

令和元年6月4日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09629

研究課題名(和文) ビタミンD受容体による腎系球体足細胞保護効果の分子機序の解明と新規治療基盤の確立

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanism of podocyte protection effect with the vitamin D receptor and establishment of the new treatment base

研究代表者

澤田 佳一郎 (SAWADA, Kaichiro)

東海大学・医学部・客員講師

研究者番号：10420952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症におけるビタミンDとその受容体の作用による足細胞保護作用を分子レベルで明らかにするために、糖尿病モデルマウスと培養足細胞を用いた解析を行った。糖尿病モデルマウスに活性型ビタミンDを週3回投与して飼育すると、投与したビタミンDの濃度依存的に生存率が上昇し、尿中のアルブミン/クレアチニン比も改善された。培養足細胞に糖尿病ストレス関連因子としてTGF- β 1を添加すると形態、接着能、移動能に変化が見られたが、これらはビタミンDの同時投与により抑制された。このときの遺伝子発現変化は受容体、細胞周期、シグナル伝達分子などに及んでおり、ビタミンDの足細胞保護効果に関与していると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の慢性透析患者数は32万人に迫り、我が国の医療財政において深刻な問題となっている。透析導入原疾患として糖尿病性腎症は最多であるが、全国で1330万人と推計される慢性腎臓病患者においても、糖尿病・高血圧を基礎とする高齢かつ全身血管病変を有するハイリスク患者が多く、糖尿病性腎症の進行を阻止する方法を開発することは活力ある高齢化社会を構築する上で重要な課題である。近年、複数の臨床試験においてビタミンD製剤服用患者の生命予後改善が報告されているが、その分子的機序は解明されていない。本研究はビタミンDによる腎臓足細胞の保護作用の重要性を明らかにし、将来的な新規治療基盤の確立に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of podocyte protection effects with the vitamin D receptor in diabetic nephropathy, analyses were performed with diabetes model mouse and culture of the podocyte line cell (HSMP). When active vitamin D was injected into diabetes model mice three times a week, the survival rate rose and urinary albumin / creatinine ratio was improved depending on the dose of vitamin D. When added TGF beta 1 in a culture of HSMP as a factor related to diabetes stress, changes were seen in a form, adhesion ability, movement ability of cells. However, co-administrated vitamin D restrained these changes. As changes of the gene expression of this time were found in receptors, cell cycle factors, and factors of signal transduction, it was supposed these changes were participated the in podocyte protection effect with vitamin D.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ビタミンD 糖尿病性腎症 足細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性透析患者数は32万人に迫り、我が国の医療財政において深刻な問題である。1998年以降、透析導入原疾患として糖尿病性腎症が最多(2013年末:43.8%)であるが、全国で1330万人と推計される慢性腎臓病患者においても、糖尿病・高血圧を基礎とする高齢かつ全身血管病変を有するハイリスク患者が多く、糖尿病性腎症の進行を阻止する方法を開発することは活力ある高齢化社会を構築する上で重要な課題である。

糖尿病性腎症は典型的には微量アルブミン尿～顕性アルブミン尿を呈し、その進行から末期に至るまで足細胞傷害が関与すると考えられている。ただし、その分子機序については、多くのグループで精力的に研究が行われてきたが、未だ不明な点が多い。一方、複数の大規模臨床試験により、糖尿病性腎症においてレニン・アンジオテンシン系阻害薬による蛋白尿の制御と長期予後に関連があることが示されている(de Zeeuw D, et al. *Kidney Int* 2004, Imai E, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2013)。すなわち、同薬により制御できない蛋白尿を呈する患者は予後不良であり、このような蛋白尿に対する治療法を開発することの意義を示唆しており、糸球体濾過障壁としての足細胞の役割がより重要視されている。また、足細胞傷害は糸球体硬化を惹起することも基礎的検討により示されており、この機序の解明が重要な課題と位置づけられている。この点に関連して、研究分担者のグループでは最近、足細胞特異的 SIRT1 欠失マウスを用いて、抗糸球体基底膜腎炎モデルにおいて細胞骨格関連分子である cortactin のアセチル化状態と足細胞骨格傷害の関係を明らかにして報告した(Motonishi S, et al. *J Am Soc Nephrol* 2015)。以上より、(1)糸球体硬化を防止するための足細胞保護 (2)蛋白尿を抑制するための足細胞骨格保持の2点が糖尿病性腎症進行を防止するために重要なポイントであると考えられる。

