

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25年 3月31日現在

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590912
 研究課題名（和文） インターロイキン18とオステオポンチンの相互作用と腎線維化に関する役割解明

研究課題名（英文） Roles of interleukin-18 and osteopontin in renal fibrosis.

研究代表者

大蔵 隆文 (Okura Takafumi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40260385

研究成果の概要（和文）：炎症性サイトカインの1つである IL-18 の腎障害における役割を検討した。野生型マウスに対して、片腎摘出、塩分負荷、アルドステロン投与を行ったところ、尿細管に IL-18 が誘導され、糸球体の腫大、メサンギウム基質の増加、間質の線維化が認められたのに対して、IL-18 欠損マウスでは、これらの変化が抑制されていた。腎臓の線維化を誘導するオステオポンチンは、野生型マウスでは尿細管で著明に誘導されていたが、IL-18 欠損マウスでは抑制されていた。これらの結果からアルドステロンは、IL-18 誘導し、オステオポンチンを介して腎線維化、腎障害を惹起することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the effects of IL-18 which is a pro-inflammatory cytokine on kidney injury by aldosterone. Wild type or IL-18 knock out (KO) mouse were unilateral nephrectomized and treated with high salt and aldosterone. In wild type mouse, glomerular hypertrophy, mesangial matrix expansion and interstitial fibrosis were observed. On the other hand, in IL-18 KO mouse, these changes were diminished. In wild type mouse, osteopontin (OPN) was up-regulated but not in KO mouse. These results suggested that aldosterone induced renal fibrosis by induction of IL-18 and OPN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
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

キーワード：Interleukin-18, オステオポンチン、アルドステロン、腎線維化、高血圧

1. 研究開始当初の背景

腎線維化促進因子の中で申請者らはオステオポンチン(OPN)に注目し、研究を行ってきた。OPNは、骨組織のマトリックスを構成

する非コラーゲン性蛋白であり、炎症性サイトカインとしても注目されている。我々の研究で、アルドステロン(ALD)はOPNの発現を介して腎組織に線維化を誘導することを示

した。また、これまでの報告で、炎症性サイトカインの1つである IL-18 の作用は OPN の作用と類似点が極めて多く、OPN の作用の一部は IL-18 を介している可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、腎線維化における IL-18 の役割を明らかにするとともに、OPN との相互作用の有無を明らかにし、さらにその下流に存在する因子を明らかにすることで、これらの制御が腎線維化抑制の手段になり得ないかを検討することである。

3. 研究の方法

(1)動物：IL-18 の腎障害を明らかにするため、IL-18 欠損 (KO) および野生型 (WT) マウスを用いた。

(2)腎障害モデルの作成：腎障害モデルとして、ALD 誘導高血圧モデルマウスを作製した。8 週齢の WT および IL-18KO マウスに対して、片腎摘出を行い、1%食塩負荷、浸透圧ミニポンプによって腹腔より $0.15 \mu\text{g}/\text{hour}$ の ALD の投与を 4 週間行った。

(3)評価項目

①血圧：血圧測定は ALD 投与前および投与後 4 週後にテイルカフ法で行った。

②組織学的検討：腎病変の検討には PAS 染色、腎線維化はマッソン-トリクロム染色 IL-18、OPN、マクロファージ (F4/80)、線維芽細胞 (FSP-1) に対しては免疫組織学的検討を行った。

③IL-18, OPN, Type I, III IV collagen, Fibronectin の mRNA 発現に関しては、RT-real time PCR 法を行った。

④尿・血液学的検査：アルブミン尿、血中アルドステロン、IL-18、クレアチニン は ELISA 法によって測定した。

4. 研究成果

(1)生理学的、生化学的検査

血清クレアチニンおよび尿中アルブミン量に WT 群と KO 群で差を認めなかった。血圧に関しては、ALD 処置によって WT 群で上昇したが、KO 群では有意な上昇を認めなかった。

