

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591220

研究課題名(和文)腎線維化における酸化ストレス依存的Wntシグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the oxidation stress-dependent Wnt signaling on renal fibrosis

研究代表者

佐藤 稔(Sato, Minoru)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70449891

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)：「酸化ストレス増加による β -catenin/FOXO複合体形成増加が線維形成性サイトカイン分泌を増加させる」との仮説を立て、検証した。ヒト培養尿管上皮細胞を、活性酸素存在下でWnt3a刺激を行い、G2/M期で誘導される線維形成性サイトカイン発現を検討した。酸化ストレスによるG2/M期誘導機序も検討した。活性酸素存在下ではWnt刺激によるG2/M期への細胞誘導が増加した。また、GADD45aなどG2/M期細胞特有遺伝子発現が増加した。このG2/M期細胞ではCTGFの発現が増加していた。酸化ストレスは細胞のG2/M期での細胞周期停止と引き続く線維形成性サイトカイン分泌を増加させる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that oxidative stress-dependent β -catenin signaling could promote renal fibrosis by leading to cell cycle arrest at the G2/M phase in tubular epithelial cells. In vitro experiment, we examined whether the profibrotic cytokine expression at the G2/M phase is increased by Wnt3a stimulation with oxidative stress in human proximal tubule epithelial cells. In vitro, cell cycle arrest in G2/M phase was increased by the Wnt stimulation under the presence of hydrogen peroxide. In addition, Wnt3a with hydrogen peroxide also increased growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45a and cyclin G2 genes with increase of β -catenin/FOXO complex. In the G2/M phase cells, transforming growth factor (TGF)- β and connective tissue growth factor (CTGF) expressions were increased. Oxidative stress with Wnt stimulation induces G2/M cell cycle arrest and increases profibrotic cytokine production. Reduction of the oxidative stress could ameliorate the renal fibrosis.

研究分野：腎臓

キーワード：線維化 細胞周期 Wnt FOXO

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病が進行すると、その原因疾患によらず腎臓の線維化を来す。腎線維化進行とともに腎機能の回復は困難となり、腎機能低下が進行する原因となる。近年の報告で、急性腎臓病後の腎線維化モデルを用い、尿細管上皮細胞の細胞周期が G2/M 期で停止することと腎線維化進行とに関連があることが明らかとされた。しかしながら、腎線維化過程で「尿細管細胞が G2/M 期で細胞周期が停止する機序」に関しては今のところ報告がなく不明である。

Wnt シグナル経路はさまざまな細胞の増殖、分化、極性などを制御している。腎臓においても腎線維化時に Wnt が増加していること、Wnt 抑制により線維化が抑制されることなどが報告されている。

Wnt の結合により β -catenin が増加する。増加した β -catenin は核内へ移動して通常転写因子 T-cell factor (TCF) と結合して標的遺伝子の転写を活性化させる。しかし、 β -catenin は、酸化ストレスに反応して FOXO の転写活性を増進させる作用も報告されている。FOXO の標的遺伝子には、GADD45、cyclin G2 などの G2/M 期に細胞を誘導する遺伝子が多く含まれる。すなわち、酸化ストレス条件下では β -catenin による、FOXO を介したシグナル伝達が優位となり、TCF を介したシグナル伝達を抑制し、細胞周期の進行を抑制し、G2/M 期に細胞を誘導している可能性がある。

2. 研究の目的

一連の研究の学術的背景に基づき、「尿細管細胞が G2/M 期で細胞周期が停止する機序」に関して「酸化ストレス増加による β -catenin/FOXO 複合体形成増加」が関与していると考え、「腎尿細管細胞の Wnt/ β -catenin シグナル活性化に対する酸化ストレス制御は線維化進展に対する新たな治療法開発の標的となる」との仮説を立てるに至った。本仮説検証のため、具体的には以下の項目の解明を目的に本研究を行った。I. 酸化ストレス変化による Wnt/ β -catenin シグナル活性化後の遺伝子発現変化と G2/M 期誘導細胞の線維化促進因子発現変化を明らかとする。II. マウス腎線維化モデルでの酸化ストレス変化に対する Wnt/ β -catenin シグナル伝達系変化と腎線維化の関連を明らかとする。

