

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26860645  
研究課題名(和文) 非糖尿病・肥満関連腎症における病態生理の解明 - 虚血による尿細管間質障害の分析  
  
研究課題名(英文) Involvement of ischemic condition in the pathophysiology of renal damages in obesity-induced kidney injury  
  
研究代表者  
二木 功治 (Futatsugi, Koji)  
  
慶應義塾大学・医学部・助教  
  
研究者番号：50570933  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満関連腎症(ORG)における近位尿細管(PT)の病理学的変化の及ぼす病態的意義を脈管に注目し検討した。酸素濃度を認識する分子Prolyl hydroxylase domain(PHD)2は、低酸素誘導性転写因子を負に調節する。尿細管特異的にPHD2のノックアウトを行うことで、PTCの密度改善、尿細管障害の改善を認めたことを確認した。肥満に関連する腎障害の病態には、PTCを介した尿細管虚血が関与していると考察した。ORGの病態に近位尿細管虚血の関与が示唆され、PHD2の発現調節はORGの治療戦略になりうる。

研究成果の概要(英文)：Backgrounds: We have reported hypertrophic proximal tubules in obese mice which implies an inefficient oxygen supply in this area (Obesity Int, 2012). We examined whether hypoxic condition in proximal tubules are involved the pathogenesis of obesity-induced renal injury. We also test the hypothesis that this injury can be ameliorated by molecular intervention of prolyl hydroxylase domains (PHDs), sensors for tissue oxygen levels that is a crucial molecule for tissue response to hypoxia.

Conclusions: Hypoxic condition due to enlarged cell with vascular rarefaction is evident in the proximal tubular area of obese mice whereas tissue reaction to hypoxic damages failed to properly compensate. The early reduction of PHD2 specifically in the proximal area may constitute a novel strategy against the progression process from an early stage of obesity-induced kidney injury.

研究分野：慢性腎障害

キーワード：肥満関連腎症 慢性腎障害 腎虚血 peritubular capillary PHD2 肥満

## 1. 研究開始当初の背景

平成 23 年国民健康・栄養調査報告によると BMI 25kg/m<sup>2</sup> 以上の成人人口の割合は 25% であり、これは経年で増加傾向にある。肥満自体の抑制ならびにそれに伴う合併症や生活習慣病の発生の抑制を目指す対策は、臨床医学の側面のみならず医療経済学的観点からも急がれるものである。基礎研究において、各種 Chronic kidney disease (CKD) モデルに対するレニン・アンジオテンシン系の抑制、抗炎症・線維化抑制薬が有効だとされ、実臨床においても、CKD の進行阻止手段として減塩、低蛋白食、降圧療法、血糖管理などの治療が行われている。しかし、糖尿病性腎症の進行・新規透析導入は未だ減少していない。糖尿病発症前の非糖尿病・肥満の段階での CKD の新たな治療戦略が必須である。

元来肥満と腎障害との関連性は議論をされている。肥満により腎障害が進行する病態は肥満関連腎症として認識されている。肥満における心拍出量や循環血液量の増加が糸球体高血圧や糸球体肥大を導き、glomerular hyperfiltration を生じる。また、肥満に合併する高血圧、高脂血症、耐糖能異常などが増悪因子となり、更にインスリンやレプチンなどの代謝性因子が関与していることが考えられ、メタボリックシンドローム関連腎症という概念が提唱されている。

前述の機序以外に我々の研究室では、これまで肥満関連腎症の病態生理に関して検討を行ってきた。Rho/Rho キナーゼ経路の活性化がインスリン抵抗性を引き起こし (FASEB J 20, 2000)、高血圧性腎症の発症進展に関与することを証明した (Kidney Int 61, 2002)。そして Rho キナーゼ阻害薬はインスリン抵抗性を改善し、高血圧性腎硬化症を改善することを報告した。肥満関連腎症モデルにおいて、糸球体肥大、メサンギウム細胞増殖、腎間質における炎症細胞浸潤、脂肪組織重量の増大、拡大した脂肪細胞周囲における炎症細胞の浸潤を観察し、それら組織学的障害を引き起こす重要な因子として、組織アルドステロン/MR 受容体/Rho/Rho キナーゼ pathway があることを証明した (Int J. Obesity, 2012)。

上記のように、肥満関連腎症に対する知見は我々の研究室を主導として明らかとされつつあるが、特に腎尿細管間質に注目した腎障害の機序は明らかにされていない。

本研究では肥満関連腎症下の近位尿細管における虚血の存在に注目し、腎障害進行の機序を解明する。腎臓における低酸素状態は様々な機序により生じる。低酸素状態が持続することによる腎間質の組織障害は、酸素供給をさらに障害し、酸化ストレスや貧血等がこれに拍車をかけ、組織障害がさらに進行する悪循環が生じる。よって、腎臓内低酸素に対する治療戦略は有効性が期待される。(J Am Soc Nephrol 17, 2006)

