

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860288

研究課題名(和文)5-HTと5-HT受容体を介する尿細管間質線維化の機序の解明と新規治療標的の同定

研究課題名(英文)Identification of the mechanisms and treatment of tubulointerstitial fibrosis via 5-HT - 5-HT receptor pathway

研究代表者

浜崎 敬文(Hamasaki, Yoshifumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20617774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎線維化マウスにsarpogrelate hydrochloride (SG)を投与すると、腎機能や尿細管間質線維化が改善した。SGの腎保護メカニズムとして、腎線維化を促進するPAI-1の抑制、抗血栓や血流改善、抗炎症効果があることが示唆された。遺伝子改変マウスの検討ではSGにより尿細管障害マーカーである尿中L-FABPが低減し、腎尿管保護作用が示唆された。

培養細胞(mProx細胞)での検討では、腎線維化促進刺激を細胞に与えるとPAI-1が増加したがSG投与で改善した。SGの受容体が培養細胞や腎で発現していることを確認し、SGが尿細管上皮細胞に直接作用して腎保護効果をもたらすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether a selective 5-hydroxytryptamine (5-HT) 2A receptor antagonist sarpogrelate (SG) suppresses renal fibrosis. Mice fed an adenine-containing diet developed severe tubulointerstitial fibrosis with renal dysfunction. SG treatment improved these changes significantly accompanied with increasing peritubular blood flow, decreasing fibrin deposition, and improving inflammatory cells infiltration. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) which is known to promote fibrosis was suppressed by SG treatment in the kidney. Urinary L-type fatty acid-binding protein was reduced by SG. In vitro experiments using cultured murine proximal tubular epithelial (mProx) cells revealed that incubation with TGF-1 and 5-HT increased PAI-1 expression; SG significantly reduced it. The receptor of SG was expressed both in the kidney and mProx cells. In conclusion, SG reduces renal fibrosis not only by the antithrombotic effect but also by suppressing PAI-1 in renal tubular epithelial cells.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎尿管間質線維化 5-HT受容体拮抗薬 PAI-1 近位尿細管上皮細胞 L-FABP 傍尿管血流

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は糸球体濾過量の低下・蛋白尿などの腎臓の機能障害や、腎臓の形態異常が慢性的に認められる状態である。糸球体濾過量が低下するほど、すなわち CKD が進行するほど死亡率や心血管障害が増え、腎代替療法を必要とする末期腎不全に至るリスクが高くなる<sup>1)</sup>。CKD は人口の約 10~13% が罹患しており、決して稀ではない<sup>2)3)</sup>。したがって、CKD は国民健康上ならびに医療経済上の観点から大きな問題である。

尿細管間質線維化は慢性的な腎傷害の蓄積を反映した組織学的変化であり、CKD 進行と密接に関係する<sup>4)5)</sup>。尿細管間質線維化の程度が強いほど糸球体濾過量は低下し CKD は進行する。尿細管間質線維化は腎疾患の原因によらない腎傷害の共通経路であるため、尿細管間質線維化が制御できれば、腎疾患の原因によらずあらゆる CKD の治療に有用と考えられる。

近年、肝組織線維化のメカニズムとして、5-HT 受容体を介する 5-hydroxytryptamine (5-HT) のシグナルの役割、5-HT 受容体拮抗薬による肝線維化抑制が報告されている<sup>6)</sup>。しかし、尿細管間質線維化促進に、5-HT とその受容体を介するシグナルが密接に関係しているかどうかはまだ十分に明らかではない。

plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は腎への炎症細胞浸潤を惹起し、浸潤した炎症細胞が産生する TGF- $\beta$  により尿細管間質線維化が進行する<sup>7)8)</sup>。従って、腎での PAI-1 発現抑制は CKD 治療法の開発につながる可能性がある。5-HT 受容体拮抗薬のひとつである sarpogrelate hydrochloride は脂肪細胞の PAI-1 発現を抑制する<sup>9)</sup>。一方、近位尿細管上皮細胞には 5-HT の産生系と 5-HT 受容体が存在する<sup>10)11)12)</sup>。

