

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591191

研究課題名(和文)メタボリック症候群関連腎症の発症・進展における内分泌因子の意義

研究課題名(英文)Role of humoral factors in the development and progression of metabolic syndrome-related kidney diseases

研究代表者

向山 政志 (Mukoyama, Masashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40270558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリック症候群(MetS)ではRA系亢進など内分泌調節異常の存在が示唆される。MetS関連腎症(腎硬化症、糖尿病性腎症、肥満関連腎症)における内分泌因子の意義を検討した。

MetS関連腎症では局所でのアルドステロン(Aldo)シグナル活性化が示唆される。ANP・BNP受容体欠損マウスに高塩食-Aldo負荷を行うと著しい蛋白尿とpodocyte傷害を認め、ARB、p38阻害薬で軽減した。糖尿病・脂質異常症合併モデルでは腎症増悪とともに自然免疫系のMRP8-TLR4系、RA系活性化を認め、TLR4欠損マウスで腎障害の著しい改善を認めた。MetS関連腎症治療におけるこれらの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome (MetS) represents impaired regulation of humoral or endocrine factors, such as the enhanced renin-angiotensin-aldosterone system. We investigated roles of humoral factors in MetS-associated renal injury.

The natriuretic peptide (ANP and BNP) receptor GC-A is abundantly expressed in renal tubules, but its role in glomerular injury is unknown. When GC-A knockout mice were subjected to aldosterone and high salt, massive proteinuria with marked podocyte injury was observed, which was alleviated with an ARB, antioxidant, or p38 MAPK inhibitor, suggesting their therapeutic potential.

In mouse models of diabetes with dyslipidemia, we found that TLR4 and its ligand MRP8, factors associated with homeostatic inflammation, were markedly upregulated together with worsening of nephropathy. Renal injury was significantly alleviated in TLR4-deficient mice. Expression of MRP8 was also enhanced in advanced human diabetic nephropathy, suggesting its role as a prognostic marker.

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 内分泌学 メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病をはじめとする生活習慣病の有病率とともに、腎不全患者は増加の一途をたどり、わが国で 30 万人以上が慢性維持透析を受けている。同時に包括的概念としての慢性腎臓病 (CKD) という用語が定着し、その実態解明と患者 1,400 万人ともいわれる病態の把握と治療介入への取り組みがなされている。とくに近年ではメタボリック症候群 (MetS) に代表される複数の生活習慣病の合併が CKD 発症・進展のベースとなることも多い。これら進行性腎臓病の病態解明と克服は、社会的・医療経済的にみても極めて重要な課題であるが、現在その進行を抑止し、また傷害組織を可逆的に再生せしめるのに有効な治療法開発の取り組みは不十分であるといわざるをえない。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系阻害の効果も限定的である。この理由のひとつに、MetS 有病率の増加とそれによる病態の複雑化が考えられ、CKD 対策にはより広い範囲からのアプローチが重要である。

我々はこれまで、Na 利尿ペプチドファミリー (ANP、BNP、CNP) の病態生理的意義の解明を目的として、臨床・基礎両面からアプローチしてきた。そして、ANP、BNP が心不全、腎不全患者で著しく分泌亢進し、病態や予後と深く関わることを初めて明らかにし (Mukoyama et al. *N Engl J Med* 1990, *J Clin Invest* 1991 他) 診断薬としての意義を確立するとともに、ANP、BNP を初めて心不全症例に投与して治療薬としての意義を明らかにするなど、今日の日常臨床応用への展開に貢献してきた。同時に、Na 利尿ペプチド系の遺伝子改変動物の開発を通してそれらの意義の解明を追求し、ANP・BNP 受容体 (GC-A) 欠損マウスでの著しい高血圧と心肥大、BNP 欠損マウスでの心室線維化を証明した (Tamura, Mukoyama et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000)。さらに、BNP 過剰発現マウスを用いて、Na 利尿ペプチドが腎摘腎不全、腎炎や糖尿病性腎症に対して腎保護作用を発揮することを示した (Kasahara, Mukoyama et al. *J Am Soc Nephrol* 2000; Suganami, Mukoyama et al.

