

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09252

研究課題名(和文)ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体の糸球体障害抑制作用の解析と新規治療薬の探索

研究課題名(英文)Analysis of the inhibitory effects of peroxsome proliferator-activated receptors on glomerular injury

研究代表者

木村 秀樹(Kimura, Hideki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授

研究者番号：20283187

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)：PPAR-欠損マウスと対照マウスにドキシソルビシンの1回静注を実施。欠損群で3日、7日、2週、4週後の蛋白尿が有意に高く、4週後の血清Cr、BUNが有意に高く、また、9日後と4.5週後の糸球体硬化が有意に高度であった。さらに、ポドカリキシン(糸球体マーカー)の尿中排泄量が欠損群で3日、7日後に有意に高値となった。マウス培養糸球体上皮細胞をドキシソルビシン刺激後、caspase3活性は著明に増強し、PPAR-活性化薬は、この増強を40%抑制した。また、マウス尿細管細胞株のシスプラチン誘導性アポトーシスは、PPAR-活性化薬で20%程度抑制された。以上より、PPARの腎保護作用が確認できた。

研究成果の概要(英文)：PPAR-a deficient (KO) mice as well as control mice (S129) were injected once with doxorubicin (10mg/kg) via the tail vein at day 0. At day 3, day 7, week 2 and week 4, urinary protein levels were significantly higher in the KO mice than control mice. Serum Cr levels were significantly higher in the KO mice at 4 week. Glomerulosclerosis was also severer in the KO mice than the control at day 9 and week 4.5. Moreover, urinary excretion levels of podocalyxin as a specific marker of podocytes were significantly higher in the KO mice at days 3 and 7. In an immortalized mouse podocyte cell line treated with doxorubicin for 24 hours, amounts of cleaved caspase 3 and the percentage of apoptotic cells markedly increased. A PPAR-a agonist (fenofibrate) reduced the increases by 35-40%. In a mouse proximal tubular cell line, a PPAR-d activator (GW0742) weakened cisplatin-induced apoptosis by about 20%.

These findings suggest that different types of PPARs may protect against kidney injury.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：PPAR-a 糸球体上皮細胞障害 尿細管上皮細胞障害 PPAR-d PPAR欠損マウス アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

糸球体硬化と間質線維化の原因である糸球体上皮細胞、尿細管細胞の障害は、ミトコンドリア障害、アポトーシス、オートファジー障害に由来することが、近年、注目され、脂質沈着と腎組織障害の関連も報告されている。一方、脂質代謝の中心的役割を担う核内転写因子のペルオキシシーム増殖因子活性化受容体(PPAR)には3亜型あり、 α 型は脂肪酸代謝の促進作用、 β 型は脂肪分化の促進作用を持つ。さらに、PPARは心筋組織でミトコンドリア障害の軽減を介してアポトーシスを抑制し、PPAR α は心筋細胞でオートファジーを誘導し、細胞を保護する。また、糸球体硬化と腎線維化の抑制とPPARの活性化の関連性も報告されている。以上から、PPARは腎保護作用を発揮すると予想できるが、PPAR単独欠損マウスでの解析は未だ不十分で、厳密なPPAR亜型別の作用解析はない。

2. 研究の目的

(1) PPAR α 欠損マウスで、糸球体・尿細管障害を誘導してPPAR α 欠損の易罹病性を明らかにし、ミトコンドリア障害、オートファジー障害などの観点も踏まえてその分子機序を明確にする。さらに、マウス培養糸球体上皮細胞でPPARが細胞保護作用を有するかを明確にする。

(2) 糸球体上皮細胞特異的 PPAR α 欠損マウスを PPAR α のLoxPマウスとNephrin-Creマウスから先駆的に作出する。まず、同欠損マウス自体の糸球体障害の有無を明らかにする。また、糸球体障害を誘導して糸球体上皮細胞の脆弱性を明らかにする。

(3) マウス糸球体上皮細胞とマウス近位尿細管細胞(mProx)を用いて、薬剤性細胞障害を誘導し、PPAR活性化薬が障害度を抑制するか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PPAR α 欠損マウスにおいて、ドキシソルピシン(DOX)による糸球体障害モデルを作製し、対照マウス(S129)と組織学・分子生物学的に障害度を比較することで易罹病性とその機序を解析する。

(2) 糸球体上皮細胞特異的 PPAR α 欠損マウスを PPAR α のLoxPマウスとNephrin-Creマウス(ネフリン転写領域を有するCre遺伝子発現マウス)から作出後、同欠損マウス自体の糸球体障害を組織学的に解析する。また、DOXによる糸球体障害を誘導して糸球体上皮細胞の脆弱性を解析する。

(3) マウス培養糸球体上皮細胞でDOX処理を行い、mProxにはシスプラチン(CP)処理を行って、細胞障害を誘導し、カスパーゼ活性化、アポトーシスを評価する。PPAR活性化薬が、これらの障害を軽減するか否かを検討し、その分子機序を解析する。

