

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591193

研究課題名(和文)脂質応答性転写因子の抗線維化作用の解析と新規治療薬の探索 - 低酸素性腎障害を中心に

研究課題名(英文) Analysis of anti-fibrotic effects of lipid-responsible transcription factors and a search for new therapeutic agents -with special attention to hypoxic insults-

研究代表者

木村 秀樹 (Kimura, Hideki)

福井大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20283187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：メサンギウム細胞(MC)、近位尿細管上皮細胞(PT)は腎線維化に密接に関与する。肝型脂肪酸結合蛋白の過剰発現のマウスPTで炎症性・低酸素性障害への抵抗性が認められた。ヒトMCとヒトPTでは、テルミサルタン(ARB)がPPAR-d作用を呈し、PPAR-d依存性にサイトカインの炎症・線維化作用を抑制した。PPAR-a欠損マウスでは、対照マウス(S129)に比して、心線維化が強く、低酸素で増強したが、腎線維化の増悪はなかった。ドキシソルビシン誘導性の糸球体障害では、欠損マウスで、尿蛋白が有意に増加し、糸球体硬化が有意に増強していた。これらより、脂質応答転写因子の細胞・組織保護作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Proximal tubular epithelial cells (PT) and mesangial cells (MC) are closely associated with renal fibrosis. Mouse proximal tubular epithelial cells (mProx) overexpressing human liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP) were shown to have greater tolerance to inflammatory and hypoxic insults than mProx itself. In human cultured PT and MC, telmisartan (ARB) executed PPAR-delta functions and reduced inflammatory and pro-fibrotic effects induced by some cytokines.

Cardiac fibrosis of PPAR-a KO mice was more evident than that of control mice (S129), which was enhanced by hypoxic environments, whereas renal fibrosis was scarcely observed and similar in the two mice groups. In doxorubicin-induced glomerulopathy, PPAR-a KO mice had more proteinuria and more frequent glomerulosclerosis than S129 mice.

These suggest the cell- and tissue-protective effects of lipid responsible transcription factors and its associated proteins such as PPARs and FABPs.

研究分野：腎臓病学、臨床検査医学、内科臨床医学

 キーワード：ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体 脂肪酸結合蛋白 近位尿細管上皮細胞 メサンギウム細胞
 サイトカイン アンジオテンシン 受容体拮抗薬 ドキシソルビシン

1. 研究開始当初の背景

尿細管間質の萎縮、線維化は腎不全進展への独立危険因子であり(New Engl J Med, 1998)、腎間質線維化において尿細管上皮細胞の役割の重要性が指摘されている。間質線維化の要因としては、糸球体から漏出した脂質含有の尿蛋白、糸球体細胞からの分泌サイトカインによる尿細管・間質細胞の炎症・増殖刺激、糸球体内増殖・硬化から由来する実質的な尿細管上皮の低酸素が重要な因子と考えられている(J Am Soc Nephrol, 2006)。また、以前より脂質代謝異常も腎線維化の進展因子と考えられ、上述の尿蛋白に結合した脂質が、尿細管細胞に対して細胞障害性に作用し、炎症を誘導すると解釈されてきた(J Am Soc Nephrol, 1994/Am J Nephrol, 2004)。一方、生化学分野では、各種細胞内には多様な脂質と結合し、脂質の細胞内転送を担う脂質結合蛋白(LTP)が存在することが報告されていた(FASEB J, 1989)。さらに、近年では脂質転送蛋白(LTP)が転送しうる脂質で転写活性が増強する脂質応答性転写因子(ペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体(PPAR)、ファルネソイド受容体(FXR)など)が発見され、その抗炎症・抗線維化作用が注目されている(PANS, 2003/Diabetes, 2010)。しかしながら、脂質と腎障害進展との関わりを検討する上で、脂質と細胞内のLTPさらには脂質応答性転写因子がどのような分子機序で腎線維化過程に影響しているのか、十分には解明されていない。また、重要な線維化促進因子である低酸素状態が上記の分子機序にどのように作用するのも不明である。本研究はこれらの点を検討し、新規治療の可能性を探索するものである。

