

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06038

研究課題名(和文)慢性腎臓病、自己免疫疾患における(プロ)レニン受容体の臨床的意義の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the function of (pro)renin receptor in chronic kidney disease and autoimmune disease

研究代表者

鳴海 かほり (Narumi, Kaori)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40754130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎生検でIgA腎症と診断された患者において血清中プロレニン受容体[s(P)RR]と、腎組織のさまざまな指標や生化学データとの相関関係について解析した。血清s(P)RR値は糸球体メサンギウム増殖の程度や血清インドキシル硫酸(IS)と有意に相関した。そこでISは(P)RRを介しメサンギウム領域の増殖や線維化に關与すると仮定し基礎的検討を行った。使用したマウスメサンギウム細胞に(P)RRは発現。IS刺激で線維化因子の発現が増強したが(P)RR発現をノックダウンした細胞においてはその発現増強を認めなかった。さらにIS刺激後のTIMP1やMMP9の発現の増強がERK1/2経路を介することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We collected sera from patients diagnosed with immunoglobulin A nephropathy by renal biopsy and examined the correlation between serum soluble (P)RR [s(P)RR] and various laboratory data and pathological indices. The s(P)RR level significantly correlated with the level of mesangial expansion and serum indoxyl sulfate (IS). To investigate the association between (P)RR and mesangial fibrosis or expansion, we used mouse mesangial cell line SV40 MES13. (P)RR expression significantly increased in the presence of IS. IS stimulation enhanced the expression of the fibrotic factors, this increased expression was significantly suppressed by knockdown of (P)RR. Moreover, it significantly increased the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase type 1 and matrix metalloproteinase 9 via the ERK1/2 pathway in SV40 MES13 cells. Our results suggest that in the presence of IS, (P)RR is associated with mesangial fibrosis and matrix expansion through the (P)RR-mediated ERK1/2 pathway.

研究分野：医学

キーワード：プロレニンレセプター メサンギウム細胞 インドキシル硫酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病患者では炎症反応が慢性的に活性化している。そして、慢性腎臓病の進行・抑制するための新たな戦略として、この炎症反応を抑制すること有効であると報告されている (Pharmacol Res. 2014;81:91-102, Nat Rev Nephrol. 2014;10:257-267)。また、腎生検で得られた腎組織、特に活動性腎炎の組織像において、リンパ球やマクロファージといった免疫担当細胞は半月体を形成した糸球体周囲や間質へ浸潤している。この細胞浸潤の程度は腎炎の病勢や重症度を反映すると考えられており、リンパ球やマクロファージは腎障害の進行に重要な存在である。しかし、腎炎発症・進行におけるこれら免疫担当細胞の活性化メカニズムは現在も完全には解明されていない。

(2) RAS は血圧調節を担う主要なホルモン系であるとともに、その過剰な活性化は様々な疾患の病因となっている。実際、炎症反応においてアンジオテンシン II は炎症促進作用を持つ酸化ストレスや炎症性サイトカイン、接着因子を産生するのに重要であり (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1257-1266)、さまざまな腎疾患モデルにおいて RAS の阻害が有効であることが報告されている (Kidney Int. 1995;48:1778-1791, Am J Pathol. 2001;158:1743-1756)。

(P)RR は 2002 年にフランスの Nguyen 博士らにより同定された RAS の新規構成因子である (J Clin Invest. 2002;109:1417-1427)。(P)RR は、レニン前駆体(プロレニン)及びレニンと結合することでレニン活性を発現し、アンジオテンシン I を産生する、(プロ)レニン/(P)RR 系による細胞内伝達系を活性化させる、という 2 つの異なる機序により組織障害に関与している。

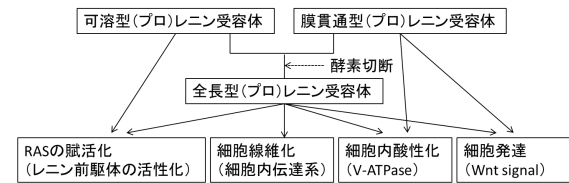
(P)RR の新たな機能として、

- ・全長型(P)RR から酵素切断的に可溶型(P)RR と膜貫通型(P)RR が産生され、血中・尿中に可溶型(P)RR が存在する (Hypertension. 2009;53:1077-1082)