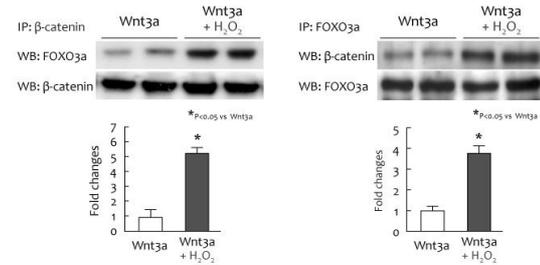
3. 研究の方法

(1) ヒト培養尿細管上皮細胞を用いた。活性酸素存在下において、LiCl で Wnt 刺激を行い、G2/M 期へ細胞誘導された細胞の比率を FACS にて検討した。また、G2/M 期細胞では線維形成性サイトカインの TGF- β 、CTGF の mRNA 発現が増加するのかを検討した。また、酸化ストレスによる FOXO のリン酸化、 β -catenin/FOXO 複合体形成も Western-blot で検討した。

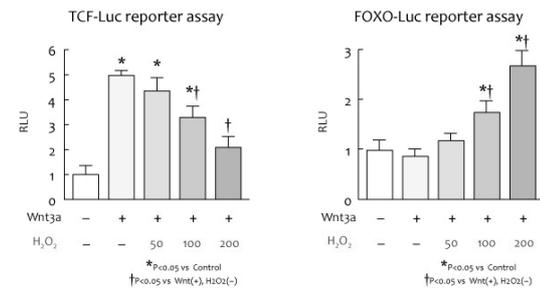
(2) 自然発症ネフローゼモデルマウスである ICGN を用いた。5 週齢 ICGN マウスに抗酸化剤として Tempol を 10 週間飲水投与し、腎尿細管の G2/M 期細胞、組織線維化を検討した。

4. 研究成果

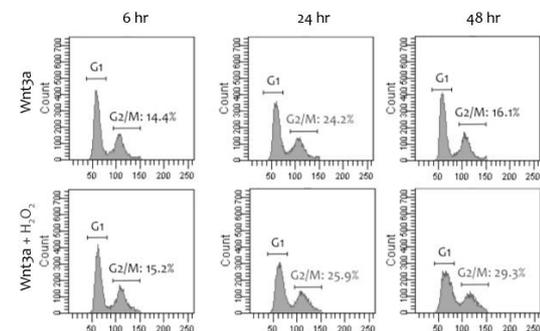
(1) 活性酸素存在下では活性酸素非存在下と比較し、 β -catenin/FOXO3a 複合体が増加した。酸化ストレス条件下では FOXO3a と β -catenin は複合体形成が増加していた。



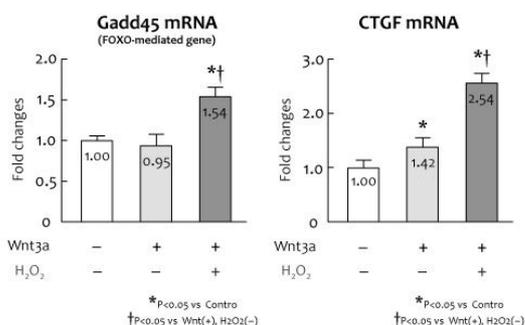
また、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイで転写因子活性を測定したところ、活性酸素存在下では β -catenin/TCF シグナルから、 β -catenin/FOXO シグナルへのスイッチングが生じていた。添加する活性酸素産生量の増加と共に、 β -catenin/TCF により誘導されるシグナルは減弱し、 β -catenin/FOXO により誘導されるシグナルは増強していた。



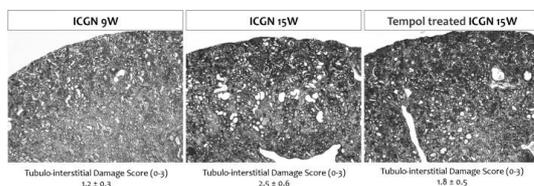
活性酸素存在下では活性酸素非存在下と比較し、Wnt 刺激による G2/M 期への細胞誘導が増加した。FACS で細胞周期を計測すると、活性酸素存在下では 48 時間後の G2/M 期細胞比率が 29.3%と活性酸素非存在下の 16.1%都比较して有意に高値を示した。



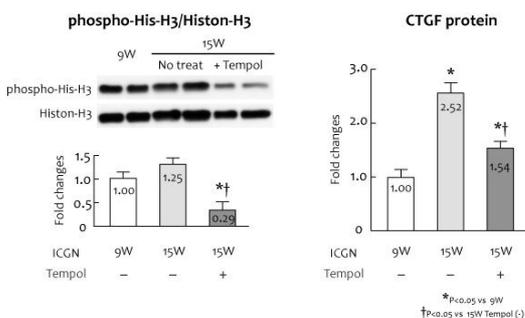
G2/M 期細胞特有蛋白 GADD45a の遺伝子発現も、活性酸素存在下では活性酸素非存在下と比較し、増加していた。この G2/M 期細胞では CTGF の発現も増加していた。



(2) Tempol 投与 ICGN マウスでは腎組織線維化が軽減していた。線維化指数は 2.5 から 1.8 に低下していた。



尿細管の G2/M 期細胞数に比例する phospho-Histon H3 の比率は、ICGN マウスと比較し、Tempol 投与 ICGN マウスで有意に減少していた。CTGF 発現も Tempol 投与 ICGN マウスで低下していた。



酸化ストレスは細胞の G2/M 期での細胞周期停止と引き続く線維形成性サイトカイン分泌を増加させる。臨床的に、酸化ストレスの軽減が腎の線維化を軽減させる可能性がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

佐藤稔、角谷裕之、板野精之、内田篤志、庵谷千恵子、佐々木環、柏原直樹、腎線維化における酸化ストレス依存的 Wnt シグナル伝達制御機構の解明、第 19 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2014 年 11 月 21 日、横浜市開港記念会館、横浜

Minoru Satoh、Hiroyuki Kadoya、Seiji Itano、Atsushi Uchida、Chieko Ihoriya、Tamaki Sasaki、Naoki Kashihara、Enhancement of Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inducing Cell Cycle Arrest at the G2/M Phase in Tubular Epithelial Cells、ASN Kidney Week 2014、2014 年 11 月 14 日、Pennsylvania Convention Center、フィラデルフィア/米国

佐藤稔、角谷裕之、板野精之、内田篤志、庵谷千恵子、佐々木環、柏原直樹、腎線維化における酸化ストレス依存的 Wnt/ β -catenin シグナル伝達制御機構の解明、第 57 回日本腎臓学会学術総会、2014 年 07 月 04 日、パシフィコ横浜、横浜

佐藤稔、角谷裕之、板野精之、佐々木環、柏原直樹、酸化ストレスは FOXO/ β -catenin 複合体形成を促進し、線維形成性サイトカイン分泌を増加させる、第 51 回日本臨床分子医学学会学術集会、2014 年 04 月 11 日、東京国際フォーラム、東京

佐藤稔、板野精之、角谷裕之、庵谷千恵子、佐々木環、柏原直樹、酸化ストレス依存的 Wnt シグナル活性化の加齢腎線維化における影響、脳心血管抗加齢研究会 2013、2013 年 12 月 14 日、梅田スカイビル、大阪

佐藤稔、板野精之、角谷裕之、庵谷千恵子、佐々木環、柏原直樹、第 25 回腎とフリーラジカル研究会、2013 年 10 月 06 日、昭和大学旗の台キャンパス、東京

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤稔 (SATO, Minoru)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70449891

(2)研究分担者

柏原直樹 (KASHIHARA, Naoki)

川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：10233701

(3)研究協力者

角谷裕之 (KADOYA, Hiroyuki)
川崎医科大学・医学部・臨床助教
庵谷千恵子 (IHORIYA, Chieko)
川崎医科大学・医学部・臨床助教
頼正悦子 (YORIMASA, Etsuko)
川崎医科大学・医学部・研究補助員
花田里美 (HANADA, Satomi)
川崎医科大学・医学部・研究補助員
佐藤恵子 (SATO, Keiko)
川崎医科大学・医学部・研究補助員