従って、尿細管上皮細胞に 5-HT 依存的な PAI-1 産生系が存在し、5-HT 刺激によって尿細管上皮細胞から産生された PAI-1 が尿細管間質線維化を促進している可能性が考えられる。

我々の研究グループは、マウスにアデニン含有飼料を数週間連日投与し続けることで著明な尿細管間質線維化を来すモデル動物を作製することに成功している<sup>13)</sup>。予備実験で、上記の尿細管間質線維化モデルマウスに対して 5-HT 受容体拮抗薬である sarpogrelate hydrochloride (SG) を投与することで、尿細管間質線維化ならびに腎での PAI-1 の mRNA 発現が軽減することを見出している。

## 2. 研究の目的

本研究では我々の研究グループで確立した上述の尿細管間質線維化モデルマウスを用いた in vivo 研究、および培養細胞 (尿細管上皮細胞) を用いた in vitro 研究を行い、

腎尿細管間質線維化に關与する未知のメカニズム、特に 5-HT の腎における尿細管間質線維化への寄与や、5-HT と PAI-1 の関係に着目したメカニズムを明らかにすることを目的とする。また、5-HT 受容体拮抗薬である sarpogrelate hydrochloride (SG) を用いて、SG による尿細管間質線維化抑制効果とそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

5-HT 受容体拮抗薬である SG は抗血小板薬として臨床でも使用されており、腎臓内の微小循環を改善することで間質の低酸素状態を軽減することで尿細管間質線維化に対して保護的に作用している可能性がある。そのため、尿細管間質線維化モデルマウスにおいて、腎虚血や低酸素、尿細管障害が SG によって改善するかどうかを検討するため、尿細管毛細血管血流や尿中 L-type fatty acid binding protein (L-FABP) についての検討を行う。これらの検討は、マウス尿細管上皮細胞にヒト型 L-FABP を発現させたトランスジェニック (hL-FABP Tg) マウスを用いて検討を行う。hL-FABP Tg マウスを用いた研究報告は慢性腎臓病モデルを含めて多数ある<sup>13)14)15)</sup>。

これらの検討によって、尿細管間質線維化を抑制するための未知の治療ターゲットを提唱することができ、増加し続ける CKD 患者に対する新たな治療戦略の開発に寄与できると考えられた。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

8 週齢のオス野生型 C57BL/6 マウス、および体重 25-35g の hL-FABP Tg マウス (C57/BL6 background) を用いた。これらのマウスを 0.2% アデニン含有飼料で 6 週間飼育し、尿細管間質線維化モデルマウスを作製した。アデニン含有飼料投与開始 2 週間後から 5-HT 受容体拮抗薬をこれらのモデルマウスに投与した。5-HT 受容体拮抗薬である SG は水溶液として飲料水に混ぜて投与した。体重測定、採血をアデニン含有飼料開始から 2 週毎に行った。採血では BUN 値やクレアチニン (Cre) 値を測定し腎機能の経時的変化を評価した。

### (2) 腎の組織学的評価

アデニン含有飼料開始 6 週後に採材し、腎の病理組織学的評価を行った。病理学的評価としては、尿細管間質線維化の程度の評価のため、Masson-Trichrome 染色、免疫染色 (型コラーゲンや  $\alpha$ -SMA 染色) を行った。また、PAI-1 染色による腎組織での PAI-1 発現量の評価、F4/80 染色による炎症細胞の腎への浸潤の評価を行った。また、腎組織内での血栓形成の程度を fibrin/fibrinogen 染色で評価した。