4. 研究成果

(1) PPAR α 欠損マウスにおける易糸球体障害性の評価と障害機序の解析：

PPAR α 欠損マウスと対照マウス(S129)にドキシソルピシン(DOX; 10mg/kg)の1回注射を実施。KO群で3日、4日、7日、2週、3週、4週後の蛋白尿(g/gCr)が有意に高値であった。また、KO群で9日後の血清UN,

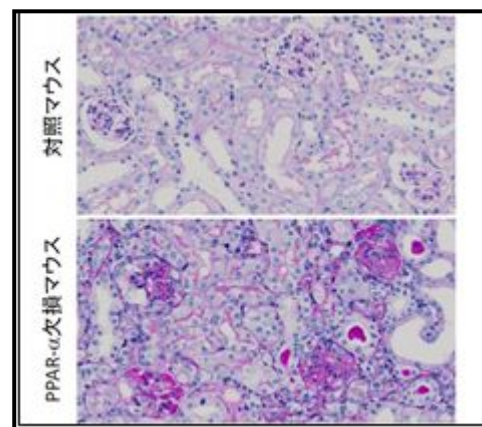


図1. 腎組織像(ドキシソルピシン投与4.5週後、PAS染色100倍)

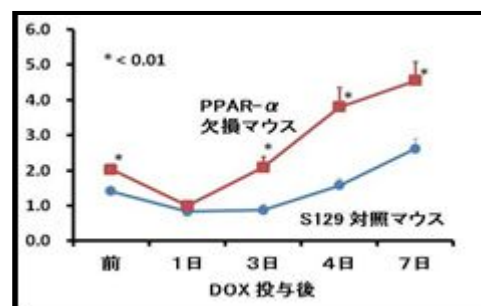


図2. 尿中ポドカリキシン量(mg/gCr)の経時的推移

遊離脂肪酸, T-Chol, TG が有意に高く、4 週後では血清 Cr, BUN, T-choI が有意に高値であった。また、9 日後と 4 週後の腎組織では KO 群で増殖・硬化を呈する糸球体の比率が有意に高値であった(図 1)。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(PCX)の尿中排泄量は KO 群で 3 日、4 日、7 日後に有意に高値(図 2)となり、免疫組織の解析では 4 週後に KO 群で PCX 発現が有意に低下した。腎組織のイムノプロット(IB)解析では 3 日後に欠損マウスで、より高度の Bax の発現増強を確認した。

また、9 日後の腎組織の IB 解析では、欠損マウスで、より高度の p62 発現と LC3-II/I の低下を認め、これは蛋白尿の程度と相関していた。9 日後の腎組織の免疫染色では、欠損マウスでボウマン嚢上皮、糸球体上皮、近位尿細管上皮により高度の p62 発現を認めた(図 3)。

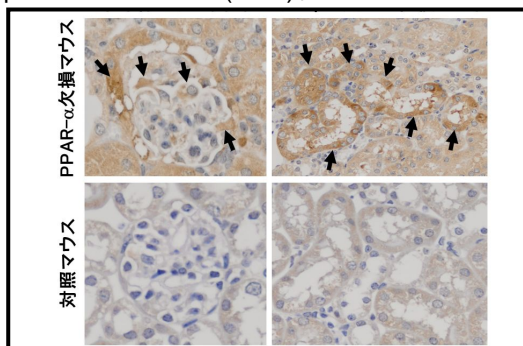


図 3. ドキソルビシン投与 9 日後の p62 の免疫染色像(200 倍)

これらは、PPAR- 欠損マウスでオートファジー活性の低下を推測させた。

(2) 糸球体上皮細胞特異的(Pod)PPAR- 欠損(PDKO)マウスの作製:

PPAR- の LoxP マウス(B6 系;ヘテロ)間で交配し F1 のホモ接合体を作製し、ホモ接合体間で交配・維持した。次に、PPAR- の LoxP マウス(ホモ体)と Neph rin-Cre マウス(ヘミ体)で交配し、PodPDKO マウスのヘテロ接合体を作製し、最終的に、ヘテロ接合体 PodPDKO マウス間で交配してホモ接合体を作製した。肝臓、尾組織では遺伝子レベルで PPAR- のエクソン欠損は確認できず、腎組織でのみで PPAR- のエクソン欠損が確認できた。しかし、共焦点蛍光顕微鏡では糸球体上皮細胞に

PPAR- 抗原が確認されたため、ある程度の正常蛋白あるいは不完全抗原が発現している可能性があった。

また、PodPDKO マウス(B6 系)に DOX を静注したところ、蛋白尿の増加は認められなかった。これは、PPAR- 抗原の欠損が不十分、あるいは B6 系の DOX 抵抗性に由来するか否かは、現時点で不明であった。一方、S129 系は DOX 感受性があるため、現在、PodPDKO マウスを S129 系に backcross 中である。