- ・膜貫通型(P)RR が液胞系の多彩なオルガネラの内部の酸性化に関与している H⁺ポンプ (V-ATPase) に付随し、その集合体形成に必須のタンパク質である (Circ Res. 2010;107:30-34)

- ・Wnt シグナル系を介し組織の発生・再生に関与する (Science. 2010;327:459-463) ことが Nguyen 博士や他のグループより報告され、(P)RR 研究は新たな局面を迎えている。つまり、(P)RR には全長型、可溶型、膜貫通型の 3 種の形態が存在し、これらの発現量が細胞種、環境、病態等によって変化することにより、1 つの分子でありながら複数の機能 (RAS の調節、細胞線維化、細胞内酸性化、発達調節) を発揮・相互干渉させ、生命維持や組織障害に複雑に関与している可能性が示

唆される(図 1)。このような(P)RR の複雑な機能を解明するには、それぞれの組織、病態において、動物実験や細胞培養系を用いた基礎的検討から、ヒト検体を用いた臨床的検討まで幅広く行い、それぞれの結果に基づき総合的な視点から研究を進展させていく必要がある。



(図 1)

(3) 申請者らはこれまでに、健常者の血液から分離した末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて、リンパ球や単球といった免疫担当細胞に (P)RR が発現することを PCR、Flowcytometry、Western blot、免疫組織染色により明らかにしてきた。加えて、(P)RR が免疫担当細胞において、(プロ)レニン/(P)RR 系による ERK1/2 経路の活性化やそれに伴うサイトカイン分泌、COX-2 発現増強といった機能を有していることを明らかにした (第 86 回日本内分泌学会学術総会、Am J Physiol-Renal Physiol 2015; 308:F487-499)。

2. 研究の目的

上記背景、並びにこれまでの申請者らの研究成果を踏まえ、本研究では研究期間内に以下の事項を明らかにする。そして、慢性腎臓病および自己免疫疾患患者における (P)RR の病態生理学的役割を解明する。

(1) 海外研究協力者の Nguyen 博士らが確立した (P)RR floxed マウスから PBMC を単離し、TAT-Cre を感染させ (P)RR ノックアウト PBMC を作製する。発現ベクターを用いてこの細胞に (P)RR の 3 形態 (全長型、可溶型、膜貫通型) のいずれかのみを導入し、細胞の表現型の観察やマイクロアレイを用いた遺伝子発現の変化の検討により、それぞれの形態の機能を解明する。

(2) 慢性腎臓病もしくは自己免疫疾患の患者および健常者から採血を行い、血漿と PBMC を分離する。患者由来 PBMC および健常者由来 PBMC における (P)RR 発現を qPCR、Flowcytometry、Western blot により比較検討する。加えて、血漿中の可溶型 (P)RR を ELISA kit により測定し、腎機能や腎炎重症度との関連解析を行い、可溶型 (P)RR が腎炎の早期診断や重症度のマーカーとなるか検討する。また、腎生検を行った対象においては、その腎生検検体を抗 (P)RR 抗体、免疫担当細胞の識別抗体等で染色し、浸潤する免疫担当細胞における (P)RR 発現を検討する。腎生検の結果、膜性腎症の診断に至った症例においては、悪性腫瘍の有無による同様の項目を比較検討する。

3. 研究の方法

(1) (P)RR ノックアウト細胞を用いた全長型、可溶型、膜貫通型 (P)RR の機能解析

海外研究協力者の Nguyen 博士が作製した (P)RR flox マウス (J Am Soc Nephrol. 22:2193-2202; 2010) から PBMC [(P)RR^{flox/y} PBMC] を単離し、TAT-cre を感染させ (P)RR ノックアウト PBMC [(P)RR^{-y} PBMC] を作製する。発現ベクターを用いてこの細胞に (P)RR の 3 形態 (全長型、可溶型、膜貫通型) を導入し、それぞれの (P)RR を単一に発現する PBMC を作製する。 (P)RR ノックアウト PBMC の作製が不可能であった場合、C57BL/6 マウスの PBMC に対して CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムによりゲノム編集を行うことでそれぞれの (P)RR を単一に発現する PBMC を作製する。