酸素濃度を認識する分子 Prolyl

hydroxylase domain (PHD)2 は、低酸素誘導性転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF) を負に調節する。HIF1 は、HIF-1 とヘテロ二量体を形成し、低酸素応答領域に結合し、VEGF, EPO, GULT, PDK1 など様々な遺伝子の制御を行って低酸素応答状態を整える。虚血 stress が加わると、PHD は down regulation され、これにより HIF- は低酸素環境で発現して、転写を活性し低酸素応答状態を引き起こす。

肥満関連腎症モデルマウスでは、通常食摂取マウスに比して、体重ならびに腎重量は増加した。また、尿中アルブミンが増加するのみでなく、尿中の尿細管間質障害マーカーである N-acetyl-  $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) ならびに Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) が増加した。肥満関連腎症においては、糸球体障害のみならず、尿細管障害を生じたことを示唆する。また、組織学的検討においては、通常に比して糸球体のみならず尿細管が肥大し空胞化を引き起こした。肥大した糸球体、尿細管細胞に脂肪沈着を認め、尿細管間質に線維化が起こり、線維化マーカー活性も上昇した。さらに、近位尿細管の虚血の評価を行った。一般に尿細管周囲毛細血管 (peri tubular capillary: PTC) は尿細管周囲へ酸素供給を行う。PTC の喪失ならびに間質線維化等が虚血を進行させる (J Am Soc Nephrol 17, 2006)。肥満関連腎症モデルマウスの腎組織間質を、血管内皮細胞のマーカーである CD34 で染色し、CD34 陽性細胞を PTC の密度を測定した。すると、肥満関連腎症モデルマウスの腎では、PTC の密度が低下した。以上より肥満関連腎症の病態において、尿細管細胞肥大、PTC 減少、尿細管障害が生じ、相対的虚血の関与を示唆する結果を得た (第 56 回日本腎臓学会)。非糖尿病・肥満関連腎症という早期段階においても、近位尿細管における相対的虚血が組織障害進行の病態生理において重要である。

我々の研究室では近位尿細管特異的に Cre recombinase が発現する NDRG Cre マウスを所有している (京都大学柳田素子教授より供与)。一方、PHD2 の exon2 と exon3 を含む部分を LoxP site で挟んだマウス Flox PHD2 を慶應義塾大学医化学教室南嶋講師より供与された (Blood. 111, 2008)。我々はこれらのマウスを交配し、近位尿細管特異的 PDH2 ノックアウトマウスを作成した。このマウスは近位尿細管での PHD2 の発現低下を起こし、HIF の発現を局所的に惹起させる。また、この Cre マウスは Tamoxifen 誘導型であり、任意の時期に PHD2 の発現低下を誘導可能である。結果、低酸素応答状態への尿細管における組織変化ならびに近位尿細管障害の抑制を期待し、機序を解明しうる。

## 2. 研究の目的

肥満関連腎症の病態生理の一つとして、慢性虚血の重要性を明らかにし、糖尿病性腎症・末期腎不全への進行を抑制するための早期治療戦略を構築する。肥満関連腎症における尿細管障害など組織学的変化、虚血の評価、近位尿細管での PHD2・HIF1 の動態、尿細管マーカー、炎症性ケモカインの動態などを経時的に観察する。続いて、近位尿細管特異的 PHD2 ノックアウトマウスを用い、tamoxifen 誘導による近位尿細管 PHD2 欠損状態におき、高脂肪食下の表現型を解析する。

以上の結果から肥満関連腎症における虚血を介した尿細管障害の発生機序を明らかにし、慢性腎臓病進展抑制を目的とした治療薬の開発など、PHD2 を治療ターゲットとした早期治療介入・治療戦略の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

肥満関連腎症における病態を模す方法として、高脂肪飼料（60kcal%ラード含有飽和脂肪酸）をマウスに摂取させるものがある。通常脂肪食を摂取させたマウスと表現型を比較して、肥満関連腎症の病態を把握することができる。申請者は肥満関連腎症モデルマウスを用いて、各種解析を行っている。ここまでの研究で肥満関連腎症の病態において、尿細管障害が生じ虚血の関与を示唆する結果を得た。HIF, PHD2 の動態の検討をここに追加することで、虚血関与の機序をより具体的に解明する。

組織内低酸素状態、つまり虚血の評価方法として、Pimonidazole での免疫染色による組織学的な低酸素の局在評価や、BOLD MRI によるマウス腎虚血の画像的評価など、多角的な虚血の評価（Invest Rad 45, 2010）を実施する。