2. 研究の目的

- (1) マウス近位尿細管細胞株(mProx)とヒト肝型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)過剰発現のmProxで、L-FABP過剰発現が脂質応答性転写因子(PPAR, FXR)発現とサイトカイン・低酸素誘導性の炎症と線維化に及ぼす作用を解析する。
- (2) 腎固有細胞においてPPARの抗炎症、線維化作用を検証する。
- (3) PPAR-a欠損(KO)マウスと対照マウス(S129)で、ドキシソルピシン(DOX)による腎障害マウスを作製し、PPARa欠損が線維化に及ぼす影響を解析する。また、PPAR-dの欠損マウスを作製し、PPARdが脂質応答転写因子の発現と

腎線維化へ及ぼす作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養実験

ヒト近位尿細管上皮細胞(HPTec)とヒトメサンギウム細胞(HMC)を12-well plateで増殖培地(三光純薬)を用いコンフルントまで培養する。その後、0.5%FBS含有DMEMで24時間静止培養後、サイトカインあるいは低酸素で24-48時間刺激し、その総RNAと上清を解析する。TNF- α は0.1-10ng/ml, TGF- β は1-1000pg/mlで使用し、低酸素(1%O₂)環境は、1%O₂、5%CO₂、94%N₂の混合ガスと低酸素チャンバー(Billups-Rothenberg社製)で作製した。

C57BL/6Jマウスの近位尿細管細胞をSV40処理して作製したmProxとヒトL-FABPゲノム遺伝子を導入したFABP-mProxをK1倍地を用いて培養し、上記と同様に刺激実験を行った。

各種遺伝子発現と蛋白発現の検出

各種細胞におけるPPAR-a, b, g, FABP、肝X受容体(LXR)-a, L-, H-FABP, UCP-2, PAI-1, VEGF-C, MCP-1のmRNA発現をreal time PCR法(ABI社; Gene Expression assay)で測定。同蛋白量は、PPARについてはイムノブロット法(細胞破砕液)で、PAI-1, VEGF-C, MCP-1は上清について免疫比濁法あるいはELISA法で測定した。

PPAR活性化作用の評価

PPRE-lucを細胞にリポフェクタミンで導入後24時間に、各種PPAR活性化薬を添加してPPRE活性を測定した。PPAR- δ 活性化薬としてGW516 (10 μ M)を、PPAR- γ 活性化薬としてPioglitazone (Pio; 3 μ M)を、推定されるPPAR- δ, γ 活性化薬としてTelm(1, 10 μ M)を用いた。PPAR- δ の特異的阻害はGSK-0660を1 μ M、PPAR- γ の特異的阻害薬はGW9662を2.5 μ Mで使用した。

活性化シグナル経路の解析

刺激後の各種シグナル経路の活性化はリン酸化蛋白と非リン酸化蛋白の発現量をイムノブロット法(細胞破砕液)解析した。

培養細胞での遺伝子発現抑制実験

siRNAと非標的siRNAを作製し、遺伝子導入すること標的遺伝子の発現を抑制した。

(2) マウス実験

低酸素被曝での組織変化の検討

PPAR-a 欠損 (KO) マウスと対照マウス (S129) を通常飼育し、6, 12, 24 ヶ月齢で腎、心組織の線維化を比較する。また、2 ヶ月齢後に低酸素環境 (11%O₂) に 3, 6 ヶ月被曝させ腎、心組織の線維化を比較する。

腎障害モデルによる PPAR-a の腎保護作用の検討

PPAR-aKO マウスと S129 にドキシソルピシン (DOX; 10mg/kg) の注射を実施し、1 - 4 週後の尿蛋白、腎組織の変動を解析する。1, 3, 10mg/kg の 2 回打ち (2 週間隔) と 10mg/kg の 1 回打ちを実施する。

