

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390214

研究課題名(和文) 鉱質コルチコイド/糖質コルチコイド受容体パラドックスの解明と腎臓病治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of mineralocorticoid receptor/ glucocorticoid receptor paradox and its application to kidney disease therapy

研究代表者

長瀬 美樹 (Nagase, Miki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60302733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Rac1によるMR活性化と臓器障害の機序につき検討した。足細胞特異的Rac1活性化、同Rac1 KOマウスは足細胞障害、アルブミン尿、糸球体硬化を自然発症し、Rac1活性とMR活性、MR阻害薬の保護効果が平行していた。マクロファージや心筋特異的Rac1/MR KOマウスでは心腎障害が軽微であった。肥満糖尿病性腎症、TAC心障害モデル、Ang II/食塩腎障害モデル、皮膚老化モデルにおいてRac1やMRの活性化、慢性炎症が関与し、Rac1阻害薬やMR拮抗薬により病変が改善した。以上、Rac1-MR系の標的細胞とシグナルカスケードを同定し、この系が関与する新たな病態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the mechanisms of Rac1-MR signaling in target organ injury in rodents. Podocyte-specific Rac1 activation mice as well as Rac1 KO mice spontaneously developed podocyte injury, albuminuria, and glomerulosclerosis. Rac1 activity was correlated with MR activity and organ protective response of MR antagonist. Myeloid-specific and cardiomyocyte-specific Rac1/MR KO mice were protected against renal and cardiac injury. Activation of Rac1/MR was demonstrated in obese diabetic KKAy mice, TAC-induced cardiac injury, AngII/salt-induced renal injury, and senescence-associated skin injury models.

研究分野：腎臓病学、解剖学、内科学

キーワード：鉱質コルチコイド受容体、糖質コルチコイド受容体、Rac1、足細胞、蛋白尿、メタボリックシンドローム、マクロファージ、心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病(CKD)に関する臨床的な関心が高まり、また潜在的な患者数が広く認知され、その分子メカニズムに根ざした新しい治療法の開発は喫緊の課題である。CKDの基礎疾患としては、糖尿病、高血圧、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病が大きな割合を占めている。

申請者は早くから生活習慣病を基盤とした腎障害、特にCKDの病態の中核をなす蛋白尿や糸球体濾過装置の異常などに着眼した研究を重ねてきた。そして高血圧の腎合併症として、糸球体における蛋白濾過最終バリアをなす足細胞の障害が重要であること、アルドステロン/鉱質コルチコイド受容体(MR)系が強い足細胞障害作用を示すことが判明した。申請者はまた、メタボリックシンドロームを呈するSHR肥満ラットの心腎障害がアルドステロン/MR系の活性化に強く依存すること、塩分過剰摂取によりMRシグナリングはさらに増強し、MR拮抗薬により障害は劇的に改善することを世界に先駆けて報告した。

一方、血中アルドステロン濃度が低い状況でも標的臓器でMR活性化、臓器障害が生じるような事例が見つかり、リガンドによらないMR活性化機構の存在が示唆された。申請者は、RhoGDI 遺伝子欠損マウスの解析を通して、低分子量G蛋白質Rac1がアルドステロン非依存性にMR活性化を引き起こし腎障害を促進すること、Rac阻害薬が新たなCKD治療薬となりうることを世界で初めて報告した。

このようにCKDモデルにおいて『Rac1 MR活性化』が腎障害の進展に関わることが示され、Rac阻害薬などによるMR活性制御が新たなCKD治療法として期待されるが、臨床応用を進めるにあたり、腎のどの細胞でRac1-MRのクロストークが生じているか、『Rac1 MR活性化 足細胞障害』の分子機序、本系が関与する臨床例など、現時点で解決すべきいくつかの課題が残っている。

特にMR活性化が足細胞障害を惹起する分子機序はほとんど解明されていない。ここで注目されるのが近縁の糖質コルチコイド受容体(GR)の足細胞保護作用である。GRリガンドのグルココルチコイドはネフローゼ症候群の代表的治療薬であり、全身の免疫抑制以外に足細胞に直接作用して細胞保護的に働くことが報告されている。MRにはグルココルチコイドもアルドステロンも結合しうる(実際11 HSD2が発現していない心筋、脂肪細胞、脳の海馬細胞ではMRのリガンドはグルココルチコイドである)。また、MRとGRは標的遺伝子プロモーター上にある共通のホルモン応答配列に結合すると考えられ、標的遺