Flox PHD2 mouse と NDRG-Cre マウスとを交配させた近位尿細管特異的 PHD2 ノックアウトマウスを用いて野生型マウスとの表現型を比較する。

近位尿細管特異的 PHD2 ノックアウトマウスは、tamoxifen 投与により、その時点から近位尿細管特異的に PHD2 を欠損させ HIF1 を誘導させることができる。これを利用して、近位尿細管で PHD2 欠損をさせた時点で高脂肪食摂取を開始させ、肥満関連腎症における尿細管間質虚血の病態を模し、表現型の変化を確認する。

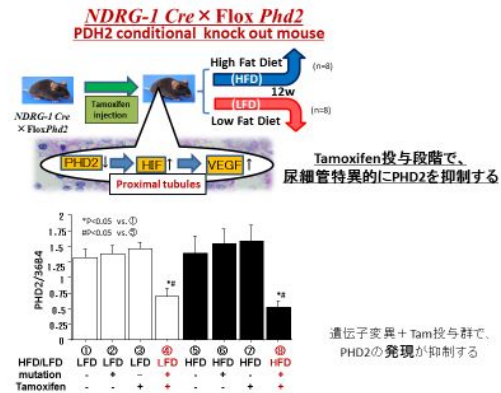
近位尿細管特異的 PHD2 ノックアウトマウスにおいて、経時的に尿中の尿細管障害マーカー（NAG）を測定したところ、高脂肪食摂取下のストレスにおいても、ノックアウトマウスでは著明にマーカー値が低下した。ノックアウトマウスにおいて、尿細管障害が改善されたことを支持する結果であり、表現型のさらなる解析が重要であると考えられる。

具体的な計画としては、以下のものがある。  
・体重、血圧、腎障害の程度、腎臓組織とし

ては、糸球体および尿細管細胞面積を測定することで、組織学的に障害の程度を評価する。  
・組織学的に免疫染色による PHD2 HIF の局の評価、同時に HIF の下流遺伝子である VEGF, EPO, GULT, PDK1 などの mRNA 発現を確認する。  
・Pimonidazole での免疫染色で虚血の画像的評価を行う。

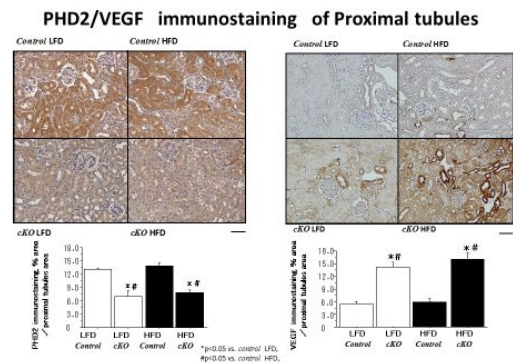
## 4. 研究成果

PHD2 抑制状態にした段階から 12 週間高脂肪食を負荷し、各種検討を行った。第一に、PHD2 が抑制されているという前提の条件を確認した。高脂肪食負荷の有無、変異の有無、タモキシフェンの投与の有無でそれぞれ計 8 群に分けて、Realtime PCR で腎臓での PHD2 の発現を比較しました。変異を有し、さらには tamoxifen を投与した群（コンディショナルノックアウト群）において、腎尿細管で PHD2 が有意に抑制された（図 1）。



(図 1)

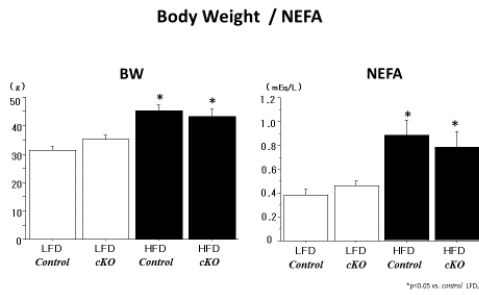
免疫染色を行い、コントロール群と比して、コンディショナルノックアウト群は、PHD2 については抑制、それに対応して VEGF については発現の亢進を確認した（図 2）。



近位尿細管での PHD2 の発現抑制 / VEGF の発現促進を確認

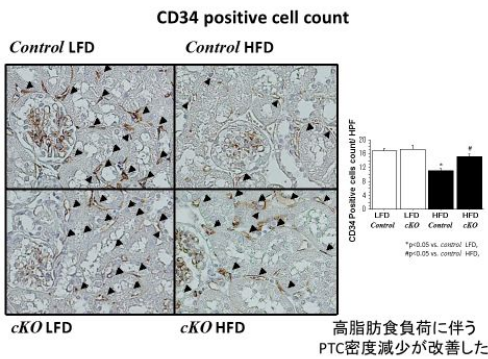
(図 2)

