

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461227

研究課題名(和文) 25-hydroxyvitamin Dが腎線維化に与える直接的影響の検討

研究課題名(英文) Direct effects of 25-hydroxyvitamin D on renal fibrosis

研究代表者

松井 功 (Matsui, Isao)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60456986

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)：Vitamin Dの生理・薬理作用は、肝臓で25位、腎臓で1位が水酸化された1,25(OH)2Dがvitamin D受容体(VDR)に結合することで発揮され、25-hydroxyvitamin D [25(OH)D]は1,25(OH)2Dの前駆体に過ぎないと一般的に考えられている。しかしながら、多くの疫学研究において腎予後と関連するのは血清25(OH)D濃度であり血清1,25(OH)2D濃度ではない。我々は本研究において、片側尿管結紮による腎尿細管間質線維化モデルを用いて、25(OH)Dが1,25(OH)2Dに変換されることなくVDRを介して薬理的作用を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Effects of 25(OH)D3 on unilateral ureteral obstruction were analyzed. Excess 25(OH)D3 in obstructed mice worsened oxidative stress and tubulointerstitial fibrosis, whereas moderate levels of 25(OH)D3 had no effects. The exacerbating effects of excess 25(OH)D3 were abolished in CYP27B1/VDR double-knockout mice and in macrophage-depleted CYP27B1 knockout mice. Excess 25(OH)D3 upregulated both M1 marker (TNF- $\alpha$ ) and M2 marker (TGF- $\beta$ 1) levels of kidney-infiltrating macrophages. In vitro analyses verified that excess 25(OH)D3 directly upregulated TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in cultured macrophages but not in tubular cells. TNF- $\alpha$  and 25(OH)D3 cooperatively induced oxidative stress by upregulating iNOS in tubular cells. Aggravated tubulointerstitial fibrosis in mice with excess 25(OH)D3 indicated that macrophage-derived TGF- $\beta$ 1 also had a key role in the pathogenesis of surplus 25(OH)D3. Thus, excess 25(OH)D3 worsens tubulointerstitial injury by modulating macrophage phenotype.

研究分野：腎臓

キーワード：25(OH)D 腎尿細管間質線維化 ビタミンD

## 1. 研究開始当初の背景

Vitamin D (VD)は骨ミネラル代謝のみならず、RAS系、TGF beta 1系、NF kappa B系などの制御を介して、腎線維化をはじめとする様々な病態の発症・進展に関与する分子である。1987年にVD受容体(VDR)がクローニングされ、「肝臓で25位、腎臓で1位の水酸化反応を受け活性化されたVD [1,25(OH)<sub>2</sub>D]がVDRに結合し、標的遺伝子の転写調節領域に存在するVD responsive element (VDRE)に作用することで、VDの機能が発揮される」という古典的VD作用メカニズムが確立された。この古典的VD作用メカニズムの確立に伴い、「25(OH)Dは1,25(OH)<sub>2</sub>Dの前駆体であり、25(OH)D自体がVDRを介して生物学的作用を発揮することはない」という考えが定着した。しかしながら、近年報告されている疫学データの多くは「25(OH)D自体に何等かの生理・薬理作用がある」可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

腎尿細管間質線維化モデル動物を用いて、25(OH)Dが1,25(OH)<sub>2</sub>Dの前駆体としてだけではなく、それ自体が生理・薬理作用を発揮することを証明し、VDおよびそのアナログ製剤の腎疾患治療応用に向けた学術的背景を確立する。

## 3. 研究の方法

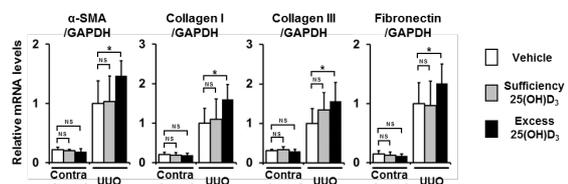
25(OH)Dの直接的作用を検討するには、25(OH)Dの作用を1,25(OH)<sub>2</sub>Dの作用から分離して評価する必要がある。このため、本研究では25(OH)Dが1,25(OH)<sub>2</sub>Dに変換されない25(OH)D-1-hydroxylase (CYP27B1)ノックアウトマウスを用いて、血清25(OH)欠乏状態、充足状態、過剰状態が腎線維化に与える影響を評価した。またCYP27B1/VDRダブルノックアウトマウスを用いて25(OH)Dの直接的作用がVDRを介するか否かを検討するとともに、クロドネートリポソームを用いてマクロファージ消失マウスを作成し、25(OH)Dの直接的作用がマクロファージを介したものであるか否かを検討した。またCYP27B1ノックアウトマウスより単離した近位尿細管培養細胞およびマクロファージ培養系を用いて、25(OH)Dの直接的作用を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 高用量の25(OH)Dは片側尿管結紮モデルマウスにおける腎尿細管間質線維化病変を悪化させた。

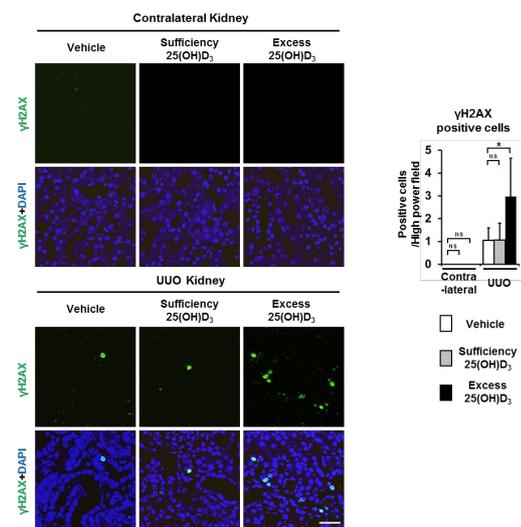
7週齢CYP27B1ノックアウトマウスを

25(OH)D欠乏群、充足群、過剰群の3群に分け、25(OH)D充足状態が片側尿管結紮モデルマウスの腎尿細管間質線維化に与える影響を評価した。なお、25(OH)D欠乏、充足、過剰群の血清25(OH)D濃度はそれぞれ、7.87 ± 0.23 ng/mL、38.41 ± 5.65 ng/mL、333.28 ± 46.91 ng/mLであった。腎における線維化関連遺伝子(α-SMA、コラーゲンI、コラーゲンIII、フィブロネクチン)の発現量をリアルタイムPCRで検討したところ、25(OH)D欠乏群と充足群間には有意差を認めなかったが、25(OH)D欠乏群と比較すると25(OH)D過剰群においてこれらの遺伝子発現が上昇していた。組織学的にも同様の結果が得られ、tubular injury index、interstitial volume index、SMA陽性領域、コラーゲンI陽性領域は、いずれも25(OH)D過剰群において上昇していた。



- (2) 過剰の25(OH)Dは腎臓における酸化ストレスを増加させた。

種々の腎疾患において酸化ストレスが上昇することが知られている。このため、上述のマウスの酸化ストレスをH2AX染色およびニトロチロシンのwestern blotにて評価した。その結果、(1)の結果と同様、腎酸化ストレスは25(OH)D欠乏群と充足群で差を認めず、過剰群で増悪して



いた。

- (3) 25(OH)Dの腎障害作用は24,25(OH)<sub>2</sub>Dを介さない。

25(OH)D は体内において 24,25(OH)2D に代謝される。このため代謝産物である 24,25(OH)2D に腎尿細管間質線維化増悪作用があるか否かを(1)と同様の方法にて検討した。その結果、24,25(OH)2D には腎尿細管間質線維化増悪作用がないことが明らかになった。また 24,25(OH)2D は腎の酸化ストレスを悪化させないことも明らかになった。これらのことから、(1)の結果は 25(OH)D による直接作用である事が示された。

