

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591219

研究課題名(和文)細胞内アンジオテンシンII受容体を介した腎障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Possible roles of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II type 1 receptor on high glucose-induced damage in renal proximal tubular cells

研究代表者

高尾 俊弘 (TAKAO, TOSHIHIRO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00243824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高グルコースによる腎近位尿細管細胞障害においてアンジオテンシンII (Angiotensin II)、Tumor Necrosis Factor (TNF)alphaおよびタイプ1アンジオテンシンII受容体(ATR1)の関与について検討した。

高グルコースはヒト腎近位尿細管上皮細胞(HK2細胞)においてNADPHオキシダーゼを活性化し、近位尿細管細胞障害を惹起した。高グルコースによるNADPHオキシダーゼを活性化の少なくとも一部にはAngiotensin IIおよびTNFが関与しており、さらにAngiotensin IIおよびTNFによるNADPHオキシダーゼ活性化にはATR1が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High glucose treatment (30 mM) significantly increased N-acetyl-beta-glucosaminidase (NAG) release, tumor necrosis factor (TNF)alpha/angiotensin II concentrations in cell media and p22phox protein levels compared with those in regular glucose medium (5.6 mM). Candesartan, an angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker, showed a significant reduction on high glucose-induced NAG release, TNFalpha concentrations and p22phox protein levels in human renal proximal tubular epithelial cells (HK2 cells). In addition, significant decreases of NAG release, TNFalpha concentrations and p22phox protein levels in HK2 cells were observed in high glucose-treated group with thalidomide. AT1R knockdown with siRNA markedly reversed high glucose, angiotensin II or TNFalpha-induced p22phox protein levels in HK2 cells. TNFalpha may be involved in high glucose-induced renal tubular damage in HK2 cells possibly via AT1 receptor signaling.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：近位尿細管 グルコース アンジオテンシン受容体 酸化ストレス 腫瘍壊死因子

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管は尿の再吸収をはじめ多彩な生理作用を有する。糖尿病性腎症においては糸球体のみならず尿細管も障害部位として重要である。

糖尿病性腎症における近位尿細管障害の成因にはグルコースそのものの他、活性酸素種 (ROS) などが複雑に関与している。我々は以前、マウス腎近位尿細管上皮細胞を用いた研究で、高グルコースにより培養液中の *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) および細胞内の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、p22<sup>phox</sup> 蛋白が増加し、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) はこれらの増加を抑制することを報告した。このことにより高グルコースによって増加した酸化ストレスが尿細管障害に関与することが明らかになった。

2. 研究の目的

高グルコースによる腎近位尿細管細胞障害においてアンジオテンシン II (AII)、Tumor Necrosis Factor (TNF) およびタイプ1アンジオテンシン II 受容体 (ATR1) の関与について検討した。

3. 研究の方法

ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (HK2 細胞) を培養実験に使用した。ATR1 阻害薬としてカンデサルタン (CAN) を使用した。培養液中にグルコース (低グルコース 5.6 mM および高グルコース 30mM) 単独または CAN あるいは TNF 阻害薬である Thalidomide (Thal) を同時添加し、培養液中の AII、TNF、*N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) および細胞内の p22<sup>phox</sup> 蛋白を市販の ELISA キットおよび Western Blot 法を用いて測定した。さらに ATR1 を siRNA でノックダウンした後、高グルコース、AII および TNF を添加し p22<sup>phox</sup> 蛋白を測定した。

4. 研究成果

HK2 細胞において高グルコース (30mM) は培養液中の NAG を有意に増加させ、CAN および Thal はこれらの増加を抑制した (図 1)。

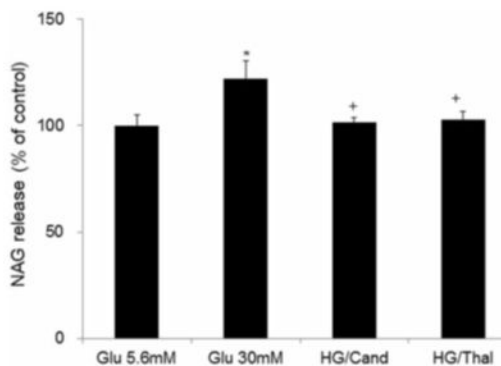


図 1 高グルコース (30mM) による NAG 増加に対する CAN、Thal の効果

Glu: glucose, HG: high glucose

treatment (30 mM), Cand: candesartan, Thal: thalidomide

また HK2 細胞において高グルコースは p22<sup>phox</sup> 蛋白を増加させ、CAN および Thal はこれらの増加を抑制した (図 2)。

さらに HK2 細胞において高グルコースは TNF を増加させ CAN および Thal はこれらの増加を抑制した (図 3)。

また HK2 細胞において高グルコースは AII を増加させ CAN および Thal はこれらの増加を抑制した (図 4)。

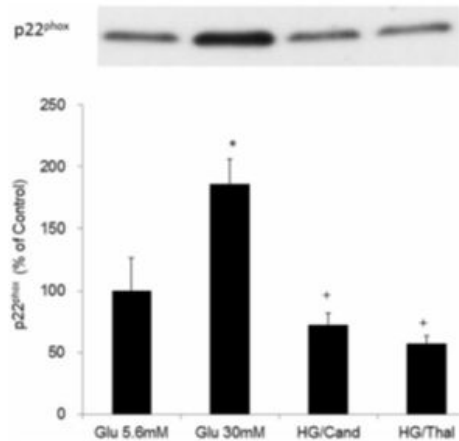


図 2 高グルコース (30mM) による p22<sup>phox</sup> 蛋白増加に対する CAN、Thal の効果

上段は Western Blot 法による p22<sup>phox</sup> 蛋白の典型的なバンドを示す。

Glu: glucose, HG: high glucose treatment (30 mM), Cand: candesartan, Thal: thalidomide

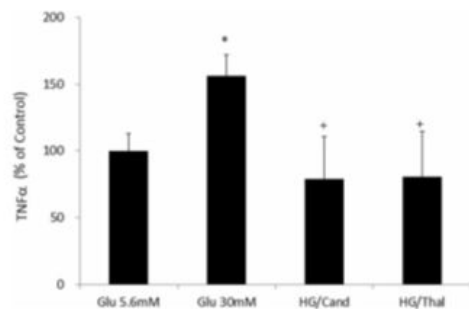


図 3 高グルコース (30mM) による TNF 増加に対する CAN、Thal の効果

Glu: glucose, HG: high glucose treatment (30 mM), Cand: candesartan, Thal: thalidomide

高グルコース、AII および TNF はネガティブコントロール細胞において p22<sup>phox</sup> 蛋白を有意に増加させた。一方、ATR1 を siRNA でノックダウンした細胞においては高グルコース、AII および TNF による p22<sup>phox</sup> 蛋白の増加はみられなかった (図 5)。

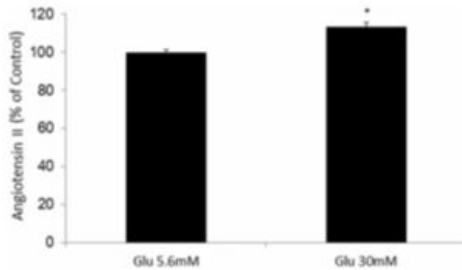


図4 高グルコース (30mM) による AII 増加に対する CAN、Thal の効果  
Glu: glucose

高グルコースは HK2 細胞において NADPH オキシダーゼを活性化し、近位尿細管細胞障害を惹起した。高グルコースによる NADPH オキシダーゼを活性化の少なくとも一部には AII および TNF が関与しており、さらに AII および TNF による NADPH オキシダーゼ活性化には ATR1 が関与する可能性が示唆された。このことは糖尿病性腎症において高グルコースによる尿細管障害に加えて、TNF による更なる障害に対して ATR1 阻害は尿細管障害の防御に有用である可能性を示唆した。

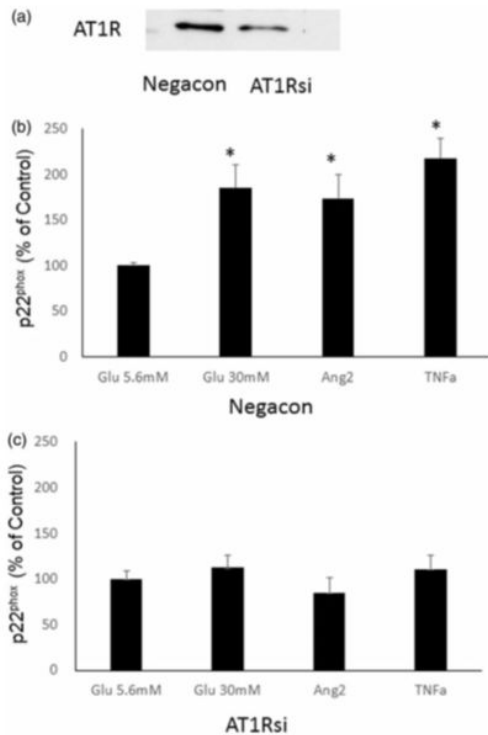


図5 高グルコース、AII および TNF による p22phox 蛋白増加に対する siRNA の効果  
(a) siRNA による AT1R 蛋白ノックダウンの典型例  
(b)ネガティブコントロールを用いた時の高グルコース、AII および TNF に対する p22phox 蛋白の反応  
(c) siRNA を用いた時の高グルコース、AII および TNF に対する p22phox 蛋白の反応

Glu: glucose, Ang: angiotensin, TNF: Tumor Necrosis Factor

### 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)

Takao T., Horino T, Matsumoto R, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Terada Y. Possible roles of tumor necrosis factor- and angiotensin II type 1 receptor on high glucose-induced damage in renal proximal tubular cells. Ren Fail. 査読有, 2015 Feb; 37(1):160-4. DOI: 10.3109/0886022X.2014.959434.

[学会発表](計 4 件)

高グルコースによる腎近位尿細管細胞障害にはアンジオテンシン II タイプ1受容体を介してアンジオテンシン II および Tumor Necrosis Factor が関与する.高尾 俊弘, 堀野 太郎, 寺田 典生. 第 37 回日本高血圧学会総会 2014年10月17日~19日 横浜 パシフィコ横浜

高グルコースによる腎近位尿細管細胞障害に対する Tumor Necrosis Factor alpha とアンジオテンシン II 受容体の関与.高尾 俊弘, 堀野 太郎, 寺田 典生. 第 36 回日本高血圧学会総会 2013年10月24日~26日 大阪 大阪国際会議場

Takao T., Horino T., Shimamura Y., Ogata K., Inoue K., Taniguchi Y., Taguchi T., Kagawa T., Terada Y., Suppression of tumor necrosis factor alpha by angiotensin II blockers on high glucose-induced renal proximal tubular cell damage. The 24th Meeting of the International Society of Hypertension, Sydney Australia, Sydney Convention and Exhibition Centre, September30-October 4, 2012

Takao T., Horino T., Shimamura Y., Ogata K., Inoue K., Taniguchi Y., Taguchi T., Kagawa T., Terada Y., Effect of angiotensin II blockers on high glucose-induced cell damage through tumor necrosis factor alpha in renal proximal tubular cells. the 22nd Scientific Meeting of the European Society of Hypertension (ESH), London, UK, ICC London, April 26-29, 2012

〔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：  
出願年月日：  
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 高尾 俊弘  
(TAKAO Toshihiro)  
川崎医科大学 教授  
研究者番号：00243824

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：