(2) 腎炎、自己免疫疾患患者検体を用いた検討

PBMC を用いた検討

申請者らは (P)RR が健常者の免疫担当細胞に発現すること、(P)RR が免疫担当細胞において (プロ)レニン/(P)RR 系による ERK1/2 経路の活性化やその経路活性化によるサイトカイン分泌能を有していることを既に明らかにしている (Am J Physiol-Renal Physiol 2015;308:F487-499)。本年度は腎炎疑いにて腎生検が施行された患者の PBMC を用いる。患者由来 PBMC および健常者由来 PBMC における (P)RR 発現を qPCR、Flowcytometry、Western blot により比較検討する。

ELISA による可溶型 (P)RR 測定

血漿中の可溶型 (P)RR を ELISA kit (IBL 社製) により測定する。本年度は、対象として東北大学病院・腎高血圧内分泌科にて収集され、臨床検査値や腎炎の重症度等の研究データのデータベース化が既に完了している検体を用いる。この内、健常者、微小変化群並びに腎生検施行患者の血漿中可溶型 (P)RR 濃度を測定する。そして、可溶型 (P)RR が腎炎の早期診断や重症度、腎機能のマーカーとなるか検討するため、まず腎機能や腎炎重症度との関連を横断的に解析する。

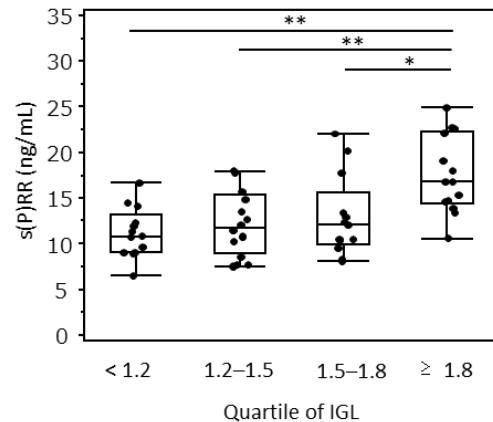
4. 研究成果

(1) 当初予定していた海外協力者の Nguyen 博士らが確立した (P)RR floxed マウスはこちらに到着せず、本期間に予定していた実験は遂行できなかった。

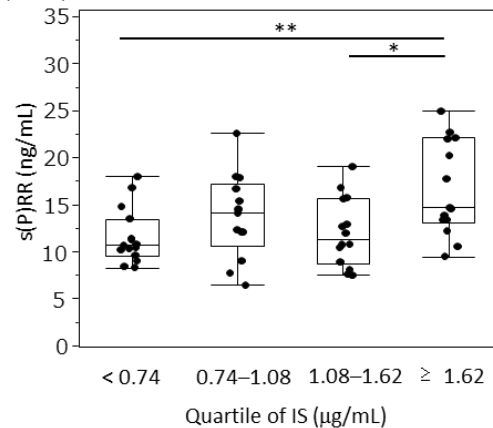
(2) 当院で腎生検を施行した患者約 100 名、および、当院で血液透析を導入した患者約 60 名の血清中 s(P)RR を測定した。腎生検を施行した患者における血清 s(P)RR 値と腎生検により得た腎組織のさまざまな病理学的指標や生化学データとの相関関係について重回帰分析を行った。IgA 腎症と診断された患者およそ 60 名において、その血清 s(P)RR 値は糸球体のメサンギウム増殖の程度・硬化度 (図 1) や血清インドキシル硫酸 (IS) (図

2) と有意な相関関係を認めた。さらにメサンギウム増殖の程度・硬化度は血清 IS と有意に相関していた (図 3)。

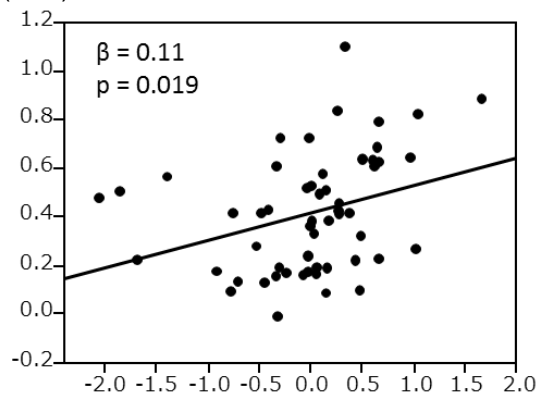
(図 1)



(図 2)