- (4) 25(OH)D の腎尿細管間質線維化増悪作用は VDR を介した作用である。

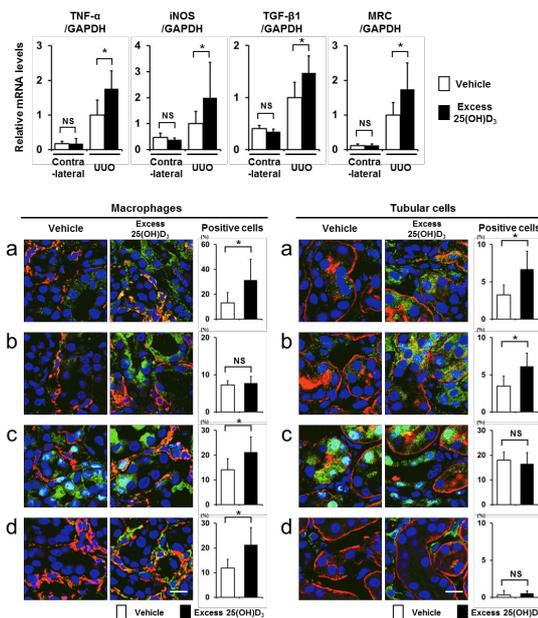
25(OH)D が何を介して腎尿細管間質線維化増悪作用を發揮するのか明らかにするため、CYP27B1/VDR ダブルノックアウトマウスを作成し、(1)と同様の検討を行った。その結果、25(OH)D の腎尿細管間質線維化増悪作用・酸化ストレス増悪作用は CYP27B1/VDR ダブルノックアウトマウスにおいて消失することが明らかになった。以上のことから、(1)の結果は VDR を介した 25(OH)D の作用によるものである事が明らかになった。

- (5) 25(OH)D による腎尿細管間質線維化増悪はマクロファージの数ではなく質の変化を介した作用である。

腎において VDR を発現している主な細胞は近位尿細管細胞および腎浸潤マクロファージである。(1)で観察された 25(OH)D の作用が腎浸潤マクロファージによるものか否かを明らかにするため、クロドロネートリポソームを用いてマクロファージを枯渇させた CYP27B1 ノックアウトマウスを用いて(1)と同様の検討を行った。その結果、マクロファージ枯渇 CYP27B1 ノックアウトマウスでは 25(OH)D による腎尿細管間質線維化増悪作用が消失することが明らかになった。これらの事から(4)の結果も踏まえ、過剰の 25(OH)D は腎浸潤マクロファージの VDR を介して腎尿細管間質線維化増悪作用を發揮することが示唆された。

F4/80 染色にて腎浸潤マクロファージ数を評価したところ、25(OH)D 欠乏群・過剰群間で浸潤マクロファージ数に差を認めないことが明らかになった。腎臓から得た RNA を用いてマクロファージの形質に関わる遺伝子群の発現を検討したところ、25(OH)D は M1 マクロファージ(TNF- $\alpha$ 、iNOS)および M2 マクロファージ(TGF- $\beta$ 1、MRC)いずれの遺伝子発現も上昇させることが明らかになった。なお、リアルタイム PCR は腎臓全体から回収した RNA を用いて行ったため、上述の変化がマクロファージではなく尿細管などの変化に

よって生じた可能性があった。このため、免疫組織染色にて、腎浸潤マクロファージにどのような変化が生じているのかさらに検討した。その結果、過剰の 25(OH)D は尿管結紮腎浸潤マクロファージの TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、MRC の発現を上昇させたが iNOS の発現は変化させなかった。一方 25(OH)D は尿管結紮腎の近位尿細管細胞において iNOS、TNF- $\alpha$  の発現を上昇させたが、TGF- $\beta$ 1、MRC の発現は変化させなかった。以上の事から、前述のリアルタイム PCR の結果のうち iNOS の上昇はマクロファージではなく近位尿細管由来の変化であったことが示された。

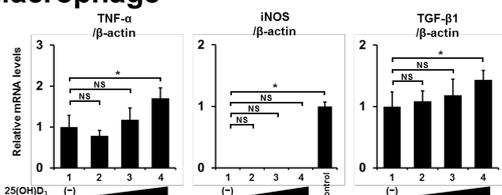


- (6) 25(OH)D はマクロファージ培養系における TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 の発現を上昇させ、TNF- $\alpha$  存在下近位尿細管細胞培養系における iNOS の発現を上昇させる。