コンディショナルノックアウト群は体重・脂質代謝に影響していないことを確認した（図 3）。



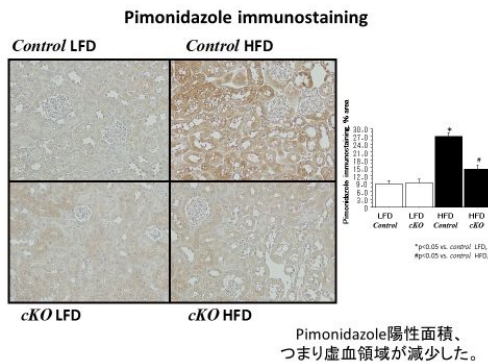
(図3)

CD34は血管内皮細胞のマーカーであり、これで染色し視野ごとにCD34陽性細胞をカウント、これをPTCの密度として測定した。高脂肪食摂取マウスの腎では、視野面積あたりの陽性細胞の数が有意に低下しており、PTCの密度が低下した。そのうえで、近位尿細管でPHD2を抑制したコンディショナルノックアウト群では、PTC陽性細胞数が増加した。高脂肪食負荷に伴うPTCの密度減少が、PHD2抑制により改善した(図4)。



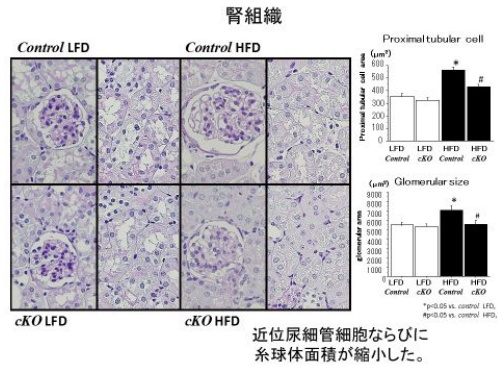
(図4)

高脂肪食摂取マウスにおいて、pimonidazole陽性面積が増加しており、組織学的にも虚血の存在が示された。さらに、コンディショナルノックアウトマウスに対する高脂肪食負荷群は、コントロール高脂肪食群に比して、Pimonidazole陽性面積が有意に減少した。これは組織における虚血が改善していることを示した(図5)。



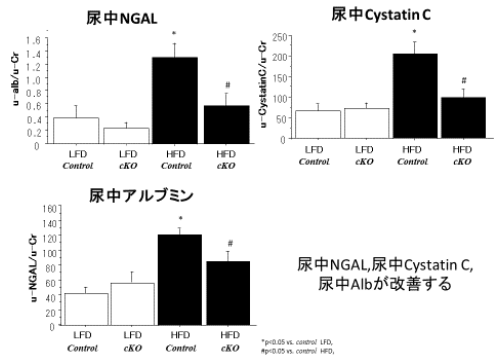
(図5)

糸球体肥大・尿細管肥大の面積測定による評価を行った。高脂肪食摂取マウスにおける近位尿細管細胞ならびに糸球体面積について、コンディショナルノックアウト群で面積の縮小を認めた(図6)。



(図6)

尿中マーカーを比較すると、コンディショナルノックアウト群について、高脂肪食摂取により増悪したNGALの尿細管障害が改善したことを示した。尿中アルブミン、尿シスタチンCについても同様に検討したところ、コンディショナルノックアウト群では、高脂肪食負荷による影響が改善した(図7)。



(図7)

以上より、尿細管特異的にPHD2のノックアウトを行うことで、peri tubular capillaryの密度改善、尿細管障害の改善を認めたことを確認した。肥満に関連する腎障害の病態には、peritubular capillaryを介した尿細管虚血が関与していると考察した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

二木 功治, 徳山 博文, 内藤 真規子, 林 晃一, 脇野 修, 伊藤 裕、非糖尿病・肥満関連腎症の病態生理 - 相対的虚血による尿細管間質障害、第19回日本心血管内分泌代謝学会総会、2015年12月11日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Koji Futatsugi, Hirobumi Tokuyama, Makiko Naitoh, Shu Wakino, Hiroshi Itoh、Involvement of ischemic condition in the pathophysiology of renal damages in obesity-induced kidney injury、ASN kidney week 2015、2015年11月7日、San Diego(United State of America)

二木 功治, 徳山 博文, 内藤 真規子, 林 晃一, 脇野 修, 伊藤 裕、非糖尿病・肥満関連腎症の病態生理 - 尿細管虚血とPHD2の発現異常、第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

二木 功治, 徳山 博文, 内藤 真規子, 林 晃一, 脇野 修, 伊藤 裕、非糖尿病・肥満関連腎症の病態生理 - 相対的虚血による尿細管間質障害、第52回日本臨床分子医学会学術集会、2015年4月10日、みやこめっせ(京都府京都市)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

二木 功治(FUTATSUGI, Koji)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 50570933

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし