発症・進展機序を解明し有効な治療法を確立することが急務である。

(2) 糖尿病性腎症における糸球体足細胞傷害の意義

近年、糸球体障害の進展に糸球体足細胞傷害が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。糸球体濾過装置で中心的役割を果たしているスリット膜に局在する分子がこの 10 年間で次々と同定され、それらの発現変動と糖尿病性腎症の病態との関連が注目されている。また、足細胞脱落と糸球体硬化の進行とが強く関連していると考えられている。足細胞傷害の機序を理解することが糖尿病性腎症の病態解明に重要であると考えられる。

(3) 腎障害における小胞体ストレス応答の意義

一方、この数年、小胞体ストレスが腎臓や他の臓器における種々の病態に関与していることが報告されている。腎臓に関しては、ヒト糖尿病性腎症における小胞体ストレス関連分子シャペロンの発現増強や、膜性腎症モデルラットの足細胞傷害における小胞体ストレスの関与など、が報告された。我々も小胞体ストレス誘導化合物により培養足細胞に小胞体ストレスを誘導することに成功し、更に新規腎疾患モデルである *megsin* 高発現ラットにおいて足細胞に小胞体ストレスが高度に誘導されていること (Inagi R, et al. *Kidney Int* 2005)、蛋白尿自体が腎尿細管細胞に小胞体ストレスを誘導し腎障害進行に重要な役割を果たしていること (Ohse T, et al.

Kidney Int 2006)、メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルにおいて小胞体ストレスを標的とした治療が有効であること (Inagi R, et al. *J Am Soc Nephrol* 2008)などを報告した。しかし、糖尿病性腎症において小胞体ストレスが足細胞傷害に及ぼす影響とその詳細な分子機序は明らかにされていない。

2. 研究の目的

生活習慣病に関わる種々の代謝性ストレスが足細胞に及ぼす影響を小胞体ストレスの観点から検討することで蛋白尿関連腎症、特に糖尿病性腎症の病態を解明するとともに、小胞体ストレス応答を制御することによる治療戦略を確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

培養糸球体足細胞において、種々の代謝性ストレスによって惹起される小胞体ストレス応答並びに形態学的変化・脱分化・細胞死などの細胞応答について以下の実験条件により詳細に検証した。

① 培養細胞：研究代表者が米国・ワシントン大学留学中に Stuart J. Shankland 教授とともに確立したマウス温度感受性培養糸球体足細胞を使用した。この温度感受性培養糸球体足細胞は、特定の培養条件下（分化条件）では増殖が停止し、特徴的な突起形成・足細胞関連蛋白発現が観察されるようになるという特徴を有する。足細胞特異的なマーカーの発現も確認済みである。

② 代謝・小胞体ストレス刺激：糖尿病性腎症において、糸球体足細胞が暴露している可能性のある代謝ストレスとして (1)高グルコース・低グルコース (2) 低酸素 による負荷を行った。また、小胞体ストレス刺激として、*tunicamycin*, *thapsigargin*, *brefeldin A* による刺激を加え、細胞応答を検討した。さらに、関

連刺激として近年様々な代謝性疾患に関与が報告されているカルボニル化合物の対する足細胞の応答を見る目的で、methylglyoxalを種々の濃度で培養液に添加し、適切な間隔を置いて観察した。

③ 小胞体ストレスの評価：小胞体ストレスの程度や小胞体ストレス応答誘導については、(1) 分子シャペロン蛋白 (GRP78, ORP150 など)の発現変動をリアルタイム RT-PCR・ウェスタンブロット法により検討 (2) 小胞体ストレス誘導性細胞死誘導因子 (ATF4, CHOP, caspase 12) の発現量及び活性をウェスタンブロット法を用いて測定した。

④ 足細胞の形態学的評価：生体内における蛋白尿発現機序として重要である可能性のある足細胞の形態学的変化については、突起形成不全（主としてアクチン線維の異常による）や、これに関連する足細胞関連蛋白局在異常について検討を行い評価した。チャンバースライドに培養した足細胞を上記のストレス刺激に暴露した後、固定細胞のアクチン線維を Phalloidin 染色で検討するとともに、免疫蛍光染色により各種足細胞関連蛋白の発現・局在を検討した。

⑤ 細胞死に関する検討：上記の各種ストレス刺激によるアポトーシス誘導を (1) MTS assay (生細胞数の評価) (2) Hoechst 33342 染色による核形態観察 (3) 顕微鏡下での直接細胞計数法という複数の方法で評価した。また、小胞体ストレス関連アポトーシス経路の関連因子 (PERK, ATF6, CHOP, caspase12) や Bcl-2 関連蛋白の発現・活性につきウェスタンブロット法を用いて検討した。

⑥ Glyoxalase-1 高発現足細胞の樹立：上記カルボニルストレスによる足細胞傷害の機序を詳細に検討する目的で、カルボニルストレスを消去する酵素の1つである glyoxalase-1 を培養足細胞（増殖条件下で培養したもの）

に電気穿孔法で導入し、選択培地で選択をかけることにより安定高発現株を作製した。

4. 研究成果

(1) 糸球体足細胞傷害における小胞体ストレスの関与に関する検討（培養細胞系）

マウス温度感受性培養糸球体足細胞を分化条件で培養し、まず高グルコース・低グルコース・低酸素に対する応答を検討した。我々が検討した様々な条件下では、高グルコース・低グルコースにおいては有意な細胞傷害（特に細胞死）の変化が認められなかった。低酸素については、酸素濃度 1%の条件では明らかな差が認められなかったが、0.2%まで低下すると刺激 48 時間以降に死細胞の増加が観察された。そこで、低酸素条件下で検討を進める方針とし、様々な小胞体ストレスマーカーの関与を検討した。その結果、CHOP の著明な発現亢進が認められ、PERK-eIF2alpha 系または ATF6 の関与する経路が作動している可能性が示唆された。また、本条件での細胞死の増加には caspase12 の関与が強く示唆されるとともに、Bcl-2 関連蛋白の関与が示唆されるデータも得られているため、現在確認中である。

また、これに加えて、カルボニル化合物によるストレス（カルボニルストレス）が慢性腎臓病や糖尿病の病態に強く関与し、この機序に小胞体ストレスが関与していることが報告されており、カルボニル化合物の1つであるメチルグリオキサールが糸球体足細胞に及ぼす影響を *in vitro* で解析した。その結果、メチルグリオキサールは濃度・時間依存性に糸球体足細胞の生細胞数を減少させた。また、より低濃度であっても、細胞骨格の変化をもたらすことが phalloidin 染色によるストレスファイバーの検討において観察され、カルボニルストレスが糸球体足細胞傷害に関与する可能性が示唆された。現在、当グル

ープで作製した glyoxalase-1 高発現足細胞を用いてカルボニルストレス消去系による抑制効果の確認を検討している。また、この経路における小胞体ストレス応答の関与についても現在検討中である。

(2) 小胞体ストレスによる糸球体足細胞傷害の検討

小胞体ストレス誘導化合物 (tunicamycin, thapsigargin, brefeldin A) による化学的刺激を用いて、小胞体ストレスに対する足細胞の反応を検討した。これら3剤ともに、小胞体ストレスシヤペロンである GRP78 の誘導が確認され、濃度依存的に細胞傷害を誘導した。興味深いことに、細胞傷害を引き起こさない濃度において、brefeldin A は特異な細胞形態変化を誘導していたが、この物質特異的に細胞骨格に特定の影響を及ぼしている可能性が否定できず、現在検討を加えているところである。

(3) 糸球体障害モデル動物を用いた検討

研究計画では、STZ ラット・SHR/DN ラット・megin/RAGE/iNOS 高発現ラットなどの糖尿病モデル動物を用いて足細胞小胞体ストレス応答を検討し、更に小胞体ストレス誘導化合物前投与によるプレコンディショニングが病態を軽減する可能性について検討する予定であった。しかし、その後当研究室において細胞内代謝関連分子の遺伝子改変動物を作成することとなったためこれを優先し、計画した実験は中断している。この分子は小胞体ストレスとのクロストークも報告されているものであり、今後動物に糸球体障害モデルを誘導した上で、小胞体ストレスの関与を検討する予定である。

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 31 件)

