

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461238

研究課題名(和文) 選択的エストロゲン受容体刺激薬の蛋白尿による尿細管障害抑制機構の解明

研究課題名(英文) Selective estrogen receptor modulator attenuates albumin-induced apoptosis in renal proximal tubules through inhibition of mitochondrial stress

研究代表者

藤本 壮八 (Fujimoto, Sohachi)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00319948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白尿は腎不全進行の独立した危険因子であり、慢性腎臓病の予後には性差が存在する。エストロゲンはミトコンドリア酸化ストレス軽減作用を有する。「エストロゲン受容体刺激は蛋白負荷によるミトコンドリア障害抑制を介して尿細管障害を軽減する」との仮説を立て検証した。ネフローゼ自然発症マウス(ICGN)を用いた。ICGNの卵巣を摘除し、選択的エストロゲン受容体刺激薬Raloxifene (Ral) を6週間投与した。Ral投与群ではミトコンドリア異常・酸化ストレスの改善、細胞死の抑制、尿細管間質障害の改善を認めた。エストロゲン受容体刺激は蛋白負荷による尿細管障害を軽減することが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, could attenuate albumin-induced tubular injury through reducing mitochondrial oxidative stress. ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice, a mouse strain with a hereditary nephrotic syndrome, underwent ovariectomy, and were treated with raloxifene (50 µg/kg/day) for 6 weeks. Ovariectomy induced the apoptotic cell death in renal proximal cells (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling staining) and decreased cytochrome-c oxidase activity in mitochondria. Electron microscopy of the ovariectomized ICGN mice revealed morphologically abnormal mitochondria, and these changes were suppressed following treatment with raloxifene with upregulation of the mitochondrial thioredoxin system. Stimulation of estrogen receptor attenuated programmed cell death in renal proximal tubules induced by albumin-overload as a result of amelioration of mitochondrial dysfunction.

研究分野：腎臓内科

キーワード：尿細管間質障害 エストロゲン ラロキシフェン 蛋白尿 ミトコンドリア 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全の進展には間質線維化が深く関与することが知られている。尿細管障害の原因の一つに糸球体障害からの蛋白尿漏出による影響があげられる。実際、蛋白尿が多い腎疾患患者ほど、末期腎不全に至る割合が高いことが知られている。

男性は女性と比較し慢性腎障害の進展が速いことが知られている(Baylis C. Nat Rev Nephrol 5: 384-396, 2009)。しかし、機序について詳細は明らかになっていない。一部の報告ではエストロゲン受容体の刺激が腎障害を軽減させることが示唆されている(Mankhey RW, et al, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292, R769-777, 2007)。また、慢性腎不全動物モデルにおいては、エストロゲン受容体刺激が酸化ストレス、特にミトコンドリア酸化ストレスに対して保護的に働くことが報告されている(Klinge CM, et al. J Cell Biochem 105: 1342-1351, 2008)

2. 研究の目的

これら一連の研究を背景に、「エストロゲン受容体刺激はミトコンドリアの酸化ストレスをコントロールすることで、脂肪酸結合アルブミンによって惹起された尿細管障害を軽減する」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. 蛋白尿による尿細管障害に対するエストロゲン受容体刺激の腎保護効果の検討

II. ラロキシフェンによる尿細管のミトコンドリア酸化ストレスに機能障害とインフラマゾーム活性抑制効果の検討

III. 遊離脂肪酸付加アルブミンによる尿細管細胞ミトコンドリア酸化ストレスの発症とラロキシフェンによる抑制

3. 研究の方法

蛋白尿による腎尿細管障害の動物実験モデルとして、顕著な尿細管障害を呈するネフローゼ自然発症進行性慢性腎不全モデルである、ICR-driven glomerulonephritis mice

を使用した。8週齢で卵巣摘除術を施行し、選択的エストロゲン受容体刺激薬であるラロキシフェンを6週間腹腔内投与し、無治療群と比較し、腎組織を検討した。尿細管間質障害(光学顕微鏡所見)、尿細管酸化ストレス(ヘキサノイルリジン染色)、ミトコンドリア呼吸鎖機能異常(cytochrome-c oxidase activity)、ミトコンドリア形態異常(電顕所見)を検討した。ミトコンドリア酸化能は、Superoxide dismutase 2、Thioredoxin reductase 2の活性及び、遺伝子発現で検討する。酸化能は、律速酵素であるshort-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (SCAD)、medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD)、long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (LCAD)、very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (VLCAD)の遺伝子発現で評価した。尿細管間質の炎症を、マクロファージ浸潤(F4/80免疫染色、MCP-1、CD11bの遺伝子発現)、炎症性サイトカイン産生(IL-18免疫染色、腎内IL18濃度)、インフラマゾーム活性化(NLRP3、ASC、Procaspase-1の遺伝子発現、ASC、Procaspase-1、活性型caspase-1の蛋白発現(Western Blot)、炎症性細胞死(TUNEL染色)を検討した。