近年、複数の臨床試験において様々な条件でビタミンD製剤服用患者の生命予後が改善していることが報告されている。また、ランダム化二重盲検比較試験によってstage3-4の糖尿病性腎症患者に対してparicalcitolとRAS阻害薬の併用によるアルブミン尿減少効果が報告されている(de Zeeuw D, et al. *Lancet* 2010)。これらの効果には骨ミネラル代謝に対する作用と独立した機序が関与している可能性も示唆されており、例えば自然免疫や獲得免疫の調節(Liu PT et al. *Science* 2006)やレニン・アンジオテンシン系の負の調節(Liu CY, et al. *J Clin Invest* 2002)などが報告されている。シカゴ大学のグループは足細胞特異的にヒトビタミンD受容体を発現させたDBA/2Jマウスや足細胞特異的にビタミンD受容体発現を回復したビタミンD受容体欠失マウスに糖尿病を誘導することにより、ビタミンD-ビタミンD受容体の経路によるアルブミン尿軽減効果や足細胞傷害軽減効果を示した(Wang Y, et al. *J Am Soc Nephrol* 2012)。この論文においては足細胞保護効果の分子機序としてp38, ERKのMAPK経路の阻害効果が報告されているが、その内容はまだ明らかではない。

研究分担者の深川は長年にわたり慢性腎臓病や糖尿病における骨ミネラル代謝異常を中心に腎不全の病態解明に関する研究を続けており、基礎的検討と臨床的検討の両面で大きな成果を挙げ、新しい診断法や治療法の開発に貢献してきている。研究分担者の和田は約13年にわたり足細胞傷害の機序について研究を続けており、TGF- β 1の直接的細胞傷害効果に細胞周期調節蛋白p21の関与を見出した(Wada T, et al. *Kidney Int* 2005)他、p53・Bcl2関連蛋白を介して足細胞アポトーシスが惹起され、糖質コルチコイドがこの経路を阻害することで直接的に細胞保護の効果を発揮することを示し(Wada T, et al. *J Am Soc Nephrol* 2005)。その後この系におけるMAPKシグナル伝達経路の関与についても報告した(Wada T, et al. *Nephron Exp Nephrol* 2008)。一方、赤血球造血刺激因子製剤が足細胞保護作用を介した蛋白尿抑制効果を発揮することを見出し(Eto N, et al. *Kidney Int* 2007)。最近では上記のとおり、cortactinのアセチル化と蛋白尿の関係について報告した。また、ネフローゼ症候群領域における多施設共同横断研究の中心として巣状分節性糸球体硬化症における液性因子の検討を行い、報告している(Wada T, et al. *Kidney Int* 2014)。

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、私たちは糖尿病環境下で足細胞にかかるストレスが細胞骨格関連分子の局在や機能を変化させる様子をより詳細に観察しながら、その防御機構としての活性化ビタミンDの作用及びビタミンD受容体の関与さらにその下流を構成するシグナル伝達経路を含む分子機序の関わりを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

腎糸球体足細胞傷害は糸球体硬化を介して腎機能低下の原因となるため、その機序を解明することは非常に有用である。一方、ビタミンDはカルシウム代謝の主要な調節因子であるのみならず、多様な生体機能を有することが明らかになっている。これまで動物実験や臨床研究でその足細胞保護作用・抗蛋白尿作用が示されているが、その詳細な機序は明らかではない。そこで本研究課題は、従来の糸球体足細胞傷害研究を基盤として、糖尿病に関連する様々

な代謝性ストレスが蛋白尿を惹起・増悪する機構、ビタミン D とその受容体が関与するシグナル伝達経路の異常などの調査をおこなう。この研究の成果を利用した蛋白尿抑制・糸球体硬化抑制法の基盤を構築により腎不全患者の最大の集団である糖尿病関連慢性腎臓病患者の治療選択肢の拡充・予後改善が期待される。

3. 研究の方法

本研究課題では、糖尿病に関連するストレスが足細胞傷害を引き起こす機序をより詳細に明らかにしながら、その防御機構としての活性化ビタミン D の作用・ビタミン D 受容体の関与およびその下流を構成するシグナル伝達経路を含む分子機序を明らかにすることを目指す。以下に検討項目と手法の概要を示す。

(1) 糖尿病モデル動物における代謝性ストレスとビタミン D 経路の評価

4 週齢のマウス (C57BL オス) にストレプトゾトシン 250mg/kg 体重を腹腔注射し、4 日後に血糖値が 200mg/dl 以上のものを糖尿病モデル動物 (STZ マウス) として以降の実験に使用した。これらの糖尿病モデルマウスに活性型ビタミン D (パリカルシトール) 5ng、50ng、500ng、および 0ng (生食のみ) を週 3 回腹腔注射した。Sham 群にはなんらの投与も行われなかった。採血は毎週 1 回、採尿は適時行った。飼育機関の途中で一部の個体を適時安楽死させ、腎臓を採集した。腎臓の一部は裁断され、径の異なるフィルターで順次濾過して糸球体に富む分画を回収した。これらを用いて、以下の評価を行った。

糖尿病モデル動物における代謝性ストレス評価

糖尿病環境下で腎糸球体にかかる代謝性ストレスの評価を記述的に行う。具体的には各群の生存率、体重の他、生化学的解析 (血糖値、尿中アルブミン濃度、尿中クレアチニン濃度など)、病理組織学的解析 (形態変化、PAS 染色など)、代謝性ストレス評価 (8-OHdG 測定、4HNE、Hif-1a、GRP78 染色など) の評価を行った。

糖尿病モデル動物におけるビタミン D 経路の評価

糖尿病モデル動物における血清ビタミン D レベル (25-ヒドロキシビタミン D: 25(OH)D) を経時的に測定するとともに、単離糸球体におけるビタミン D 受容体の発現レベルの変化を定量 PCR などによって評価した。

(2) 糖尿病関連ストレスによる培養足細胞形質変化・傷害の評価

研究分担者の和田が分離・確立したマウス温度感受性不死化糸球体足細胞 (HSMP) を使用した (Wada T, et al. Kidney Int 2005)。この細胞は分化条件で培養することにより増殖が停止し、突起形成により生体内のものに類似した足細胞を培養系で再現できる特徴を持つ。糖尿病関連ストレスを TGF- β 1 あるいはリポポリサッカライド (LPS) の添加により作用させ、以下の評価を行った。

分化条件における細胞形態の変化を Phalloidin 染色による細胞内 stress fiber で確認する scratch assay などにより糖尿病関連ストレス下の足細胞移動能の変化を評価する

(3) 糖尿病関連ストレスに対するビタミン D 標的遺伝子の発現変動の検討

糖尿病関連ストレスを TGF- β 1 の添加により足細胞に加えたときの反応を、ビタミン D 受容体およびその標的遺伝子の発現変動に焦点を当て、(特に細胞増殖・分化に関連する部分を中心として) 培養細胞系で検討することにより、核内受容体としてのビタミン D 受容体の役割を評価する。具体的には細胞周期調節蛋白 (cyclins, CDK 阻害蛋白 p21 等) の発現を調査する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病モデル動物における代謝性ストレスとビタミン D 経路の評価