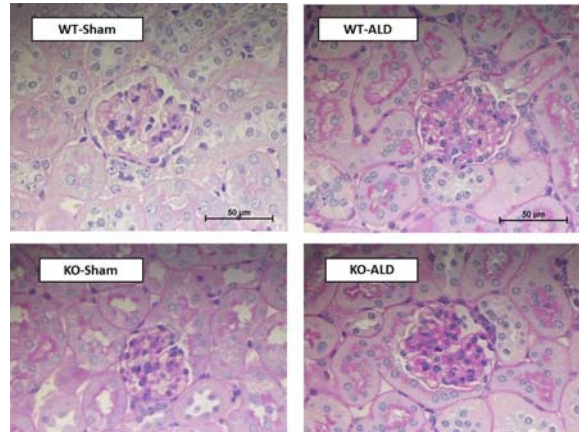
	WT		IL18-KO	
	sham	ALDO	sham	ALDO
Body weight (g)	25.5±1.0	25.9±1.1	27.8±0.6	25.4±0.3
Kidney weight (mg)	252±5.6	323±6.7*	238±11.9	373±13.3*
Plasma aldosterone (ng/dl)	26.9±1.7	698.3±242.4*	40.7±3.4	838.3±120.2*
Plasma IL-18 (pg/ml)	160±10.8	173±10.4		
Serum creatinine (mg/dl)	0.19±0.03	0.20±0.06	0.17±0.02	0.20±0.04
Blood pressure (mmHg)	95.8±6.7	123.2±4.4*	89.0±8.5	103.3±4.5
Urinary albumin (ng/day)	59.0±12.3	491.9±121.5*	62.7±35.1	796.3±198.6*

*P<0.05 vs WT

(2) 病理学的変化

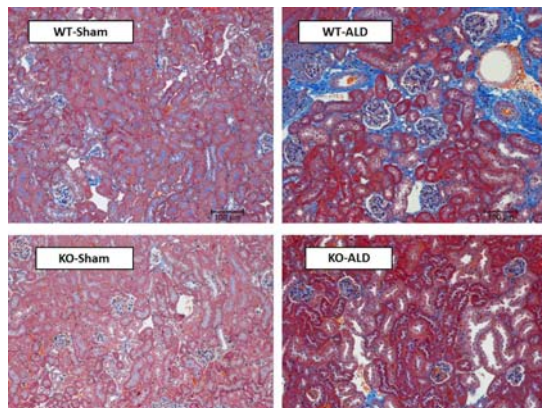
①PAS 染色

ALD 投与によって、WT および IL-18KO マウスともに糸球体の腫大、メサンギウム基質の拡大が認められた。



②マッソン-トリクロム染色

ALD による腎線維化は WT に比較して、IL-18KO マウスでは著明に抑制されていた。

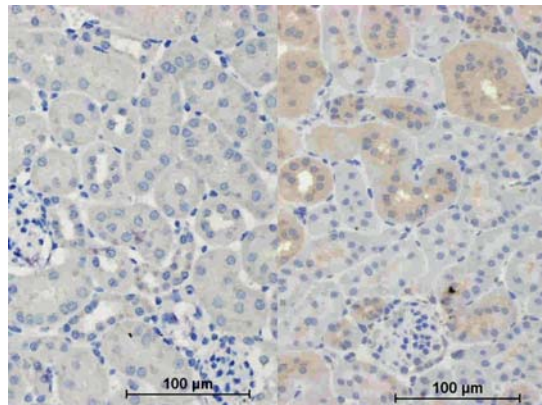


WT-Sham

WT-ALD

③ALD による IL-18 発現誘導

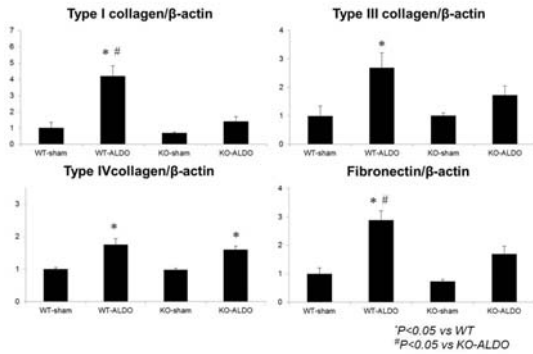
ALD 投与によって WT マウスでは尿細管に IL-18 の発現が著明に誘導された。しかしな



がら血中の IL-18 濃度に関しては WT および KO マウスで有意な差を認めなかった。

④線維化関連遺伝子発現

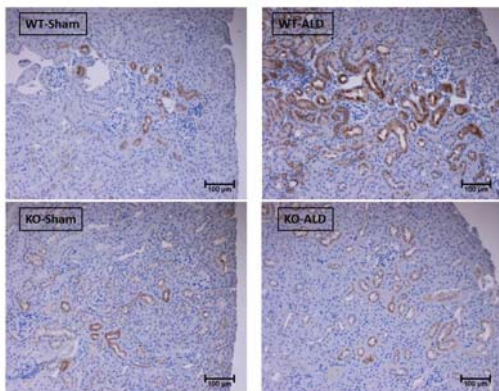
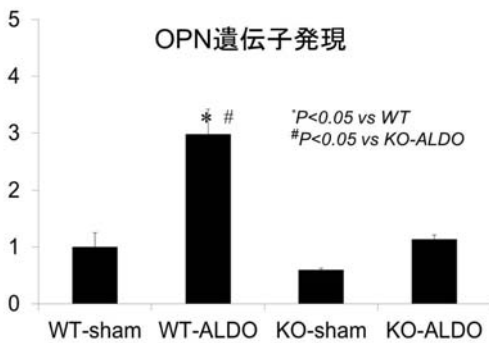
ALD 投与によって WT マウスでは Type I, III, IV collagen および Fibronectin の著明な増加が認められたのに対して、IL-18KO マウスではその増加は抑制されていた。



⑤腎での OPN 遺伝子および蛋白発現

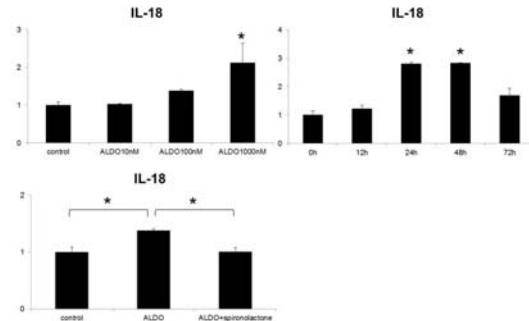
OPN 蛋白発現 (免疫組織染色)

ALD 投与によって、WT マウスでは OPN の発現が誘導されたのに対して、IL-18KO マウスでは OPN の発現誘導は認められなかった。



⑥腎尿細管細胞 (NRK-52E) における ALD 処置による IL-18 遺伝子発現の検討

腎尿細管細胞において、ALD 刺激によって IL-18 の遺伝子は時間および用量依存性に増加した。また、ALD 拮抗薬であるスピロノラクトンの投与で IL-18 の増加は完全に抑制された。



5. 結論

これらの結果から ALD は尿細管細胞に働き、IL-18 の誘導を介して OPN の発現を増加させることで、腎線維化を促進することが示唆された。

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 2 件)

①Nagao T, Okura T, Irita J, Jotoku M, Enomoto D, Desilva VR, Miyoshi K, Kurata M, Matsui Y, Uede T, Higaki J.

Osteopontin Plays a Critical Role in Interstitial Fibrosis but Not Glomerular Sclerosis in Diabetic Nephropathy.

Nephron Extra 2: 87-103, 2012.

doi: 10.1159/000337330, 査読有り

②Irita J, Okura T, Jotoku M, Nagao T, Enomoto D, Kurata M, Desilva VR, Miyoshi K, Matsui Y, Uede T, Denhardt DT, Rittling SR, Higaki J.

Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney.

American Journal of Physiology renal physiology 301: E833-844, 2011.

doi:10.1152/ajprenal.00557.2010. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

① 第 34 回日本高血圧学会総会（2011 年
10 月 20-22 日：宇都宮）

長尾知明、大蔵隆文、城徳昌典、榎本大次郎、
入田 純、三好賢一、檜垣實男

アルドステロンによる腎線維化における
IL-18 とオステオポンチンの役割

②High Blood Pressure Research 2011

Scientific Sessions, September 20-24,
2011, Orland FL, USA.

Nagao, T Okura T, Jotoku M, Irita J, Enomoto
D, Miyoshi K, Higaki J.

Interleukin-18 Deficiency Protects
Against Aldosterone-Induced Interstitial
Fibrosis in the Kidney.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大蔵 隆文 (Okura Takafumi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40260385

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三好賢一 (Miyoshi Ken-ichi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50423439

入田 純 (Jun Irita)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00423442

城徳昌典 (Jhotoku Masanori)
愛媛大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：10452690

長尾知明 (Nagao Tomoaki)
愛媛大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20512164