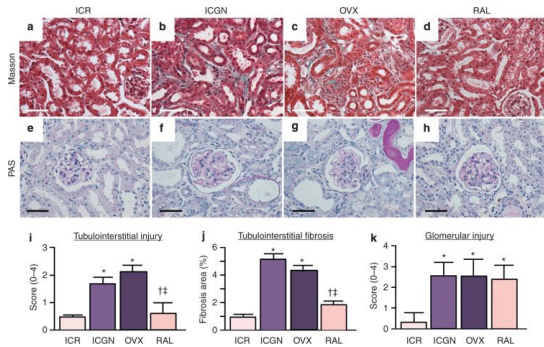
ヒト近位尿細管細胞に対して遊離脂肪酸結合ヒト血清アルブミンを負荷(20mg/ml)し、一部細胞はラロキシフェン(1.0 μ M)、エストロゲン受容体拮抗薬 ICI 182,780(1.0 μ M)の前投与を行い検討した。ミトコンドリア膜電位(JC1染色)、ミトコンドリア酸化ストレス(MitoSOX染色)、尿細管細胞での炎症(I B、NF BのWestern Blot)を評価した。

4. 研究成果

(1)ラロキシフェンはネフローゼマウスの尿細管間質障害を改善する

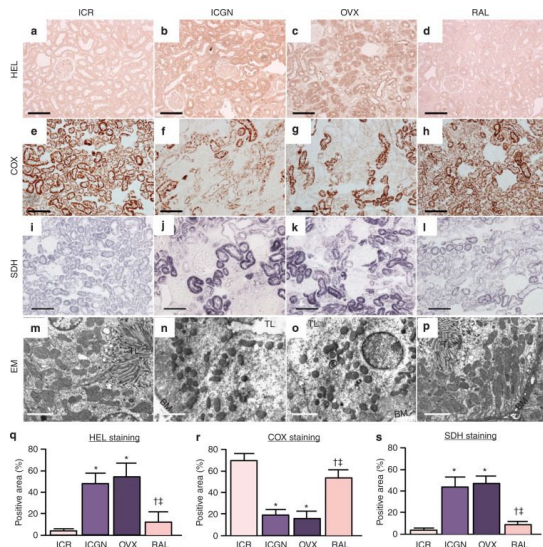
マッソントリクローム染色を用いて尿細管間質障害を評価した結果、ICGN群はICR群と比較し尿細管障害や尿細管間質線維化の

進展が認められた。卵巣を摘出した OVX 群は、ICGN 群と尿細管障害や尿細管間質線維化に差は認めなかった。しかし、ラロキシフェンを投与した RAL 群では有意にし尿細管障害や尿細管間質線維化の進展が抑制されていた。糸球体障害は ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で悪化が認められたが ICGN 群と尿細管障害や尿細管間質線維化に差は認めなかった。しかし、ラロキシフェンを投与した RAL 群でも有意な改善は認めなかった。



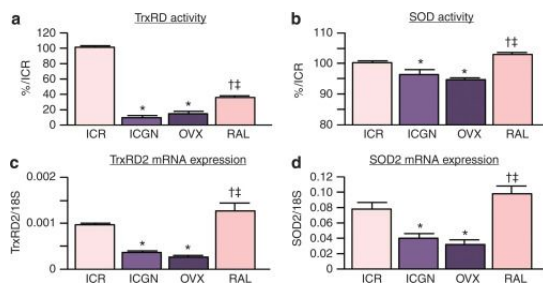
(2)ラロキシフェンはネフローゼマウスの尿細管間質への脂肪蓄積・過酸化脂質蓄積と、ミトコンドリア機能障害を改善する