### (3) 腎微小循環と低酸素・尿細管障害の評価

5-HT 受容体拮抗薬である SG の投与による、

腎臓内の微小循環改善効果や低酸素・尿細管障害を軽減する作用を評価した。これらの評価はhL-FABP Tg マウスを用いて行った。微小循環は血流速度を CCD カメラを用いた装置により評価した。低酸素・尿細管障害の評価として尿中 L-FABP の測定を行った。尿中 L-FABP は 24 時間蓄尿検体を用いて、sandwich ELISA の手法を用いて測定し、尿中クレアチニン値で除して標準化した。

#### (4) 培養細胞

C57/BL6 マウスの近位尿細管上皮細胞株である mProx 細胞を用いた。DMEM 培地 (10%FBS、100U/ml ペニシリン G、100µg/ml ストレプトマイシン添加) を用いて 5%CO<sub>2</sub>、37 °C の条件で培養した。mProx 細胞を 12 ウェル培養プレートで 80% confluence となるまで培養後、培地を 0.5%FBS 含有 DMEM に交換し 24 時間培養した。その後 5ng/ml TGF- $\beta$  を含む FBS free DMEM 培地に交換し 24 時間培養した。さらに 10µM 5-HT および 10µM SG を含む培地に交換して 3 時間培養した。3 時間経過後に mProx 細胞を PBS で 3 回洗浄し、TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて細胞を溶解し、RNA を抽出した。mProx 細胞における PAI-1 mRNA の発現量を評価した。また、mProx 細胞における 5-HT 受容体の発現を評価した。

なお、上記の 5-HT や SG の投与量や投与時間は、過去の報告や投与量・投与時間を検討した予備実験をもとに決定した。

#### (5) 定量的 PCR

腎組織および mProx 細胞から RNA を抽出し逆転写反応で cDNA を合成し、PCR での評価に用いた。腎組織および mProx 細胞における 5-HT 受容体の mRNA 発現を RT-PCR で評価した。また、PAI-1 の発現を Real-time PCR で評価した。5-HT が腎における炎症性変化を介して尿細管間質線維化を促進する可能性もあるため、Real-time PCR による腎での MCP-1 の発現量評価を行った。また、線維化促進因子の一つである TGF- $\beta$  1 の発現も評価した。内在性コントロールとして 18s rRNA を用いた。PAI-1、MCP-1、TGF- $\beta$  1 の TaqMan プローブ・プライマーは次の通り。

PAI-1 (assay ID: Mm01310498\_m1)、  
MCP-1 (assay ID: Mm00441242\_m1)、  
TGF- $\beta$  1 (assay ID: Mm00441724\_m1)  
(Applied Biosystems)。

### 4. 研究成果

#### (1) 尿細管間質線維化に対する 5-HT 受容体拮抗薬の腎機能・腎組織像に対する効果

5-HT 受容体のうち 5-HT<sub>2A</sub> 受容体への選択性が高い SG を尿細管間質線維化モデルマウスに投与したときの 6 週目の血中 BUN、Cre の結果を図 1 に示す。SG 非投与 (Ad) 群と、SG の投与量別に 3 つの群、すなわち、3mg/

kg/日 (L) 群、30mg/kg/日 (M) 群、300mg/kg/日 (H) 群を比較した。M 群では BUN、Cre、Fibrin/fibrinogen 染色すべてで Ad 群と比較して有意な改善を認めた。以後の検討は SG 30mg/kg/日投与で行った。

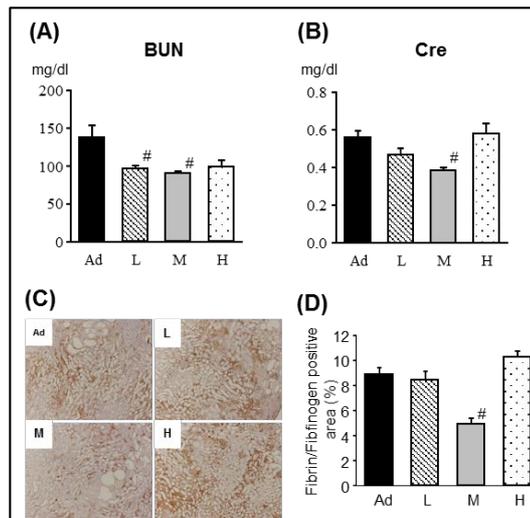


図 1 SG 投与量別の血中 BUN(A)、Cre(B)、および Fibrin/Fibrinogen 染色(C、D)結果 各群 N=11-15、#: p < 0.05 vs Ad 群