糖尿病モデル動物における代謝性ストレス評価 STZ マウスの体重や血糖値は実験期間を通して活性型ビタミン D の投与量に関わらず、有意の差は見られなかったが、STZ 投与後の生存率は活性型ビタミン D 投与量に依存しており (図.1)、ビタミンによる糖尿病関連ストレスの軽減がうかがわれた。STZ 投与 5-6 週間後の尿中のアルブミン (μ g/ml) -クレアチニン (mg/ml) 比は、活性型ビタミン D 投与量 0、5ng、50ng、500ng のそれぞれの群で 114.6 ± 82.6 、 75.3 ± 77.0 、 71.2 ± 33.9 、

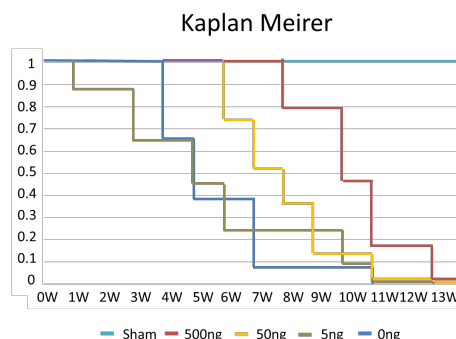


図1. ビタミンDを投与したSTZマウスの生存曲線

43.2 ± 18.3 であり (Sham は 26.8 ± 13.0) 濃度依存的なビタミン D の足細胞保護作用によるタンパク尿の抑制効果が窺われ、腎臓の病理組織像もこれを反映していた。しかしながら、代謝性ストレス評価においては、尿中の 8-OHdG 測定は血糖値と強い負の相関を示し、糖尿病個体が有意に低い値を示していた。Hif-1α および GRP78 の定量的 PCR、またこれらと 4HNE などの組織免疫染色では明瞭な違いは見られず、これらの関与する代謝性ストレスの検出はできなかった。

糖尿病モデル動物におけるビタミン D 経路の評価
 血中の 25(OH)D 濃度は個体差が大きく統計的な有意差は検出できなかった。ビタミン D 受容体 (VDR) の定量的 PCR は、腎臓とそれより分離した糸球体の双方において、500ng の活性型ビタミン D を投与した個体で有意に増加していた (図 2)。

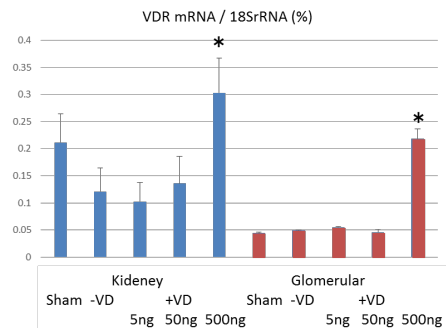


図2. 腎臓(Kidney)と分離した糸球体(Glomerular)でのビタミンD受容体の定量的RT-PCR
 *はShamに対する有意差(p<0.05)を示す

(2) 糖尿病関連ストレスによる培養足細胞形質変化・傷害の評価

分化条件における細胞形態の変化を Phalloidin 染色による細胞内 stress fiber で確認する
 通常の分化条件における HSMP は比較的円形に近い敷石上の上皮形態をとるが、培地への 1ng/ml の TGFβ1 の添加後 24 時間で細胞の stress fiber が太く長くなり、角を持つ細胞形態へと変化した。1ng/ml の LPS の添加では細胞形態の変化は認められなかった。10 μM ~ 100 μM の活性型ビタミン D (Paricalcitol) の添加はそれだけでは細胞形態に変化を示さないが、TGFβ1 と共に添加すると、TGFβ1 による形態変化を抑制した (図 3)。

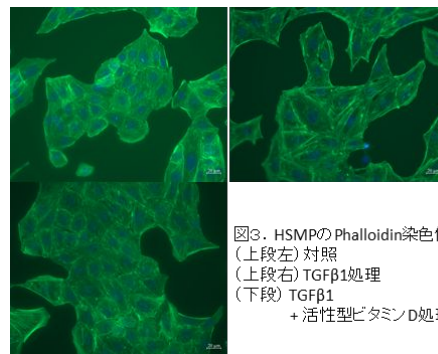


図3. HSMPのPhalloidin染色像
 (上段左) 対照
 (上段右) TGFβ1処理
 (下段) TGFβ1 + 活性型ビタミンD処理

scratch assay などにより糖尿病関連ストレス下の足細胞移動能の変化を評価する

HSMP を 0.1% ウシ胎児血清を含む培地で 24 時間飢餓させた後に通常培地に戻してスクラッチを行い、24 時間後の移動細胞の数をカウントしたところ、1ng/ml の TGFβ1 処理した細胞は対照の約 8 倍の移動能を示した。10 μM ~ 100 μM 活性型ビタミン D (Paricalcitol) は単独では移動能にほとんど影響しないが TGFβ1 と共に作用させると、移動能は約 3 倍にまで抑制された。

同様に HSMP の接着能を評価するため、1ng/ml の TGFβ1 で 24 時間処理した後に培養皿から剥離し、新たな培養皿へ播種して 30 分後に接着した際簿の数をカウントしたところ、対照の約 5 倍の細胞の接着が認められた。10 μM ~ 100 μM 活性型ビタミン D (Paricalcitol) は単独では接着能にほとんど影響しないが TGFβ1 と共に作用させると、接着能は約 3 倍にまで抑制された。

(3) 糖尿病関連ストレスに対するビタミン D 標的遺伝子の発現変動の検討

HSMP の培地に 1ng/ml の TGFβ1 や活 10 μM ~ 100 μM の活性型ビタミン D (Paricalcitol) あるいはその両者を添加して 24 時間培養し、各種の遺伝子発現の変化を定量的 PCR により測定した。受容体ではビタミン D 受容体 (VDR) や PTH 受容体 (PTHrP1) などの発現はビタミン D の添加により亢進されたが、TGFβ1 はこれに抑制作用を示した。細部周期関連遺伝子では、サイクリン D1 などビタミン D で亢進され、TGFβ1 による抑制作用を受けていた。一方、サイクリン依存的キナーゼ阻害因子 1a (CDKN1a, p21Cip1) などは TGFβ1 で強く亢進され、ビタミン D の同時添加で抑制を受けていた。シグナル伝達関連では Wnt の発現は通常非常に弱いものであったが、TGFβ1 の添加により強く亢進され、ビタミン D の添加によりさらに濃度依存的な発現亢進を受けていた。その他の遺伝子も含め、TGFβ1 と活性型ビタミン D は細胞のいろいろな遺伝子発現に影響しており、多くの場合で両者の効果は互いに相反していたが、相乗効果を示す場合もあることが明らかになった。

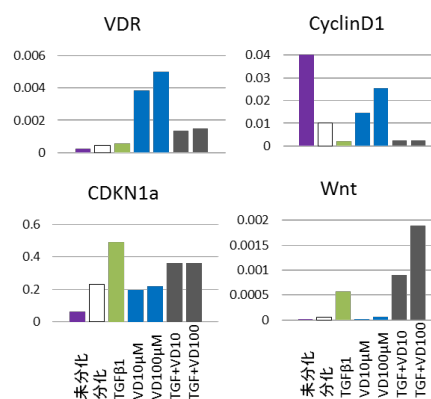


図4. TGFβ1 (1ng/ml) とビタミン D (10 μM ~ 100 μM) による HSMP の遺伝子発現変化 (定量的 PCR)

以上の結果より、ビタミン D による糖尿病関連ストレスからの足細胞保護が明らかにされた。その分子機構として Wnt シグナル系の関与が強く示唆され、今後、この下流のシグナル伝達機構の機序解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：和田 健彦

ローマ字氏名：WADA, Takehiko

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90447049

研究分担者氏名：深川 雅文

ローマ字氏名：FUKAGAWA, Masafumi

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00211516

研究分担者氏名：高橋 浩雄

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Hiroo

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00410093

研究分担者氏名：金井 巖太

ローマ字氏名：KANAI, Genta

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00535221

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森谷 ひとみ

ローマ字氏名：MORIYA, Hitomi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。