脂肪酸の蓄積は hexanoyl lysine 染色で評価した。hexanoyl lysine 陽性細胞は ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で増加していたがラロキシフェン投与した RAL 群では有意に減少していた。ミトコンドリア機能は COX 染色と SDH 染色を用いて評価した。COX 染色では ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で有意に尿細管細胞の染色領域が減少していた。また、SDH 染色では ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で尿細管細胞の染色領域が増加していた。いずれも RAL 群では改善を認めた。電子顕微鏡により尿細管細胞のミトコンドリア形態を検討結果ではミトコンドリアは ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で小さく球状に変形していたが RAL 群では楕円形のミトコンドリア構造を保持していた。



(3)ラロキシフェンは、ネフローゼマウスのミトコンドリアの酸化還元力を増加させる

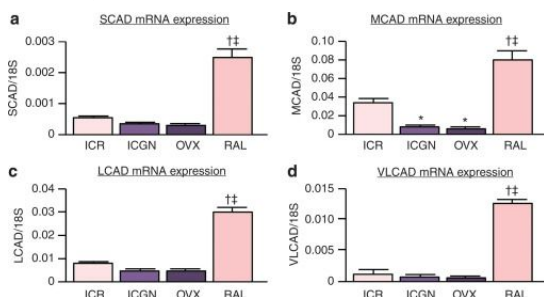
ミトコンドリアの酸化ストレスは thioredoxin (TrxRD) と superoxide dismutase (SOD) 両方の活性により制御されている。両者の活性は ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で著明に低下していたが RAL 群では有意に改善を認めた。更にミトコンドリアに局在する TrxRD2 および SOD2 の mRNA 発現レベルは ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で低下していたが RAL 群で改善を認めた。



(4)ラロキシフェンは、ネフローゼマウスのミトコンドリアの酸化関連遺伝子を増幅させる

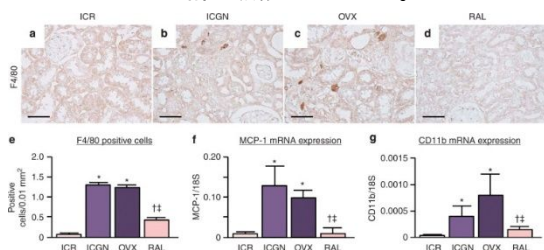
近位尿細管では遊離脂肪酸はミトコンドリアで酸化される。この酸化の律速酵素である short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (SCAD)、medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD)、long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (LCAD)、very-long-chain acyl-coenzyme A

dehydrogenase (VLCAD)の mRNA 発現を検討した。SCAD 及び LCAD、VLCAD では ICR 群、ICGN 群及び OVX 群で mRNA 発現の差は認めなかったが MCAD は ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で mRNA 発現の有意な低下を認めた。いずれもラロキシフェンを投与した RAL 群で著明な mRNA 発現の増加を認めた。



(5)ラロキシフェンは、ネフローゼマウスの尿細管へのマクロファージ浸潤を抑制する

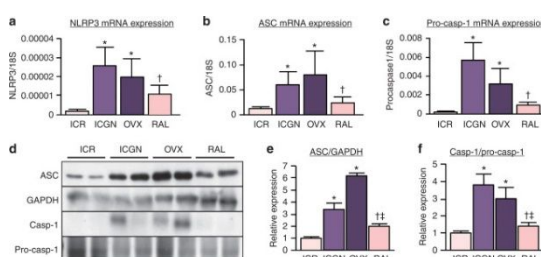
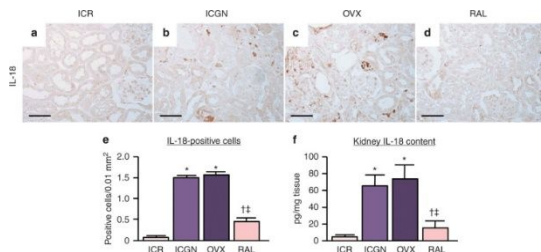
尿細管のマクロファージの浸潤を、F4/80 の免疫染色にて検出した。尿細管間質に浸潤したマクロファージは ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で有意に増加していたが RAL 群で減少していた。また、腎臓における MCP-1 や CD11b の mRNA 発現も ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で有意に増加していたが RAL 群で減少していた。