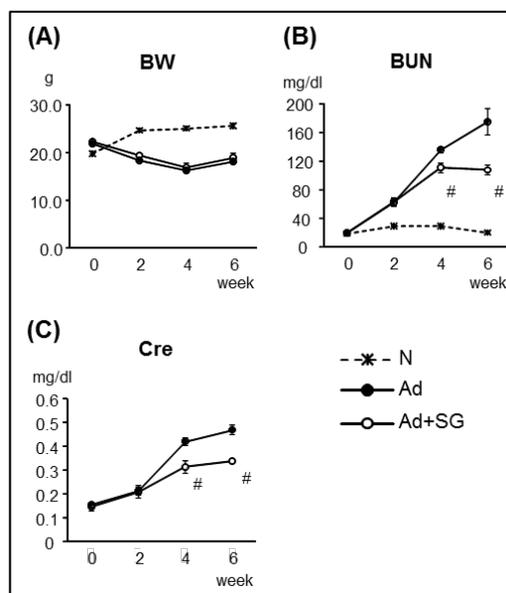


図 2 アデニン含有飼料開始後 6 週間の体重(A)、BUN(B)、Cre(C)の推移 各群 N=5-10、#: p < 0.05 vs Ad 群

アデニン含有飼料開始後 6 週間の体重 (BW)、BUN、Cre の推移を図 2 に示す。アデニン投与により、アデニン非投与の正常コントロール (N) 群と比較して体重は減少した。SG 投与は体重には影響がなかったが (図 2A)。BUN や Cre は、非治療 (Ad) 群と比較して SG 治療 (Ad+SG) 群で有意な改善を認め、SG による腎機能の改善効果が認められた (図 2B-2C)。