J Am Soc Nephrol 2001; Makino, Mukoyama et al. *Diabetologia* 2006)。

最近、MetS による腎臓病にアルドステロン-鉱質コルチコイド受容体 (MR) 系の関与が示唆されている。ANP・BNP/GC-A 系は RAA 系に対して強力な拮抗作用を示すが、腎局所での直接の拮抗作用は明らかでない。一方、MetS での臓器障害の基盤として心臓・血管や脂肪組織など組織局所での慢性炎症の意義も注目されている。腎臓においてもその関与が想定されるが、現在まで詳細については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性腎症をはじめとする MetS 関連腎症の病態解明と新たな治療戦略開発を目的とし、特に内因性の内分泌因子に注目し研究を行う。これまで行ってきた Na 利尿ペプチドファミリーの意義の解明に加え、他の系の遺伝子改変マウスの開発と解析などを通して、MetS 関連腎症での意義を明らかにする。とくに、最近注目されているアルドステロンの意義や、新たな内分泌因子、かつ炎症惹起因子としてのマクロファージ由来 myeloid-related protein 8 (MRP8) の腎臓での意義を明らかにする。そして、基礎研究の成果に基づいて臨床応用につなげることを目指し、MetS 関連腎症の発症・進展における内分泌因子の意義の解明と臨床応用の実現とともに、新たな創薬へと展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ANP・BNP 受容体 (GC-A) 欠損マウスの解析とアルドステロンの意義の検討:

アルドステロンによる局所での糸球体傷害作用に対して、Na 利尿ペプチド系が腎保護的役割を担うという仮説を立て、ANP・BNP の受容体である GC-A を全身的に欠損 (KO) したマウスにアルドステロン投与を行い、血圧・尿・腎組織の評価を行った。

片腎摘後の野生型および GC-A KO マウスに対し、アルドステロン (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$) の持続皮下注および 6% 高食塩食の投与を行い、4 週間にわたり観察した。次に、ヒドララジ

ン、MR拮抗薬（スピロラクトン）、ARB（オルメサルタン）、抗酸化薬（tempol）の効果を検討した。さらに、p38 MAPキナーゼ阻害薬（FR167653）の作用を検討した。

(2) 糖尿病・脂質異常症合併モデルにおけるMRP8-TLR4系の意義の検討：

8週齢の雄性C57BL/6JマウスおよびTLR4欠損マウス（大阪大学審良静男博士より提供）に対して、streptozotocin（STZ）を腹腔内投与し糖尿病モデルを作製、その2週間後より45%高脂肪食（HFD）ないし正常食で6週間飼育して糖尿病・脂質異常症合併モデルを作製し解析を行った。経過中尿アルブミン排泄を評価するとともに、腎組織変化、マクロファージ浸潤（Mac2染色）、腎糸球体でのMRP8発現、TLR4発現や炎症・細胞外基質関連、酸化ストレス関連遺伝子の発現を検討した。さらに、野生型マウスモデルでARB（オルメサルタン）投与の効果を検討した。

(3) CKD症例における腎予後予測因子としての腎組織MRP8発現の検討：

当科で腎生検を行ったCKD患者（stage 1-5）65人（2型糖尿病性腎症19、肥満関連腎症10、微小変化型ネフローゼ17、微小糸球体病変19）について、腎組織MRP8発現を免疫染色により評価した。さらに、血圧、尿蛋白、血清クレアチニン（sCr）を測定、各パラメータ間の相関、腎イベント発症（1年以内のsCr 1.5倍化で定義）との関連についてロジスティック回帰分析を行った。

4. 研究成果

(1) ANP・BNP受容体（GC-A）欠損マウスの解析とアルドステロンの意義の検討：

GC-A KOマウスは野生型と比較して20-30mmHg高い高血圧を示すが、基礎状態では腎臓に明らかな異常を示さなかった。しかし、アルドステロン負荷後、血圧のさらなる上昇とともに、野生型と比較して約260倍の著しいアルブミン尿の増加を認めた。加えて、メサンギウム拡大、間質線維化および著しいpodocyte傷害（podocin、nephrinの著

減とMAPキナーゼ活性化）を来した。これらの変化は野生型マウスへのアルドステロン負荷では軽微であり、このことから内因性のGC-Aシグナルが糸球体保護に重要であることが明らかとなった。

これらの糸球体傷害は、ヒドララジンによる血圧低下では改善せず、一方、MR阻害薬で著しく抑制され、ARB、抗酸化薬でも明らかな改善を示した。さらに、p38 MAPキナーゼ阻害薬投与は、ほぼ完全に抑制を認め、アルドステロンによる糸球体傷害機序において、とくにpodocyteにおけるp38 MAPキナーゼシグナルの重要性が明らかとなった。

(2) 糖尿病・脂質異常症合併モデルにおけるMRP8-TLR4系の意義の検討：

STZ投与後正常食で飼育した群に比べ、HFDを負荷した群では、糸球体におけるMRP8とTLR4の相乗的発現亢進を認めた。HFD負荷群ではアルブミン尿は約3倍と増悪を示した。この変化は、TLR4欠損マウスで明らかな改善を認めた。糸球体へのマクロファージ浸潤やメサンギウム基質蓄積も野生型では増悪を示し、TLR4欠損マウスで有意に軽減した。さらに糸球体でのMRP8発現やMCP-1、TNF α 、TGF- β 1、fibronectin、CTGFなどの炎症・基質関連遺伝子、また酸化ストレス関連遺伝子はHFD負荷で増加し、TLR4欠損で改善した。さらに、ARBの投与は蛋白尿の軽度改善とともに、MRP8-TLR4系の著しい抑制を認め、RA系と自然炎症とのクロストークの存在が示唆された。

(3) CKD症例における腎予後予測因子としての腎組織MRP8発現の検討：

糸球体MRP8陽性細胞数（glom MRP8）、尿細管間質MRP8陽性領域（TI MRP8）とともに、糖尿病性腎症群は他群と比較して高値であった（ $p < 0.01$ ）。腎生検時の血圧（ $p < 0.05$ ）、尿蛋白（ $p < 0.05$ ）、sCr（ $p < 0.0001$ ）はそれぞれglom MRP8、TI MRP8と独立して相関していた。ロジスティック回帰分析では、TI MRP8が腎イベント発症の独立した危険因子（OR 1.26, $p < 0.05$ ）であった。以上より、ヒト糖尿病性腎症においてMRP8が病的意義を有する可能性が示唆されるとともに、腎

組織 MRP8 発現の解析は、腎予後予測に有用な指標となることが示された。

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 10 件)

1. Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M: Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. *PLoS One* 9: e88942, 2014; doi: 10.1371/journal.pone.0087667 (査読有)
2. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K: Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/ toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 18: Epub, Dec. 20, 2013; doi: 10.1007/s10157-013-0922-5(査読有)
3. Uetake R, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Yoshizawa T, Koyama T, Yang L, Toriyama Y, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Kuwabara T, Mori K, Yanagita M, Mukoyama M, Shindo T: Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection. *PLoS One* 9: e87667, 2014; doi: 10.1371/journal.pone.0087667 (査読有)
4. Kasahara M, Nakagawa T, Yokoi H, Kuwabara T, Yasuno S, Mori K, Mukoyama M, Ueshima K: Do statins play a role in renoprotection? *Clin Exp Nephrol* 18: 282-285, 2014; doi: 10.1007/s10157-013-0928-z (査読有)
5. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Yamada R, Namoto S, Yamamoto T, Seki N, Souma N, Yamaguchi T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K: Peritoneal fibrosis and high transport are induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. *Perit Dial Int* 33: 143-154, 2013; doi: 10.3747/pdi.2011.

00033 (査読有)

6. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Ogawa Y, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K: Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia* 55: 2256-2266, 2012; doi: 10.1007/s00125-012-2578-1 (査読有)
7. Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kato Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K: Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 23: 1198-1209, 2012; doi: 10.1681/ASN.2011100985 (査読有)
8. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Ogawa Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Kato Y, Mori KP, Toda N, Ohno S, Muramatsu H, Muramatsu T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K: Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 81: 160-169, 2012; doi: 10.1038/ki.2011.305 (査読有)
9. Naito M, Fujikura J, Ebihara K, Miyana F, Yokoi H, Kusakabe T, Yamamoto Y, Son C, Mukoyama M, Hosoda K, Nakao K: Therapeutic impact of leptin on diabetes, diabetic complications, and longevity in insulin-deficient diabetic mice. *Diabetes* 60: 2265-2273, 2011; doi: 10.2337/db10-1795 (査読有)
10. Maisel AS, Nakao K, Ponikowski P, Peacock WF, Yoshimura M, Suzuki T, Tsutamoto T, Filippatos GS, Saito Y, Seino Y, Minamino N, Hirata Y, Mukoyama M, Nishikimi T, Nagai R: Japanese-Western Consensus Meeting on Biomarkers: Executive summary. *Int Heart J* 52: 253-265, 2011; doi: org/10.1536/ihj.52.253(査読有)

[学会発表] (計 17 件)