伝子にも共通するものが存在する。にもかかわらず、一般にMR刺激は炎症原性に、GR刺激は抗炎症性に作用し、足細胞でもMRは障害性に、GRは保護的に働く。申請者はこの鍵を握っているのはエピジェネティック制御や転写共役因子動員機構の差異ではないかという仮説を持っており、このMR/GRパラドックスの解明はMRの足細胞障害メカニズムの理解に大きなヒントを与えてくれるものと期待している。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が最近同定した『Rac1によるリガンド非依存的なMR活性化機構と腎障害』を腎臓病治療に応用するための基盤研究として、その分子機序や治療標的を明らかにするとともに、本系が関与する臨床例を探索する。具体的には、

(1) 細胞特異的ノックアウト(KO)マウスを用いて、『RhoGDI 欠損 Rac1 MR活性化 足細胞障害』が糸球体足細胞において生じていることを検証する。

(2) 『Rac1 MR活性化 足細胞障害』の分子機序を、MR/GRパラドックスに着眼して解明する。

(3) マクロファージ特異的MR KOマウスを用いて腎障害モデルを作製し、浸潤マクロファージのRac1, MRの腎障害への寄与を検証する。またマクロファージのMR・GRシグナルを比較する。

(4) 臨床への橋渡しとして、腎MR活性の診断法の開発、臨床症例の解析から『Rac1 MR活性化』が病態を引き起こしている腎臓病患者の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 足細胞特異的KOマウスを用いて、『RhoGDIα欠損→Rac1→MR活性化→足細胞障害』が足細胞で生じていることを実証する。ごく最近、足細胞特異的RhoGDIαKOマウス(Neph-Cre^{+/+} RhoGDIαflox/floxマウス)の産出に成功し、本マウスでは全身性KOマウスと同様のアルブミン尿が出現し、MR拮抗薬によりほぼ正常化することを見出している。この結果より足細胞のRac1→MR活性化が足細胞障害惹起に重要であることが強く示唆され、単離糸球体のマイクロアレイ解析、足細胞障害所見の解析(アポトーシス、ネフリンの変化など)などを行い、病態のカスケードを解明する。一方、足細胞特異的MR KOマウスは通常飼育下では足細胞障害を発症しない可能性があり、片腎摘・アルドステロン・食塩などの負荷を行い、アルブミン尿、足細胞障害、糸球体硬化を同腹の対照マウスと比較し、足細胞に発現するMRの足細胞障害に対する直接的関与とそのメカニズムを検討する。

(2) 鈹質コルチコイド受容体 (MR) と糖質コルチコイド受容体 (GR) は標的遺伝子プロモーターの同一のホルモン応答配列に結合し、リガンド・受容体対応にもredundancyが認められるが、生体内ではMRは炎症原性・足細胞障害的に、GRは抗炎症性、足細胞保護的に作用する。このMR/GRパラドックスの解明のために、足細胞特異的GR KOマウスを作製し、足細胞に発現するGRの足細胞保護作用を解析し、同MR KOマウスの表現型と対比する。また、腎障害モデルに対してデキサメサゾン・MR拮抗薬・GR拮抗薬投与を行い、足細胞障害や分子カスケードの比較解析を行う。

(3) マクロファージ特異的MR KOマウス、足細胞特異的MR KOマウス、尿細管特異的MR KOマウスにおいて片腎摘・アルドステロン・食塩負荷モデルを作製し、各KOマウスでは腎障害のどのcomponent (炎症、線維化、腎肥大、アルブミン尿、糸球体硬化)が改善するか解析する。

(4) 『Rac1→MR活性化→足細胞障害』の機序につき、Rac1によるMR活性化の分子メカニズムの解明 (直接的結合の有無、Rac1によるリン酸化蛋白の解析、細胞骨格や酸化ストレスとの関係、腎障害モデルでRac1活性化を引き起こすGDP-GTP交換因子GEFやGTPase活性化因子GAPの同定など)、転写共役因子動員の細胞/リガンド特異性、エピジェネティック制御などに着眼し解析する。

4. 研究成果

(1) 足細胞特異的 KO マウスの解析

足細胞特異的RhoGDIα KOマウスと同Rac1 KOマウスを作製し、足細胞障害を自然発症することを見出し、その分子機序を明らかにした。前者にはRac1過剰活性化、鈹質コルチコイド受容体 (MR)活性化が関与しており、糖尿病やメタボリックシンドローム、高血圧などの病態モデルにおける足細胞障害と類似しており、Rac1阻害薬やMR拮抗薬が有用であった。後者ではMRシグナルは低下しており、MR拮抗薬は無効で、異なるメカニズムの関与が示された。