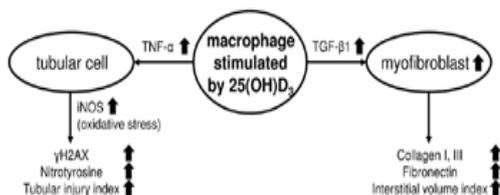
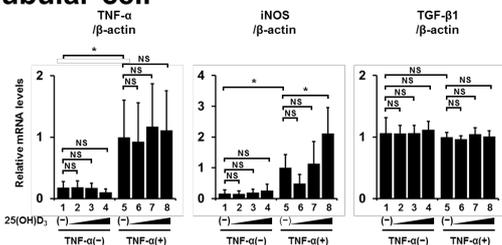
動物実験において認められた腎マクロファージや近位尿細管細胞における遺伝子発現の変化が 25(OH)D の直接作用であるか否かを検討するため、CYP27B1 ノックアウトマウスよりマクロファージおよび近位尿細管細胞の培養系を確立した。マクロファージ培養系に 25(OH)D を負荷したところ、濃度依存性に TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$ 1 の発現が上昇したが、iNOS の発現は上昇せず、動物実験で認められたマクロファージの変化は 25(OH)D の直接作用である事が明らかになった。一方、近位尿細管細胞培養系に 25(OH)D を単独で負荷しても TNF- $\alpha$ 、iNOS、TGF- $\beta$ 1 の発現は変化しなかった。動物実験では近位尿細管細胞における iNOS の発現が 25(OH)D により上昇していたため、25(OH)D 刺激によりマクロファージより産生される TNF- $\alpha$  の存在下に 25(OH)D が近位尿細管細胞にどのような変化を生じ

させるのか検討した。その結果、TNF- $\alpha$ 刺激により近位尿管細胞の iNOS 発現は上昇し、TNF- $\alpha$  存在下に 25(OH)D 刺激すると更なる iNOS 発現上昇が認められた。なお、培養近位尿管細胞を TNF- $\alpha$  刺激すると TNF- $\alpha$  自体の発現が上昇したが、25(OH)D は TNF- $\alpha$  の発現に影響を与えなかった。以上の事から、動物実験において認められた腎近位尿管細胞における TNF- $\alpha$  の発現上昇はマクロファージの TNF- $\alpha$  に依存し 25(OH)D には依存しないこと、近位尿管細胞における iNOS の発現はマクロファージの TNF- $\alpha$  と 25(OH)D の両者に依存し、これらは相加的に作用することが明らかになった。

### Macrophage



### Tubular cell



### 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)

Kusunoki Y, Matsui I, Hamano T, Shimomura A, Mori D, Yonemoto S, Takabatake Y, Tsubakihara Y, St-Arnaud R, Isaka Y, Takugi H. Excess 25-hydroxyvitamin D3 exacerbates tubulointerstitial injury in mice by modulating macrophage phenotype. *Kidney international* 2015;88(5):1013-29. doi: 10.1038/ki.2015.210. 査読有

[学会発表](計 7 件)

Yasuo Kusunoki, Isao Matsui, et al. Excess of 25-hydroxy vitamin D exacerbates tubulointerstitial fibrosis in mice. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2014 年 11 月, Philadelphia

楠 康生、松井 功 他、過剰の 25-hydroxyvitamin D は片側尿管結紮マウスの腎線維化を悪化させる。第 57 回日本腎臓学会学術総会、2014 年 7 月、横浜  
楠 康生、松井 功 他、高用量の 25-hydroxyvitamin D は片側尿管結紮マウスの腎線維化病変を悪化させる。第 33 回腎と骨代謝研究会、2014 年 10 月、東京

楠 康生、松井 功 他、過剰の 25-hydroxyvitamin D はマクロファージの表現型を変化させることで尿管間質障害を悪化させる。第 58 回日本腎臓学会学術総会、2015 年 6 月、名古屋

松井 功、25-hydroxy vitamin D が腎線維化に与える影響の検討。第 8 回慢性腎臓病(CKD)病態研究会、2015 年 7 月、東京

楠 康生、松井 功 他、過剰の 25(OH)D は腎尿管間質線維化を悪化させる。27<sup>th</sup> Bone Research Joint Meeting、2015 年 11 月、大阪

松井 功、ビタミン D の多面的作用。第 19 回東海 ROD 研究会、2016 年 8 月、島根

[図書](計 2 件)

松井 功、猪阪 善隆、東京医学社、腎と透析、2016 年、4 頁

松井 功、メディカルレビュー社、THE BONE、2016 年、4 頁

[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

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/kid/research/research26176830.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

松井 功 (MATSUI, Isao)

大阪大学・医学(系)研究科・助教

研究者番号：60456986

### (2)研究分担者

猪阪 善隆 (ISAKA, Yoshitaka)

大阪大学・医学(系)研究科・教授

研究者番号：00379166

濱野 高行 (HAMANO, Takayuki)

大阪大学・医学(系)研究科・寄附講座准教授

研究者番号：50403077

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

該当なし