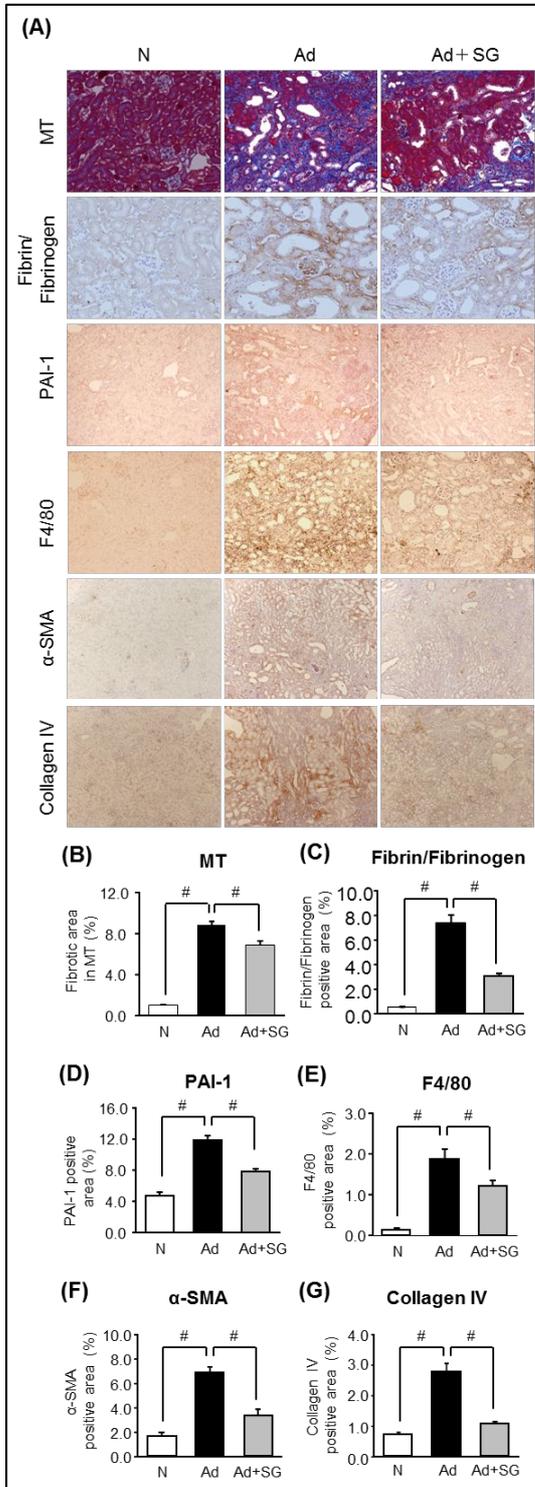


図3 6週目の腎組織所見の結果  
各群 N=5-10、#: p < 0.05

6週目の腎組織所見の結果を図3に示す。SGにより、MT染色で評価する尿細管間質線維化は有意に軽減し、SGによる尿細管間質線維化抑制効果が認められた(図3A-B)。同様に、Fibrin/Fibrinogenの沈着はSGで有意に改善し、SGの抗血栓作用が示唆された(図3A、3C)。腎組織中のPAI-1はSGにより有意に抑制された(図3A、3D)。また、F4/80、α-SMA、型コラーゲンのいずれもSGで有意な改善を認め、SGの抗炎症作用、抗線維化作用が示唆された(図3A、3E-3G)。

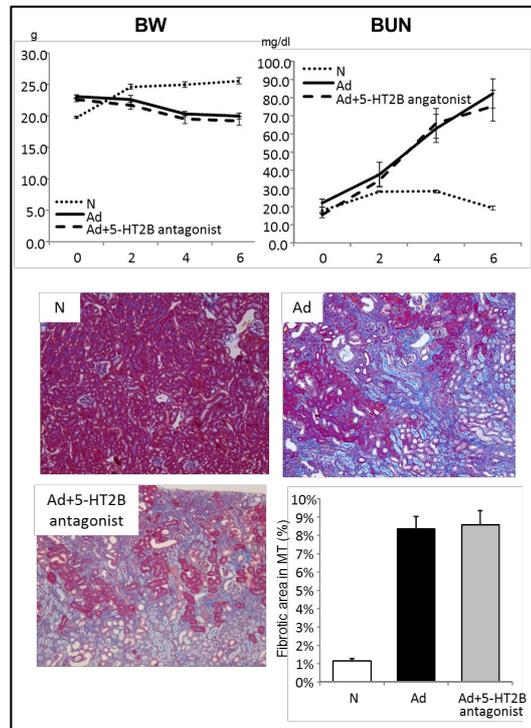


図4 5-HT2B受容体拮抗薬の腎質線維化への効果  
各群 N=5

5-HT2A受容体拮抗薬(SG)以外に、5-HT2B受容体拮抗薬をアデニン飼育マウスに同様に投与したところ、明らかなBUN改善や線維化の改善は認めなかった(図4)。

## (2)腎におけるPAI-1、MCP-1、TGF-β1 mRNA発現に対するSGの効果

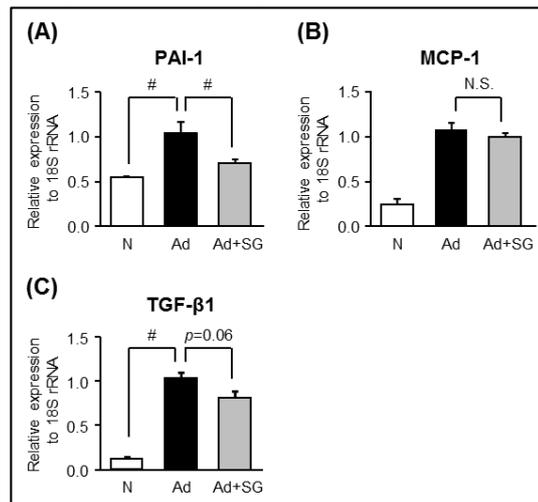


図5 定量的PCRによる腎組織中のPAI-1、MCP-1、TGF-β1の発現  
各群 N=5-10、#: p < 0.05

定量的PCRによる腎でのPAI-1(図5A)、MCP-1(図5B)、TGF-β1(図5C)のmRNA発現を、6週目に採取した腎組織を用いて評価した。SG投与によって、腎組織中のPAI-1は有意に抑制されたが、MCP-1、TGF-β1は有意な

減少を認めなかった。

### (3)腎微小循環と尿中 L-FABP に対する SG の効果

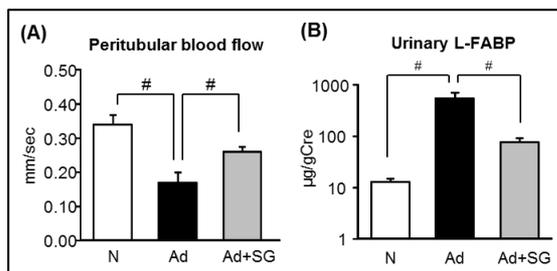


図 6 生体内での腎尿管周囲毛細血管血流 (A)と尿中 L-FABP(B) 各群 N=5、#: p <0.05

hL-FABP Tg マウスを用いて、アデニン含有飼料開始 4 週目の時点での尿管周囲毛細血管の血流速度を評価したところ、アデニン含有飼料による飼育で血流速度は低下したが、SG 投与によりそれは軽減した (図 6A)。

図 6B に 4 週目時点での尿中 L-FABP の結果を示す。今回の検討では、アデニン含有飼料の飼育で尿中 L-FABP は有意に増加し SG 投与によって軽減した。

尿中 L-FABP は尿管障害を反映する鋭敏なバイオマーカーであることが知られている。また、腎組織低酸素は尿中 L-FABP を増加させるという報告がある。したがって、SG によって、腎微小循環血流の改善に伴い、腎組織低酸素が軽減され、その結果尿管障害が軽減し、尿中 L-FABP が減少した可能性がある。SG 投与で尿中 L-FABP が低下し、図 3 のように腎線維化を改善したことは、尿中 L-FABP の程度と腎線維化の程度が相関するとする過去の報告<sup>13)</sup>と矛盾しない。

### (4)mProx 細胞における PAI-1 発現の評価

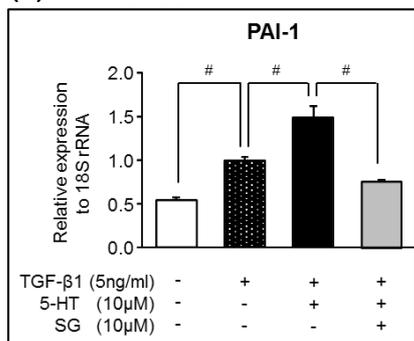


図 7 mProx 細胞における PAI-1 mRNA の発現 各群 N=8-12、#: p <0.05

図 7 に mProx 細胞を用いて行った invitro の実験結果を示す。TGF- 1 の刺激で mProx 細胞での PAI-1 mRNA の発現は有意に増加したが、続けて 5-HT で刺激すると PAI-1 の発現量はさらに上昇した。SG によって PAI-1 の発現は有意に低下した。5-HT が尿管上皮細胞に作用して PAI-1 産生を促すことや、SG が

直接尿管上皮細胞に作用し PAI-1 産生を抑制する可能性が示唆された。

### (5)腎および mProx 細胞における 5-HT 受容体の発現の評価

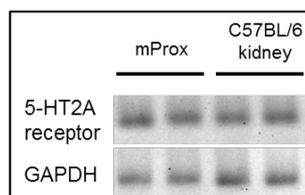


図 8 マウス腎臓と mProx 細胞における 5-HT2A 受容体の発現

5-HT2A 受容体 mRNA の発現をマウス腎臓および mProx 細胞で評価した (図 8)。SG は 5-HT2A 受容体に選択的に結合して作用するため、SG による腎保護効果や mProx 細胞での PAI-1 抑制効果は 5-HT2A 受容体を介していると考えられた。

以上の結果から、5-HT 受容体のうち 5-HT2A 受容体に対する拮抗薬である SG が尿管間質線維化を軽減することが示された。また、そのメカニズムは複数あると考えられるが、その中のひとつに SG による尿管上皮細胞からの PAI-1 産生を抑制する作用があると考えられた。5-HT の刺激によって尿管上皮細胞からの PAI-1 産生が促進される経路を治療ターゲットとすることで、新たな慢性腎臓病治療のストラテジーを構築できる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- 1) Go AS et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004 Sep 23;351(13):1296-305.
- 2) Coresh J et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA.* 2007 Nov 7;298(17):2038-47.
- 3) Imai E et al. Prevalence of chronic kidney disease in the Japanese general population. *Clin Exp Nephrol.* 2009 Dec;13(6):621-30.
- 4) Risdon RA et al. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet.* 1968 Aug 17;2(7564):363-6.
- 5) Mackensen-Haen S et al. Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin Nephrol.* 1981 Apr;15(4):167-71.
- 6) Ebrahimkhani MR et al. Stimulating healthy tissue regeneration by

- targeting the 5-HT<sub>2B</sub> receptor in chronic liver disease. *Nat Med.* 2011 Nov 27;17(12):1668-73.
- 7) Eddy AA et al. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17: 2999-3012, 2006
- 8) Oda T et al. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 60: 587-596, 2001
- 9) Uchida-Kitajima S et al. 5-Hydroxytryptamine 2A receptor signaling cascade modulates adiponectin and plasminogen activator inhibitor 1 expression in adipose tissue. *FEBS Lett.* 2008 Sep 3;582(20):3037-44.
- 10) Soares-da-Silva P et al. Antagonistic actions of renal dopamine and 5-hydroxytryptamine: increase in Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in renal proximal tubules via activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br J Pharmacol.* 1996 Mar;117(6):1199-203.
- 11) Berndt TJ et al. Intrarenal serotonin, dopamine, and phosphate handling in remnant kidneys. *Kidney Int.* 2001 Feb;59(2):625-30.
- 12) Xu J et al. Characterization of a putative intrarenal serotonergic system. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Nov;293(5):F1468-75.
- 13) Tanaka T et al. Urinary L-type fatty acid-binding protein can reflect renal tubulointerstitial injury. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1203-11.
- 14) Kamiyo A et al. Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am J Pathol.* 2004 Oct;165(4):1243-55.
- 15) Yamamoto T et al. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Nov;18(11):2894-902.

#### 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)

Hamasaki Y, Doi K, Maeda-Mamiya R, Ogasawara E, Katagiri D, Tanaka T, Yamamoto T, Sugaya T, Nangaku M, Noiri E. A 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, sarpogrelate, reduces renal tubulointerstitial fibrosis by suppressing PAI-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 Dec 15;305(12):F1796-803.

doi:10.1152/ajprenal.00151.2013.

〔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：  
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  
浜崎 敬文 (HAMASAKI, Yoshifumi)  
東京大学医学部附属病院 助教  
研究者番号：20617774

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
野入 英世 (NOIRI, Eisei)  
土井 研人 (DOI, Kent)  
小笠原絵美 (OGASAWARA, Emi)