(3) マウス培養腎固有細胞を用いた実験: マウス培養糸球体上皮細胞(mPod)を DOX(1 μ g/ml)で刺激後、caspase3 活性は 30 倍以上に増強したが、PPAR- 活性化薬のフェノフィレート(100 μ M)は、この増強を 40%抑制した。さらに、DOX で誘導される早期・晩期のアポトーシスがフェノフィレートで 40%抑制された。この作用は、Bax/Bcl2 の低下で示されるミトコンドリア障害の軽減と p62 の減少で示されるオートファジーの亢進に関連する可能性があった。また、マウス尿細管細胞株(mProx)のシスプラチン(25 μ M)誘導性のアポトーシスは、PPAR- 活性化薬の GW0742(1 μ M)で 20%程度抑制された。GW0742 は Bax のミトコンドリア蓄積とチトクローム C の流出を抑制してカスパーゼ 3 活性化を軽減し、アポトーシスを抑制することが判明した。この作用は部分的に PPAR- 依存性であった。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

木村 秀樹: 総説 ペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体と腎疾患 日本臨床検査自動化学会雑誌 2018 年 43 巻 2 号 p 131-137.

Takahashi N, Kasuno K (29 名中 18 番目), Kimura H(29 名中 19 番目), Iwano M (29 名中 29 番目): Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells. J Am Soc Nephrol. 2017; 28(12):3688-3698. doi:10.1681/ASN.2016101074.

Kobayashi M, Mikami D, Kimura H, Kamiyama K, Morikawa Y, Yokoi S, Kasuno K, Takahashi N, Taniguchi T, Iwano M: Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit

TNF- α -induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017, 486(2); 499-505. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.071
木村 秀樹 腎性脂質異常症 臨床病理 2016年, 64巻, p527-532.
A.Shimada, H.Kimura, K.Oida, H.Kanehara, Y.Bando, S.Sakamoto, T.Wakasugi, T.Saga, Y.Ito, K.Kamiyama, D.Mikami, M.Iwano, T.Hirano, H.Yoshida: Serum CETP status is independently associated with reduction rates in LDL-C in pitavastatin-treated diabetic patients and possible involvement of LXR in its association. *Lipids Health Dis* 2016, 15(1): 57-68. doi: 10.1186/s12944-016-0223-6.
Kimura N, Kimura H, Takahashi N, Hamada T, Maegawa H, Mori M, Imamura Y, Kusaka Y, Yoshida H, Iwano M: Renal resistive index correlates with peritubular capillary loss and arteriosclerosis in biopsy tissues from patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2015, 19(6): 1114-1119. doi: 10.1007/s10157-015-1116-0.

〔学会発表〕(計6件)

上山 和子、三上 大輔、横井 靖二、小林 麻美子、森川 幸恵、西川 雄大、高橋 直生、糟野 健司、岩野 正之、木村 秀樹: PPAR- α 活性化は p53/Bax/caspase3 経路の抑制を介してシスプラチン尿細管障害を軽減する 第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018/6/10 ホテル日航新潟(新潟県)
上山 和子、横井 靖二、杉本 英弘、岩野 正之、木村 秀樹: PPAR- α 活性化は p53/Bax/caspase3 経路の抑制を介してシスプラチン腎障害を軽減する 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会 2017/11/18 国立京都国際会館(京都府)
上山 和子、木村 秀樹、三上 大輔、高橋 直生、糟野 健司、原 正則、岩野 正之: PPAR- α 欠損はドキシソルピシン誘導性の糸球体障害と硬化を憎悪させる 欠損マウスの解析から 第 60 回日本腎臓学会学術総会 2017/5/28 仙台国際センター(宮城県)
上山 和子、杉本 英弘、市川 雅彦、黒瀬 知美、林 泰平、原 正則、岩野 正之、木村 秀樹: PPAR- α 欠損はドキシソルピシン誘導性の糸球体障害と硬化を憎悪させる - 欠損マウスの解析から 第 63 回日本臨床検査医学会学術集

会 2016/9/4 神戸国際展示場 2 号館(兵庫県)

上山 和子、杉本 英弘、三上 大輔、岩野 正之、木村 秀樹: 近位尿細管細胞においてテルミサルタンは TNF- α 誘導性 VEGF-C 発現を PPAR- α 活性化を介して抑制する 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015/11/20 長良川国際会議場(岐阜県)

三上 大輔、木村 秀樹、上山 和子、横井 靖二、西川 雄大、森田 紗由、今田 麻美子、高橋 直生、糟野 健司、岩野 正之: PPAR- α 活性化態を有するアンジオテンシン II 受容体阻害薬のミトコンドリア機能調整作用の解析 第 58 回(平成 27 年度)日本腎臓学会学術総会 2015/06 名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 秀樹(KIMURA HIDEKI)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授

研究者番号: 20283187

(2) 研究分担者

岩野正之(IWANO MASAYUKI)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号: 20275324

菅谷 健(SUGAYA TAKESHI)

聖マリアンナ大学・医学部・客員教授

研究者番号: 40381561

糟野 健司(KASUNO KENJI)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号: 60455243