(6)ラロキシフェンは、ネフローゼマウスのインフラマゾーム活性化を抑制する

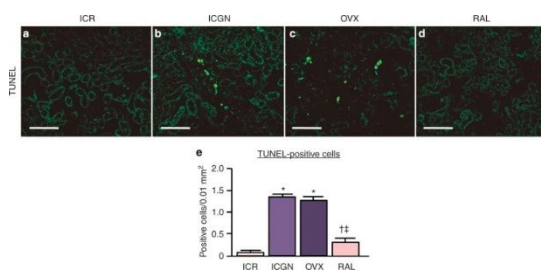
腎臓のインフラマゾームの活性化は IL-18 の免疫染色にて評価した。IL-18 陽性細胞は ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で増加したが RAL 群では増加は抑制されていた。また、腎臓のインフラマゾームの活性化を nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 (NLRP3) 及び apoptosis-associated speck-like protein

containing a caspase recruitment domain (ASC)、pro-caspase-1 (casp-1)の mRNA 発現と ASC 及び casp-1 の蛋白発現を評価した。いずれも ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で増加したが RAL 群では増加は抑制されていた。



(7)ラロキシフェンはネフローゼマウスの炎症性細胞死(pyroptosis)を抑制する。

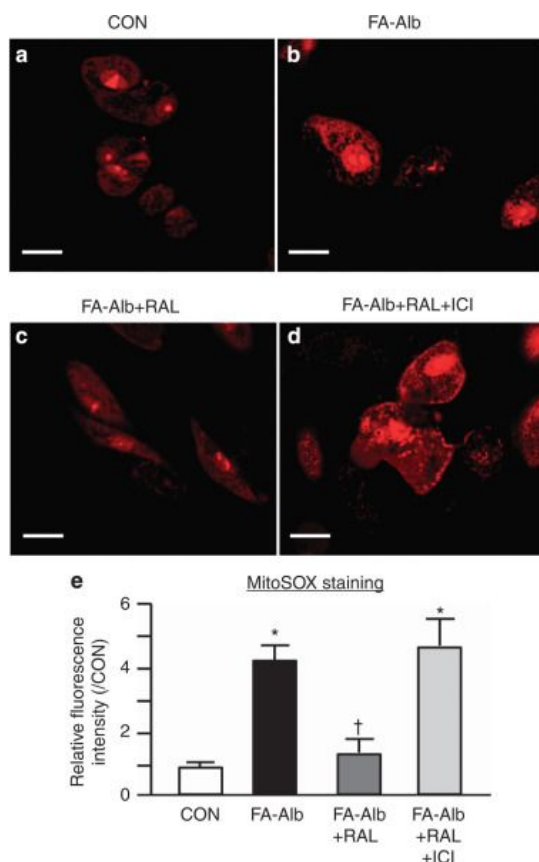
インフラマゾームの活性化は pyroptosis を誘導する。Pyroptosis 細胞を TUNNEL 染色にて評価した。ICR 群と比較し ICGN 群及び OVX 群で多くの TUNNEL 陽性細胞が検出されたが RAL 群では増加は抑制されていた。



(8)ラロキシフェンはアルブミンによる尿細管細胞内のミトコンドリア酸化ストレスを抑制する

培養ヒト近位尿細管細胞へのアルブミン刺激によるミトコンドリア活性酸素に検出に Mitosox を用い、その蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡で評価した。アルブミン刺激 (FA-Alb)により近位尿細管細胞の蛍光シグナルは増強したがラロキシフェンとのインキ

ユベーション(FA-Alb+RAL)にて減弱した。
この、減弱はエストロゲンレセプター阻害薬
である ICI 182780(FA-Alb+RAL+ICI)にて
阻害された。



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 3 件)

Namikoshi T, Fujimoto S, Komai N, Sasaki T, Kashihara N.(他 15 名), Prevalence of gastroesophageal reflux disease symptoms and effects of esomeprazole on the quality of life related to reflux and dyspepsia in patients on maintenance hemodialysis. Clin Exp Nephrol. 査読あり, 31. [Epub ahead of print]

Namikoshi T, Fujimoto S, Komai N, Sasaki T, Kashihara N.(他 3 人), Relationship between vascular function indexes, renal arteriosclerosis, and renal clinical

outcomes in chronic kidney disease. Nephrology (Carlton). 査読あり, 20(9), 2015, pp. 585-90

Satoh M, Ihoriya C, Fujimoto S, Sasaki T, Kashihara N. Angiotensin production increases in response to decreased nitric oxide in aging rat kidney. Lab Invest. 査読あり, 93(3), 2013, pp. 334-43

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
藤本 壮八 (FUJIMOTO Sohachi)
川崎医科大学・医学部, 講師
研究者番号: 00319948

(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
佐藤 稔 (SATO Minoru)
川崎医科大学・医学部, 准教授
研究者番号: 70449891

(3)連携研究者