1. Ikeda Y, Inagi R, Miyata T, Nagai R, Arai M, Miyashita M, Itokawa M, Fujita T, Nangaku M. Glyoxalase I retards renal senescence. *Am J Pathol* (査読有) 179, 2810-21, 2011 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.023>
2. Chiang CK, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab Invest* (査読有) 91, 1564-71, 2011. doi: 10.1038/labinvest.2011.114
3. Tanaka T, Nangaku M: Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. *Exp Cell Res* (査読有) 318, 1068-73, 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.035>
4. Mimura I, Tanaka T, Wada Y, Kodama T, Nangaku M. Epigenetic regulation for hypoxic response via HIF and histone demethylase. *J Pharmacol Sci* (査読有) 115: 453-8, 2011 <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.10R19FM>
5. 串田夏樹・和田健彦・南学正臣 : 「尿管間質障害の免疫学的機序」腎と透析 71 号 1 頁, 2011
6. Kawakami T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Renal Physiol* (査読有) 299, F568-76, 2010 doi: 10.1152/ajprenal.00659.2009
7. Inagi R, Kumagai T, Fujita T, Nangaku M. The role of glyoxalase system in renal hypoxia. *Adv Exp Med Biol* (査読有) 662: 49-55, 2010 doi:10.1007/978-1-4419-1241-1_6
8. Chiang CK, Inagi R. Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics. *Nat Rev Nephrol* 6: 539-54, 2010 doi:10.1038/nrneph.2010.103
9. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr Opin Pharmacol* 10: 156-65, 2010 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.006>
10. Tanaka T, Nangaku M: The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19, 43-50, 2010 doi: 10.1097/MNH.0b013e3283328eed
11. Mimura I, Nangaku M, Nishi H, Inagi R, Tanaka T, Fujita T. Cytoglobin, a novel globin, plays an anti-fibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* (査読

- 有) 299:F1120-33, 2010
doi: 10.1152/ajprenal.00145.2010
12. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. (Review) *Nephron Exp Nephrol* (査読有) 112:e1-9, 2009
doi:10.1159/000210573
 13. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, Miyata T, Fujita T, Nangaku M. Metallothionein is upregulated by hypoxia and stabilizes hypoxia-inducible factor in the kidney. *Kidney Int* (査読有)75:268-77, 2009
doi:10.1038/ki.2008.488
 14. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* (査読有) 24:2665-72, 2009
doi: 10.1093/ndt/gfp215
 15. Eto N, Miyagishi M, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. *Am J Pathol* (査読有) 174:1553-63, 2009
<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.080190>
 16. Kumagai T, Nangaku M, (他 5 名) Inagi R. Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia- reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* (査読有) 296:F912-21, 2009
doi: 10.1152/ajprenal.90575.2008
- [学会発表] (計 58 件)
1. Nangaku M: Abnormal Oxygen Metabolism and Epigenetic changes in Diabetic Kidney Disease. Keystone Symposium on Complications of Diabetes. Boston, U.S.A., 2012. 3. 12 (invited)
 2. Nangaku M: Progression of CKD following AKI: Role of hypoxia. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 10 (invited)
 3. Inagi R, Chiang CK, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M: Derangement of Oxygen Sensing for Erythropoietin (EPO) Production by Unfolded Protein Response (UPR). The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 12
 4. Shoji K, Mimura I, Ohse T, Murayama T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Kume H, Goto A, Fujita T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M: Identification & Characterization of a Novel Oncogenic HIF-1 Target Involved in Renal Cell Carcinoma. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 12
 5. 和田健彦: 糸球体傷害から腎不全へ至る病態機序と治療戦略. 播磨腎研究会. 姫路 2011.10.27
 6. Nangaku M: Mechanism of the development of renal anemia and its treatment. International Forum of Chronic Kidney Disease of the Taiwan Society of Nephrology. Taipei, Taiwan, 2011. 7. 10 (invited)
 7. 和田健彦: CKD の腎臓で何が起きているのか? 病態整理に基づく治療の考え方. 基礎から学ぶ病態研究会. 高松. 2011.6.23
 8. 南学正臣: 貧血治療による腎保護効果のメカニズム. 第 54 回日本腎臓学会学術総会. 横浜, 2011.6.16
 9. 村津四葉, 南学正臣, 田中哲洋, Chih-Kang Chiang, 和田健彦, 藤田敏郎, 稲城玲子: 酸化ストレスおよび小胞体 (ER) ストレス応答における腎尿細管細胞の microRNA 発現変動. 第 54 回日本腎臓学会学術総会. 横浜 2011.6.17
 10. Nangaku M: Cellular Defense Systems in Hypoxia: Mechanisms for Renal Protection. World Congress of Nephrology. Vancouver, Canada, 2011. 4. 11 (invited)
 11. Chiang CK, Nangaku M, Tanaka T, Fujita T, Inagi R: Endoplasmic Reticulum Stress Disturbs Erythropoietin Gene Expression in a HIF-Dependent Manner. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 19
 12. Muratsu S, Nangaku M, Tanaka T, Chiang CK, Wada T, Fujita T, Inagi R: MicroRNA Profiles of Tubular Cells under Hypoxia-Reoxygenation and Endoplasmic Reticulum Stress. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 19
 13. 稲城玲子: Endoplasmic reticulum stress and kidney disease. 南大阪腎臓セミナー. 大阪, 2010.7.16
 14. Nangaku M: Defensive mechanisms against fibrosis in the hypoxic kidney. ISN-NEXUS: fibrosis and the kidney. Geneva, Switzerland, 2010. 7. 1 (invited)
 15. Nangaku M: Role of hypoxia in chronic kidney disease. FASEB Summer Research Conference. Saxton River, U.S.A., 2010. 6. 29 (invited)
 16. Inagi R: Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney disease. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology Annual Meeting & International Symposium. Seoul, Korea, 2010.6.24
 17. Inagi R: Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney disease. Seminar in Kyungpook National University.