糸球体上皮特異的 PPARdKO マウスの作出

PPAR-d-loxP マウス (ヘテロ接合体) を購入し、ホモ接合体を作製する。また、Neph-Cre マウス (ヘミ接合体) を譲受する。ホモ接合体の PPAR-d-loxP マウスと Neph-Cre を交配し、糸球体上皮細胞特異的欠損マウスの作出を高度試みる。loxP と Neph-Cre は尻尾の DNA より判別し、糸球体特異的な PPAR-d 欠損は腎組織で確認する。

4. 研究成果

(1) 細胞培養実験

mProx と L-FABP-mProx

TNF-a 誘導性の MCP-1 発現は L-FABP mProx で有意に低下を認め、基底状態の CTGF 発現も L-FABP-mProx で有意に低値であった。一方、基底状態の VEGF-A 発現は L-FABP-mProx で有意に低下していたものの、低酸素誘導性の VEGF-A 発現の増加量は、L-FABP-mProx と mProx で差がなかった。これらの知見より、L-FABP-mProx では炎症性刺激への反応性は抑制的であるが、低酸素への反応性は mProx と同等に保持されており、障害に抵抗性を有すると考えられた。

HMC

HMC において PPAR-d の活性化は TGF- β 誘導性の PAI-1 発現を有意に抑制した。ARB であるテルミサルタン (Telm) は H-FABP や UCP-2 の発現を誘導して PPAR-d 作用を呈し、PPAR-d 依存性に TGF- β 誘導性の PAI-1 発現を抑制した。

HPTEC

HPTEC においても、Telm は H-FABP と LXR-a の発現を誘導して PPAR-d 活性を呈し、PPAR-d 依存性に TNF-a 誘導性の VEGF-C 発現を抑制した。TNF-a 誘導性の VEGF-C 発現のシグナル経路を解析したところ、ERK や NF κ B ではなく p38MAPK のリン酸化により HSP27 がリン酸化されることが確認でき p38MAPK/ HSP27 経路の活性化を介していることが判明した。Telm は PPAR-d 依存性に p38MAPK のリン酸を抑制することが確認され、これが抗炎症作用の分子機序の一つと考えられた (図 1)。

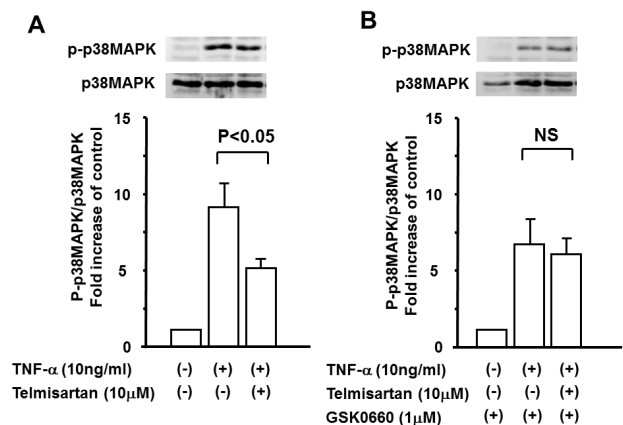


図 1.テルミサルタンは p38MAPK のリン酸化を抑制(A)し、この作用は PPAR-d 阻害薬で抑制された。

(2) マウス実験

通常飼育

PPAR-aKO マウスと S129 の 24 ヶ月までの通常飼育で生命予後に両群で有意差を認めなかったため、次に腎組織と心組織を比較した。KO マウスは 12, 24 ヶ月齢で有意に心筋の線維化が高度であったが 2, 6, 9 ヶ月齢では有意差は認めなかった。腎組織の線維化については、2, 6, 9, 12, 24 ヶ月齢で両マウス群に有意差はなかった。

低酸素環境飼育

3 ヶ月間低酸素飼育の 6 ヶ月齢の両群マウスで心筋線維化に有意差はなかったが、6 ヶ月間低酸素飼育の 9 ヶ月齢では KO マウス群で有意に心筋線維化が高度であった。一方、腎線維化については、何れの低酸素期間でも両群に有意差を認めなかった。