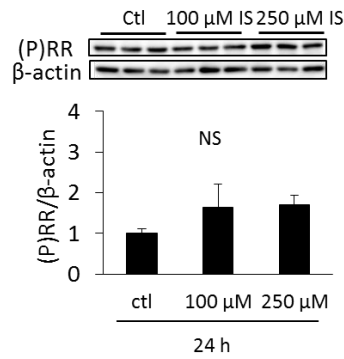
(図 3)



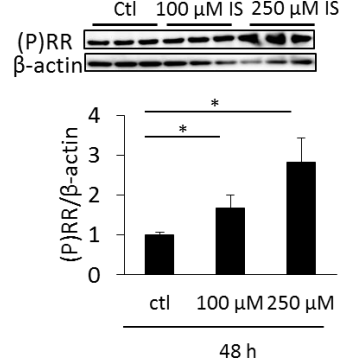
そこで尿毒症物質の1つである IS は (P)RR を介してメサンギウム細胞と増殖や線維化などに関与する、と仮定し基礎的検討を開始した。

始めに使用するマウスのメサンギウム細胞に (P)RR が発現していることを確認した。さらに IS の容量依存的にメサンギウム細胞の (P)RR 発現が増強することを western blot で確認した (図 4-1, 4-2)。

(図 4-1)

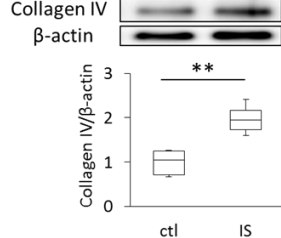


(図 4-2)

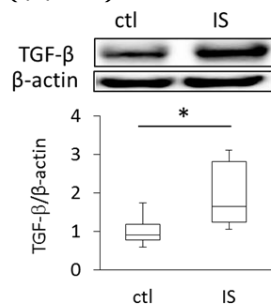


続いて、IS 刺激による Ⅳ型コラーゲン、TGF-β、フィブロネクチンといった線維化因子の発現について検討したところ、いずれの発現も増強していた(図 5-1, 5-2, 5-3)。

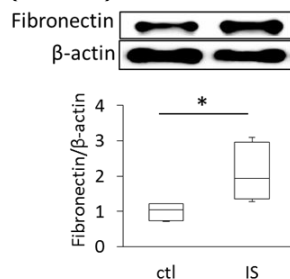
(図 5-1)



(図 5-2)



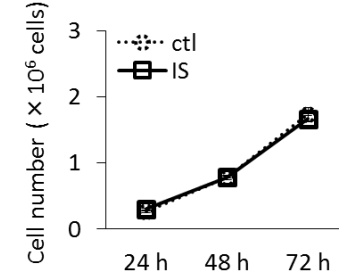
(図 5-3)



さらに(P)RR siRNA により(P)RR 発現を knock down した細胞においては、いずれも発現増強を認めなかった。以上より線維化因子の発現には(P)RR が関与することが示唆された。

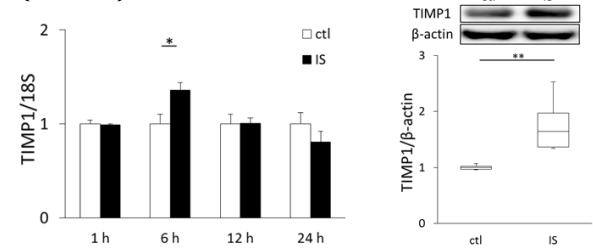
一方で、メサンギウム領域はメサンギウム細胞と細胞外基質で構成されている。まず細胞増殖への IS 刺激の影響を検討したが、コントロール群と比べ IS 刺激群において細胞数に変化を認めなかった(図 6)。

(図 6)