足細胞特異的GR KOマウスを作製したところ、通常飼育下ではポドサイト障害を発症しなかった。一方、LPSによるポドサイト障害はKOマウスで軽微であり、GRがポドサイト障害機転において障害性に働くものと考えられた。GRシグナルの標的遺伝子も同定しており、腎障害におけるGRの、抗炎症とは異なる新たな役割を明らかにすることができた。ネフローゼ症候群に対するステロイド治療時に、このポドサイトGRシグナルがどのように影響を受けるかについては臨床的にも重要な

問題であり、今後さらなる検討を要する。足細胞特異的MR KOマウスは表現型を解析中である。

(2) メカニズムの解析

培養ポドサイトを用いた RhoGDIα-Rac1-MR パスウェイの解析、RhoGDIα ノックダウンにより Rac1 活性上昇、細胞の形態変化、MR シグナルの増強が細胞レベルで示された。一方、Rac1 knockdownではmotilityが低下した。また、局所におけるRac1活性を検出することに成功し、活性化部位にフォーカスしてその形態機能解析を進めたところ、cortical F-actin ring形成、リン酸化カスケードの賦活化などを見出した。また、Rac1活性とMRの間に相関が認められた。

RhoGDIα-Rac1-MR 系の標的細胞の同定と細胞特異的標的遺伝子の網羅的解析 RhoGDIα KO マウスではRac1 活性化によるMR シグナル増強が生じる。その標的細胞を特定するために、RhoGDIαの腎臓内局在を免疫二重染色により解析した所、腎糸球体ポドサイトと遠位尿細管に局在していた。すなわち、全身性 RhoGDIαKO マウスではポドサイト、遠位尿細管細胞においてRac1 を介するMR 過剰活性化が生じているものと考えられた。そこで、MR のゲノム作用を介する腎障害メカニズムとその細胞特異性を検証する目的で、培養遠位尿細管細胞株 mDCT cells と培養ポドサイト細胞株にアルドステロン刺激を加えた際、核内受容体であるMR がどの遺伝子のプロモーター領域に結合するか、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析により網羅的に解析した。さらにChIP-seq とマイクロアレイ解析を組み合わせ、遠位尿細管細胞、ポドサイトにおけるMR 標的遺伝子を同定した。その結果、細胞毎に独自のMR 結合プロファイルが観察され、腎遠位尿細管細胞株ではゲノム上の1113ヶ所に有意なMR 結合領域が見いだされ、標的遺伝子として既知・未知の遺伝子が同定された。培養ポドサイト細胞株では腎遠位尿細管細胞株とは全く異なる結合プロファイルを呈した。以上の内容を、Ueda K, Nagase M et al. BBRC 2014 に報告した。

(3) モデル動物、マクロファージや心筋細胞特異的 KO マウスにおける Rac1 や MR シグナリングの役割

我々は、肥満糖尿病を呈するKKAY マウスの腎障害の解析を行い、本モデルでは腎臓のRac1 活性化、MR シグナル亢進、血中アルドステロン上昇が認められること、Rac1 阻害薬投与がMR シグナルを抑制し、腎障害を軽減させることが示された。すなわち、肥満糖尿

病 KKAy モデルにおいて、アルドステロンと高グルコースによる Rac1 活性化がリガンド依存性、非依存性に MR を活性化し、腎障害を惹起するものと考えられた。さらに、培養メサンギウム細胞において高グルコースが Rac1-MR 経路を活性化することが示された。以上の内容を、Yoshida S, Nagase M et al. *Nephron Exp Nephrol* 2014 に報告した。

Ang II を過剰産生するつくば高血圧マウスの腎障害は厳しい減塩下では見られず、高食塩で著しく増悪した。この食塩感受性腎障害は副腎摘およびアルドステロン補充で寛解・増悪したことから、腎の Ang II/AT1 受容体シグナルではなくアルドステロン/MR シグナルが関与するものと考えられた。食塩負荷つくばマウスでは血中アルドステロン濃度は低いものの、腎の Rac1 活性、MR シグナルが増強し、Rac 阻害薬や MR 拮抗薬にて Rac1-MR 系を抑制すると腎障害は改善した。一方、これらに影響しないヒドララジンでは改善しなかった。このように、Ang II・食塩による腎障害では Rac1-MR 系が中心的に働くことが示された。以上の内容を Kawarazaki W, Nagase M et al. *JASN* 2012 に報告した。

我々は、皮膚老化モデルとして紫外線照射メタボリックシンドロームモデル皮膚の解析を行ったところ、酸化ストレス亢進、炎症所見とともに MR シグナリング亢進を認め、これらマーカーならびに皮膚病変は MR 阻害薬含有軟膏塗布によって改善した。以上より、皮膚老化の過程に MR シグナリングが関与する可能性が示唆された。以上の内容を Nagase T, Nagase M et al. *Aging Cell* 2013 に報告した。

マクロファージ特異的 Rac1 KO マウス、MR KO マウスを用いてリポポリサッカライド(LPS)による急性腎障害モデルを作製し、浸潤マクロファージにおける Rac1-MR 系のクロストークが炎症性サイトカイン産生を介して腎障害の炎症機転に寄与することを示した。以上の内容を、Nagase M et al. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting* 2014 で発表した。

心筋細胞特異的 KO マウスを用いた検討心筋細胞特異的 Rac1 KO マウスの作出に成功し、心筋における『Rac1-MR 系』の検証を進めている。心筋細胞特異的 Rac1 KO ホモマウスは胎生致死であったが、ヘテロマウスでは大動脈縮窄(TAC)による圧負荷心不全による心障害が軽減すること、その過程に Rac1-MR 系が関与することが示された。心筋特異的 MR KO マウスにおいても類似の表現型が認められた(Ayuzawa N, Nagase M et al. 論文投稿中)。

(4) 臨床への橋渡し

培養細胞レベルでは活性化 Rac1 を in situ で検出する方法を確立した。こうした細胞では cortical F-actin ring の形成が認められた。現在 in vivo 切片へ応用中である。

なお、患者検体を用いた解析は、研究代表者が医学部臨床系教室(東京大学腎臓内分泌内科)から基礎系教室(順天堂大学解剖学・生体構造科学)に異動したため、期間中に遂行することができなかった。

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 11 件)

Kawarazaki W, Nagase M, Yoshida S, Takeuchi M, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Fujita T. Angiotensin II- and salt-induced kidney injury through Rac1-mediated mineralocorticoid receptor activation. *J Am Soc Nephrol* 査読有 23: 997-1007, 2012, doi: 10.1681/ASN.2011070734

Nagase T, Akase T, Sanada H, Minematsu T, Ibuki A, Huang L, Asada M, Yoshimura K, Nagase M, Shimada T, Aburada M, Nakagami G, Sugama J. Aging-like skin changes in metabolic syndrome model mice are mediated by mineralocorticoid receptor signaling. *Aging Cell* 査読有 12: 50-57, 2013, doi: 10.1111/accel.12017

Nagase M, Fujita T. Role of Rac1-mineralocorticoid-receptor signalling in renal and cardiac disease. *Nat Rev Nephrol* 査読有 9: 86-98, 2013, doi: 10.1038/nrneph.2012.282

Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Local mineralocorticoid receptor activation and the role of Rac1 in obesity-related diabetic kidney disease. *Nephron Exp Nephrol* 査読有 126: 16-24, 2014, doi: 10.1159/000358758

Ueda K, Fujiki K, Shirahige K, Gomez-Sanchez CE, Fujita T, Nangaku M, Nagase M. Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 445: 132-137, 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.125

[学会発表](計 30 件)

Nagase M, Ueda K, Ishizawa K, Ayuzawa N, Yoshida S, Shindo T, Sakurai T, Matsusaka T, Nangaku M, Fujita T: Complete Regression of Existing Podocyte

Injury by Mineralocorticoid Receptor Blockade in Podocyte-Specific Arhgdia Knockout Mice. **American Society of Nephrology Kidney Week 2012** Nov 3, 2012, San Diego (USA)

Nagase M. Recent topics on podocyte and aldosterone (Symposium, oral, invited). **8th International Congress on Uremia Research and Toxicity**, Mar 14, 2014, Okinawa Convention Center (Ginowan, Okinawa)

Nagase M. Sakai T, Fujita T. Role of Rac1 in podocyte injury and glomerulosclerosis (Symposium, oral, invited). **ISN Nexus Symposium**, Oct 26, 2014, Brisbane (Australia)

Nagase M. Sakai T. Rac1-mineralocorticoid receptor pathway in rodent macrophage contributes to inflammation-mediated kidney injury (oral). Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses 2014, Nuclear Receptors & Disease, Nov 1, 2014, New York (USA)

Nagase M. Sakai T. Regulation of podocyte structure and function: roles of Rho family proteins and their modulators (シンポジウム, 口演, 招待). 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会, Mar 21, 2015, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県、神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labou_kaibou_seitaikouzo/k4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀬 美樹 (NAGASE, Miki)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60302733

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし