

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461218

研究課題名(和文)モノアミンメチル化酵素を標的とした新たな慢性腎臓病進展因子の解明

研究課題名(英文)Role of Indolethylamine N-methyltransferase in chronic kidney disease

研究代表者

宇津 貴 (Uzu, Takashi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20422884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミンメチル化酵素であるInmtの尿細管障害における役割を検討した。培養尿細管細胞において、Inmt発現抑制により、アポトーシスおよび炎症は亢進し、Inmtを過剰発現することによって、これらの反応は抑制された。これらの結果より、Inmtは尿細管障害に対し保護的な働きをしていることが示唆された。この現象を近位尿細管特異的Inmt欠損マウスの作成

研究成果の概要(英文)：We examined the role of Indolethylamine N-methyltransferase, a new target for the tubular damage, in chronic kidney disease. In the proximal culture cells, cell damages were reduced by over-expression of Inmt. On the other hand, those damages were enhanced by the inhibition of Inmt by using specific siRNA. However, we found no differences between wild and Inmt KO mice in the chronic kidney diseases models.

研究分野：腎臓病学

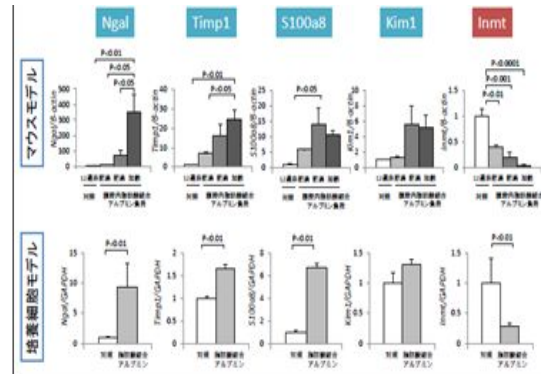
キーワード：尿細管 糖尿病性腎症

## 1. 研究開始当初の背景

肥満者の増加や人口の高齢化を背景とした慢性腎臓病の増加に伴い、末期腎不全患者数は年々増加している。慢性腎臓病の主たる病態である糸球体疾患では、尿蛋白量の増加に伴う尿細管障害の進展が腎機能低下を引き起こす原因となる。そこで、これまでの研究では「尿蛋白量の減少」を目指した糸球体病変の改善を目指した研究が進められてきた。その結果、種々の治療法が開発され、尿蛋白の減少、腎予後改善がもたらされるようになった。一方で、これらの治療によっても尿蛋白が減少せず、尿細管障害が進展し、末期腎不全に至る症例も未だ多く存在しており、これは今後解決すべき重要課題の一つと考えられている。そこで我々は、「尿蛋白に対する尿細管細胞保護機構の解明」という新たな視点で研究を行うことで、尿蛋白を減少できない症例に対する尿細管保護を目的とした新規治療標的の解明を目指すこととした。特に、肥満や加齢を背景とした尿細管病変増悪機構に着目し検討することで、これまでにない、より臨床的意義の高い治療標的分子機構の同定を試みることにした。

肥満や加齢による尿細管障害は、マウス実験でも確認されている。腹腔内アルブミン連日注入により作成した尿蛋白モデルを用いた検討では、非肥満若年マウスに比し、肥満及び24ヵ月齢(加齢)マウスでは、尿蛋白による腎尿細管病変が顕著に増悪した。そこで、これら4群の摘出腎から作成したcDNAを用いDNA Microarrayを行った結果、肥満と加齢に共通した尿細管病変増悪関連遺伝子として57遺伝子のスクリーニングに成功した(図1)。その中で、13遺伝子が近位尿細管細胞に特異的に発現する遺伝子であること、また4遺伝子は既報の尿細管病変進展関連遺伝子であることが確認された。しかし、残り9遺伝子に関しては腎疾患との関連は報告されていなかったため、培養近位尿細管細胞を用

いこれら9遺伝子の機能解析を行ったところ候補遺伝子9遺伝子中の1遺伝子、Indolethylamine N-methyltransferase (Inmt)の発現変化が、細胞実験および動物実験において認められたため(下図)、Inmt



遺伝子を尿蛋白関連尿細管障害の増悪に関わる新規遺伝子として注目し、検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

尿蛋白による尿細管障害に関連した遺伝子として同定した Inmt に関し、その発現変化や標的分子(メチル化標的分子)が、尿細管障害の進展に影響を及ぼすか否かを確認し、新たな治療法の可能性を探求する。

## 3. 研究の方法

培養近位尿細管細胞を、脂肪酸結合アルブミン刺激で刺激し、Inmt の抑制および過剰発現によるアポトーシスおよび炎症の変化を検討する。さらに Inmt によるメチル化標的分子の1つであるセロトニンによる変化を観察する。

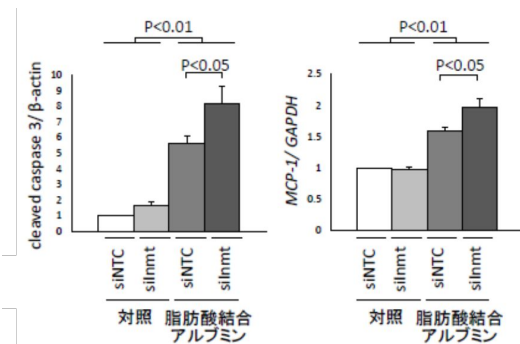
近位尿細管特異的 Inmt 欠損マウスを作製し、これらマウスに対し腹腔内アルブミン負荷による尿蛋白病態モデルを誘発し、Inmt 発現の変化が尿蛋白に伴う尿細管障害の進展に及ぼす影響を検討する。さらに、肥満による尿細管障害に関する Inmt の影響を行うため高脂肪食誘発肥満マウスにおいて腹腔内アルブミン負荷を行い、上記と同様の検討を行う。

新規尿細管病変マーカーとしての可能性を探索するため、抗 *Inmt* 抗体を作成しマウスの血液・尿・腎組織、を用い検討する。

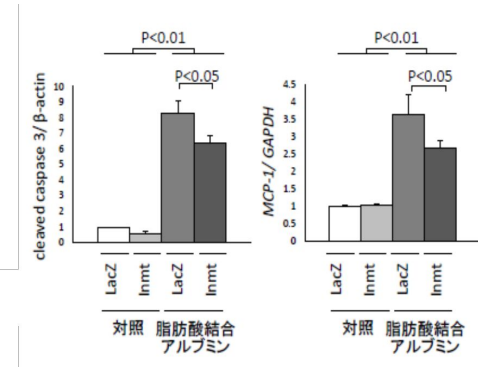
#### 4. 研究成果

培養近位尿細管細胞を用いた検討。

siRNA による *Inmt* 発現を抑制 24 時間後、あるいは lipofection による *Inmt* 過剰発現 24 時間後に、脂肪酸結合アルブミン刺激を行い、アポトーシスを cleaved caspase 3 で、炎症を MCP-1 で評価した。結果 *Inmt* の発現抑制により、アポトーシスおよび炎症は亢進し、*Inmt* を過剰発現することによって、これらの反応は抑制された（下図）。これらの結果より、*Inmt* は尿細管障害に対し保護的な働きをしていることが示唆された。



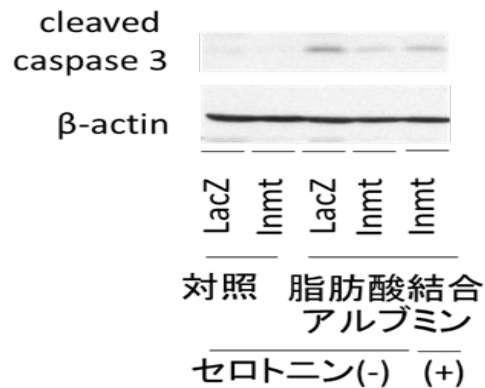
*Inmt* の発現抑制による変化（培養尿細管細胞）



*Inmt* の過剰発現による変化（培養尿細管細胞）

次に、セロトニンが脂肪酸結合アルブミン刺激によるアポトーシス、炎症反応に影響を及ぼすか否かを検討した。セロトニンは *Inmt* によって代謝を受けるため、セロトニンの投与によって *Inmt* の過剰発現による抗アポトーシス・