1. 向山政志, 横井秀基, 森 潔: Na 利尿ペプチドと腎・高血圧. 第 43 回日本腎臓学会西部

学術大会(シンポジウム)、2013年10月11日~10月12日、松山

2. 向山政志, 横井秀基, 森 潔: Na利尿ペプチド系と腎・高血圧性疾患. 第49回高血圧関連疾患モデル学会(シンポジウム)、2013年9月6日~9月7日、東京

3. 向山政志: 肥満症と高血圧、腎障害 - 炎症とレニン・アンジオテンシン系の意義 -. 第33回日本肥満学会(招待講演)、2012年10月11日~10月12日、京都

4. 向山政志, 森 潔, 栗原孝成, 今牧博貴, 細田公則, 中尾一和: 肥満と炎症、レニン・アンジオテンシン系. 第35回日本高血圧学会(シンポジウム)、2012年9月20日~9月22日、名古屋

5. 向山政志, 森 潔, 笠原正登, 中尾一和: Na利尿ペプチドとNgal - 最新の話 -. 第15回日本心血管内分泌代謝学会(シンポジウム)、2011年11月25日~11月26日、豊中

6. 向山政志, 森 潔, 栗原孝成, 中尾一和: 脂質代謝異常による糖尿病性腎症悪化の新たな分子機構. 第41回日本腎臓学会西部学術大会(シンポジウム)、2011年9月30日~10月1日、徳島

7. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al.: Macrophage-mediated glucolipototoxicity via MRP8/TLR4 signaling in diabetic nephropathy. 2013年世界腎臓学会、2013年5月31日~6月4日、香港

8. Mori KP, Mori K, Mukoyama M, et al.: High fat diet- or fasting-induced renal lipid deposition is differentially associated with changes in systemic and renal lipid-modulating factors. 2013年世界腎臓学会、2013年5月31日~6月4日、香港

9. Kato Y, Mukoyama M, Yokoi H, et al.: p38 MAPK signaling mediates aldosterone-induced renal injury in natriuretic peptide receptor (GC-A)-deficient mice. ISARSH2013、2013年4月27日~4月28日、仙台

10. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al.: Macrophage-mediated glucolipototoxicity contributes to progression of diabetic nephropathy through MRP8/TLR4 signaling. 第45回米国腎臓学会、2012年11月1日~11月

4日、サンディエゴ、アメリカ

11. Kato Y, Mukoyama M, Yokoi H, et al.: p38 MAP kinase mediates aldosterone-induced podocyte injury in natriuretic peptide receptor (GC-A)-deficient mice. 第45回米国腎臓学会、2012年11月1日~11月4日、サンディエゴ、アメリカ

12. Mori KP, Mori K, Mukoyama M, et al.: Alteration of renal lipid deposition and gene expression induced by fasting and high-fat diet feeding. 第45回米国腎臓学会、2012年11月1日~11月4日、サンディエゴ、アメリカ

13. Kato Y, Mukoyama M, Yokoi H, et al.: Role of p38 MAPK in aldosterone-induced glomerular injury in natriuretic peptide receptor-A deficient mice. 第24回国際高血圧学会、2012年9月30日~10月4日、シドニー、オーストラリア

14. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al.: Aggravation of diabetic nephropathy by hyperlipidemia is mediated by MRP8/TLR4 signaling in macrophages. 第44回米国腎臓学会、2011年11月10日~11月13日、フィラデルフィア、アメリカ

15. Kato Y, Mukoyama M, Yokoi H, et al.: Blockade of p38 MAPK pathway ameliorates aldosterone-induced renal injury in guanylyl cyclase-A deficient mice. 第44回米国腎臓学会、2011年11月10日~11月13日、フィラデルフィア、アメリカ

16. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al.: Toll-like receptor 4-mediated, hyperinsulinemia-independent progression of diabetic nephropathy by hyperlipidemia. 第71回米国糖尿病学会、2011年6月24日~6月28日、サンディエゴ、アメリカ

17. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al.: Hyperlipidemia promotes diabetic renal injury via TLR4 signaling. 2011年世界腎臓学会、2011年4月8日~4月12日、バンクーバー、カナダ

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：腹膜癒着防止用医薬組成物
発明者：中尾一和、横井秀基、向山政志、笠原正登、古谷真優美
権利者：国立大学法人京都大学、第一三共株式会社
種類：特許
番号：特願 2011-49845
出願年月日：平成 23 年 3 月 8 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

向山 政志（MUKOYAMA MASASHI）
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40270558

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森 潔（MORI KIYOSHI）
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：60343232