- Daegue, Korea, 2010.6.23
18. 南学正臣: AKI の発症機序の概説. 第 53 回日本腎臓学会学術総会. 神戸. 2010.6.16
 19. Nangaku M: HIF and Renal Disease. 12th Asian Pacific Congress of Nephrology. Seoul, Korea, 2010. 6. 6 (invited)
 20. Nangaku M: Identification of novel targets of hypoxia-responsive pathways. ISN-NEXUS: the kidney and the vascular system. Kyoto, Japan, 2010. 4. 17 (invited)
 21. Inagi R: Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney disease. The 3rd Peptide Conference. Beijing, China, 2010.3.21
 22. 和田健彦: 腎臓内科医から見た心腎連関: 慢性腎臓病の病態と治療. 第一三共循環器セミナー. 東京, 2010. 2
 23. 和田健彦: 腎疾患における糸球体上皮細胞傷害の意義: 慢性腎臓病を抑えるために. 中外製薬講演会. 東京. 2010.2
 24. Kawakami T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, U.S.A., 2009. 10. 31
 25. 南学正臣: 貧血の治療目標とその実際 (保存期). 第 52 回日本腎臓学会学術総会. 横浜. 2009.6.3
 26. Inagi R, Nishi H, Tanaka T, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress is ameliorated by glyoxalase I via reduction of intracellular oxidative stress. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 25
 27. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nishi H, Tanaka T, Miyata T, Fujita T, Inagi R: Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 24
 28. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger J, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 23
 29. 和田健彦: 慢性腎臓病進展における糸球体上皮細胞傷害および尿細管間質傷害の意義. 味の素製薬講演会. 川崎, 2009.4

〔図書〕 (計 2 件)

Miyata T, Eckardt KU, Nangaku M: Humana Press. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Studies on Renal Disorders. 2010, 総ページ数 783

Wolf M, et al. (Inagi R): Springer. Oxygen Transport to Tissue XXXIII (Advances in Experimental Medicine and Biology. 2010, 総ページ数 322

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 健彦 (WADA TAKEHIKO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 90447409

(2) 研究分担者

南学 正臣 (NANGAKU MASAOMI)
 東京大学・医学部附属病院・特任講師
 研究者番号: 90311620

稲城 玲子 (INAGI REIKO)
 東京大学・医学部附属病院・特任研究員
 研究者番号: 50232509

田中 哲洋 (TANAKA TETSUHIRO)
 東京大学・保健健康推進本部・助教
 研究者番号: 90508079

(4) 連携研究者

大瀬 貴元 (OHSE TAKAMOTO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 10568447