糸球体障害モデル

糸球体障害モデルとして、PPAR- α KO マウスと対照マウス (S129) にドキシソルピシン (10mg/kg) の 2 回注射 (2 週間間隔) を実施したところ KO マウスにおいて投与後 5 - 7 週で蛋白尿 (g/Cr) が有意に高値であった。次に、ドキシソルピシン 1, 3, 10mg/kg を 1 回注射として KO 群と S129 群で蛋白尿、腎機能を比較した。1, 3mg/kg では両群に有意差を認めなかったが、10mg/kg では、KO 群で 3 日、4 日、7 日、2 週、3 週、4、4.5 週後の蛋白尿 (図 2) と 4 週後の血清 Cr, BUN が有意に高値であった。

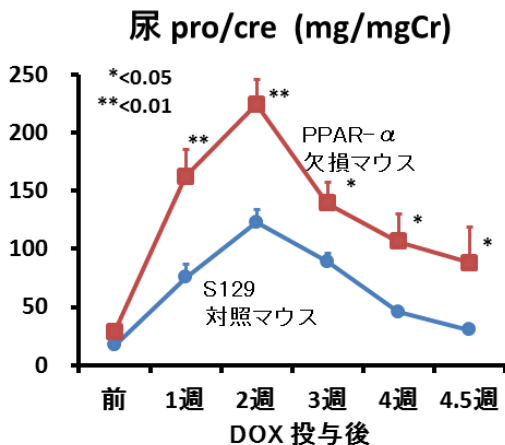


図 2 . DOX 投与後 4.5 週後までの尿蛋白の変動。

また、4 週後の腎組織 (PAS 染色) では KO 群で増殖・硬化を呈する糸球体の比率が S129 に比して有意に高値であった (図 3)。

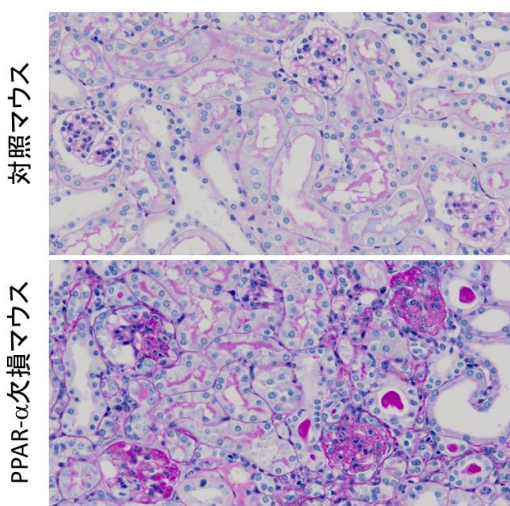


図 3 . DOX 投与 4 週後の腎組織像。

さらに、糸球体上皮細胞の特異的マーカーであるポドカリキシンの尿中排泄量 (mg/gCr) は KO 群で 3 日、4 日、7 日後に有意に高値と

なったが (図 4) 4 週後には逆に有意に低値を示した。この所見から、KO 群では早期に上皮細胞障害が発症し、その後上皮脱落による不可逆的な上皮喪失をきたすこと、一方、S129 群では上皮細胞障害が軽度で上皮喪失も軽度であることが判明した。

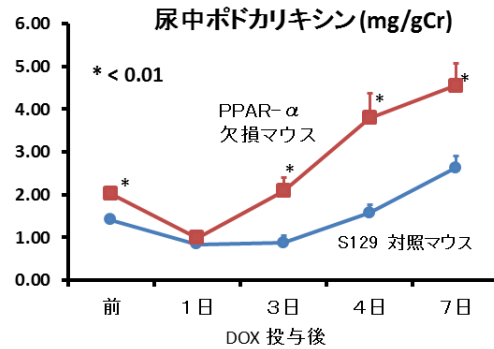


図 4 . DOX 投与後 1 週間の尿中ポドカリキシンの変動。

糸球体上皮細胞特異的 PPAR-d 欠損マウスの作出

PPAR-d の組織特異的な欠損マウスについては、Neph-Cre マウスとホモ接合体の PPAR-d-loxP マウスを交配し、糸球体上皮細胞特異的欠損マウスのヘテロ接合体を作製した。平成 27 年 3 月の時点で、同ヘテロ接合体とホモ接合 PPAR-d loxP との交配が進行中である。

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 5 件)

N.Takahashi, K.Kasuno, H. Kimura, M.Iwano (他 14 名中 15 番目): A heterozygous female with Fabry disease due to a novel alpha-galactosidase A mutation exhibits a unique synaptopodin distribution in vacuolated podocyte. Clin Nephrol, 2015, in press. 査読有

K.Kasuno, H.Kimura, M.Iwano (他 16 名中 5 番目): Renal redox dysregulation in AKI: application for oxidative stress marker of AKI. Am J Physiol Renal Physiol 307:F1342-1351, 2014 査読有 doi: 10.1152/ajprenal.00381.2013.

H.Kimura, K.Kasuno, M.Iwano (他 5 名中 1 番目): Telmisartan, a possible

PPAR- agonist, reduces TNF- - stimulated VEGF-C production by inhibiting the p38MAPK/HS27 pathway in human proximal renal tubular cells: Biochemical and Biophysical Research Communications 454: 320-327, 2014 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.077

D.Mikami, H.Kimura, K.Kasuno, M.Iwano (他 4 名中 2 番目): Telmisartan activates endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-d and may have anti-fibrotic effects in human mesangial cells: Hypertension Research 37:422-431, 2014 査読有

doi: 10.1038/hr.2013.157.

木村秀樹: 進行性腎障害におけるペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体 (PPAR) の免疫調節作用の解析: 福井大学 重点研究成果集 明日への挑戦 8:1-2, 2013 査読無

[学会発表](計 5 件)

M.Imada, K.Kasuno, H.Kimura, M.Iwano (他 5 名中 7 番目): A heterozygous female with Fabry disease due to a novel -galactosidase A mutation (Pro210Ser) exhibits a unique synaptopodin distribution in vacuolated podocytes. The annual meeting of American Society of Nephrology, November 11-16, 2014, Philadelphia, USA.

H.Kimura, K.Kasuno, M.Iwano (他 4 名中 1 番目): Vascular Endothelial Growth Factor-C Production stimulated by TNF- through p38/HSP27 Pathway and Its therapeutic reduction in Human Proximal Renal Tubular Cells. The annual meeting of American Society of Nephrology, November 8, 2013, Atlanta, USA.

D.Mikami, H.Kimura, K.Kasuno, M.Iwano (他 5 名中 2 番目): Telmisartan Activates Endogenous Peroxisome Proliferator-Activated receptor- and May Have Anti-Fibrotic Effects in Human Mesangial Cell. The annual meeting of American Society of Nephrology, November 8, 2013, Atlanta, USA.

N. Tkahashi, H. Kimura, K. Kasuno, M Iwano (他 5 名中 8 番目): Urinary Podocalyxin Reflects Podocyte Injury in Hypoxia-exacerbated Diabetic Glomerulosclerosis. The annual meeting of American Society of Nephrology, November 8, 2013, Atlanta, USA.

N. Tkahashi, H. Kimura, K. Kasuno, M Iwano (他 5 名中 2 番目): Role of Renal Hypoxia in the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. The annual meeting of American Society of Nephrology, November 2, 2012, San Diego, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 秀樹 (KIMURA, HIDEKI)

福井大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 20283187

(2) 研究分担者

岩野 正行 (IWANO, MASAYUKI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 20275324

糟野 健司 (KASUNO, KENJI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 60455243

菅谷 健 (SUGAYA, TAKESHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部

客員教授

研究者番号: 40381561