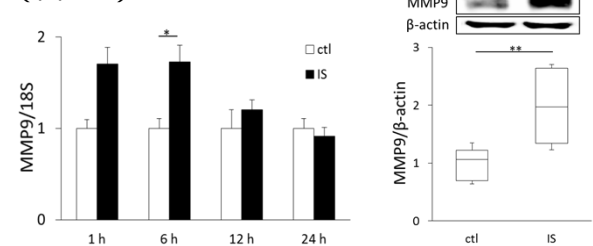


次に細胞外基質への影響を検討するため、TIMP1 および MMP9 の発現を検討した。細胞外基質はコラーゲンの代謝を調節する蛋白、つまり MMP や TIMP の発現により調節されている(FASEB J 1991; 5: 2145-2154)。これらのバランスが崩れることが基質の増加につながる主な原因と考えられている。そこで我々は主にメサンギウム細胞で産生される Ⅳ型コラーゲンを切断する MMP2、MMP9 と、MMP を強力に阻害する TIMP1、TIMP2 に注目した。IS 刺激後の TIMP2、MMP2 の発現に変化は認められなかったが、TIMP1 および MMP9 の発現の増強が qPCR と western blot で確認された(図 7-1、7-2)。

(図 7-1)



(図 7-2)

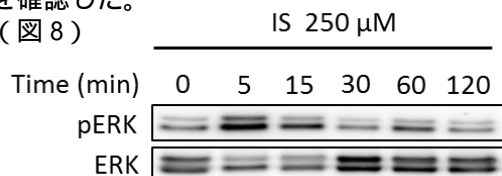


さらに(P)RR siRNA 導入後の細胞においては、いずれの発現増強も認めなかったことから、これらの発現においても(P)RR が関与することが示唆された。

細胞外基質の増加においては、ERK1/2 経路の活性化が関与すると報告されており(Eur J Pharmacol 2009; 606: 155-161, Sci Rep

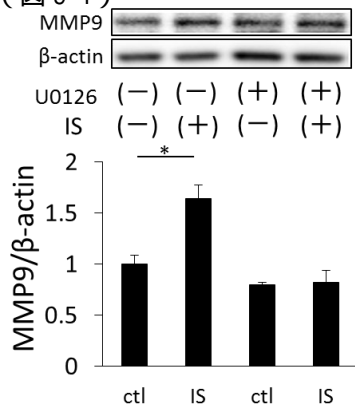
2016; 6: 26854)、まず ERK1/2 経路の活性化を確認した。

(図 8)

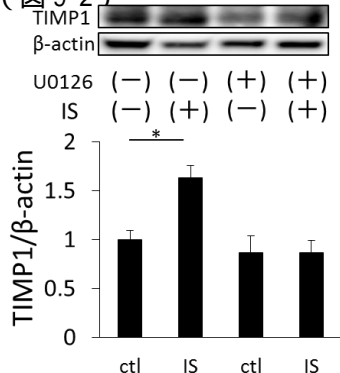


IS 刺激 5 分後に ERK のリン酸化が確認された (図 8)。続いて、ERK 阻害剤である U0126 を用いて、阻害剤の有無による IS 刺激後の MMP9、TIMP1 の発現について western blot で検討した。(図 9-1、9-2)

(図 9-1)



(図 9-2)



MMP9、TIMP1 のいずれも U0126 の存在下では発現増強が認められず、その発現には ERK1/2 経路が関与していることが示唆された。

以上の結果から、s(P)RR は臨床的にメサンギウム領域の拡大の指標となる可能性がある。さらに(P)RR は IS 刺激によるメサンギウム細胞の線維化やメサンギウム基質の拡大に関与することが示された。

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)

[学会発表](計 4 件)

Kaori Narumi

Serum (pro)renin receptor is associated with the index of glomerular lesion in mesangioproliferative glomerulonephritis. American society of nephrology, kidney week, 2016 年 11 月 17 日、McCormick Place, Chicago, USA

鳴海かほり、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者において血清中可溶性(プロ)レニンレセプターは糸球体硬化度と関連する、日本腎臓学会総会、2016 年 6 月 18 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Kaori Narumi

The serum soluble (pro)renin receptor in mesangioproliferative glomerulonephritis is associated with the index of glomerular lesion. (ポスター)

Gordon research seminar, 2016 年 2 月 20-21 日、Lucca (Barga), Italia

Kaori Narumi

The serum soluble (pro)renin receptor in mesangioproliferative glomerulonephritis is associated with the index of glomerular lesion. (ポスター)

Gordon research conference, 2016 年 2 月 21-26 日、Lucca (Barga), Italia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴海 かほり (Narumi, Kaori)

東北大学-大学病院・助教

研究者番号: 40754130

(2) 研究協力者

佐藤 恵美子 (Sato, Emiko)

東北大学・薬学系研究科・助教

研究者番号: 20466543