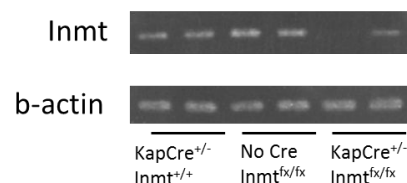
抗炎症作用は消失することは予想される。そこで前述の実験と同様に *Inmt* の過剰発現を行った尿細管細胞に脂肪酸結合アルブミンとセロトニンの同時負荷を行った。その結果、セロトニンと共孵置した細胞では、*Inmt* 過剰発現によるアポトーシス抑制効果が消失していた。



#### 1 近位尿細管特異的 *Inmt* 欠損マウスの作成

*Inmt*-flox マウスを作製し、タモキシフェン誘導型近位尿細管特異的 Cre 発現マウスと、との交配により、近位尿細管特異的 *Inmt* 欠損マウスを作製した。近位尿細管の存在する、腎皮質における *Inmt* の発現は、Cre 発現マウスあるいは *Inmt*-flox マウスに比し低下していた。

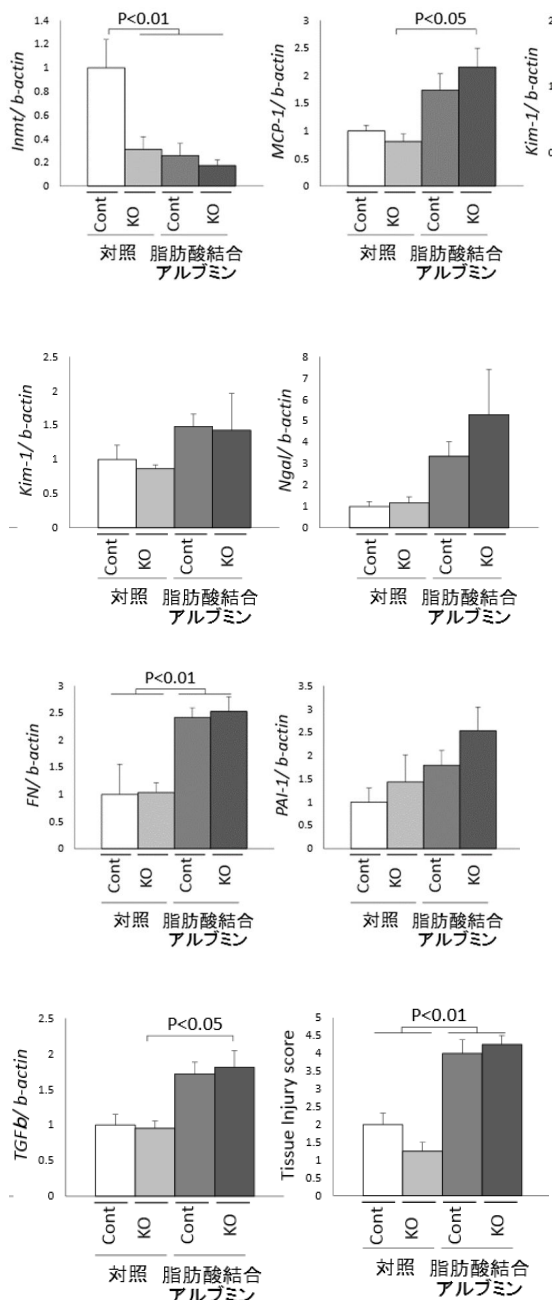
mRNA level of *Inmt* in kidney cortex



#### 2 蛋白尿モデルマウスにおける尿細管障害に対する *Inmt* の関与

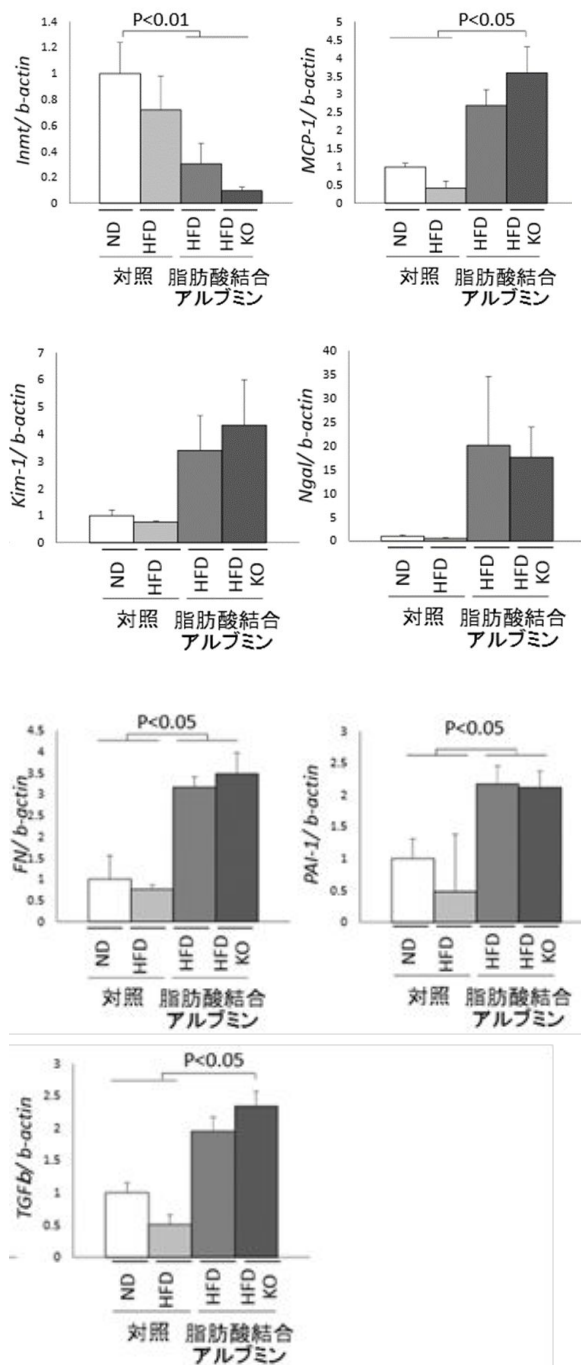
近位尿細管特異的 *Inmt* 発現抑制マウスにおいて、腹腔内アルブミン投与によって蛋白尿尿細管障害モデルマウスの作製を行い、*Inmt* の影響を検討した。腹腔内アルブミン投与によって *Inmt* 発現は低下し、MCP-1 は上昇、NGAL や KIM-1 などの障害マーカーは上昇した。ま

た、腎の組織においてフィブロネクチン(FN)、PAI-1、TGF- $\beta$  の上昇が認められた。近位尿細管 *Inmt* 欠損マウスにおいても、これらの変化はコントロールマウスと同様であり、腹腔内アルブミン投与による変化は、*Inmt* 発現調節の影響を受けなかった(下図)。



2 高脂肪食誘発肥満蛋白尿モデルマウスにおける尿細管障害に対する *Inmt* の関与  
 - 1 と同様に、肥満モデルにおける腹腔内アルブミン投与における *Inmt* の影響

を検討した。腹腔内アルブミン投与によって *Inmt* 発現は低下し、MCP-1 は上昇、NGAL や KIM-1 などの障害マーカーは上昇した。また、腎の組織においてフィブロネクチン(FN)、PAI-1、TGF- $\beta$  の上昇が認められた。近位尿細管 *Inmt* 欠損マウスにおいても、これらの変化はコントロールマウスと同様であり、腹腔内アルブミン投与による変化は、*Inmt* 発現調節の影響を受けなかった(下図)。



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 1 件)

第 57 回日本腎臓学会学術総会  
Indolethylamine N - methyltransferase

(Inmt) は肥満

と加齢に伴う尿蛋白誘導性尿細管障害の増悪に  
関与する 武田尚子、宇津 貴他

2014 年 7 月 4 日 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

[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:

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

宇津 貴 (Uzu Takshi)  
滋賀医科大学・医学部准教授

研究者番号:

20422884