

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：25301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19925

研究課題名(和文) 周期的伸展刺激装置を用いた慢性腎疾患の新しいin vitroモデルの研究

研究課題名(英文) Cyclic stretch on glomerular endothelial cells, a new in vitro model for glomerular hypertension

研究代表者

入江 康至(Irie, Yasuyuki)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：70303948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ糸球体内皮細胞由来の培養細胞株GEN-Tをシリコン製チャンバーに播種し、培養細胞伸展システムを用いて機械的伸展刺激を加える系を構築し、伸展刺激により発現誘導された12の遺伝子群についてタイムコース解析、各種メカノセンサーの阻害薬による解析を行った。一方、in vivoの腎硬化症モデルとして、飲水中にL-NAMEを投与したSHRラットの腎を用いて、上記遺伝子群の発現を検討した。その結果、Wntシグナルに関わると想定されるSFRP2遺伝子の発現が、腎硬化症と関連して大きく減少することが分かった。現在、この系について解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管平滑筋が存在しないために糸球体高血圧のメカノストレスに直接さらされる糸球体内皮細胞に注目し解析を行った。本研究では、12種の遺伝子について定量PCR法を用いて発現を解析した。また、CKDモデル動物を作成し、末期CKDの腎臓について同じ遺伝子の発現を解析した。その結果、Wntシグナルへの関与が想定されるSFRP2遺伝子の発現が、大きく減少することが分かった。CKD初期や中期において発現増加した同遺伝子が末期には大きく減少し、内皮細胞や糸球体機能の低下と関わっている可能性が示唆された。WntシグナルがCKDにも関与すること可能性が示唆され、CKD進展の機構解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established the system to which a mechanical extension stimulus is applied on the GEN-T cells, bovine glomerular endothelial cell line, using silicon chambers and motor driven culture apparatus. A time course analysis and an analysis and of mechanosensor inhibition were performed on 12 genes to which manifestation was led by an extension stimulus. As the in vivo model for nephrosclerosis, the expression of above 12 genes was assessed in kidneys of SHR rat treated with L-NAME. As a result, we found the expression of SFRP2 gene, a putative gene involved in Wnt signaling pathway, decreased in nephrosclerosis. Currently, we are analyzing this mechanism.

研究分野：薬理学

キーワード：糸球体内皮 伸展培養 慢性腎疾患 Wntシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における CKD 患者数は約 600 万人と推定され、有病率は成人の約 6%と考えられる。慢性透析患者数も年々増加し 2012 年末には約 31 万人となったが、その過半数が CKD を背景としており、さらにその割合は急増している。因みに外来血液透析の医療費は患者一人当たり年間約 500 万円である。CKD は末期腎不全の原因になるだけでなく、心臓病や脳卒中などの心血管イベントの重要なリスクファクターであることが明らかになった。特に、糸球体高血圧 糸球体硬化 腎不全と進行する糸球体内皮の障害が、全身的な血管内皮障害の進行や心血管イベントと並行することがわかってきた。しかし、糸球体内皮自体の障害機構の解析や、糸球体病変の初期から全身の血管障害が進行する機序については、適切な *in vitro* のモデル系が確立されていないこともあって不明な点が多い。

一方、メカノストレスは、特に心血管分野で重要な生理的および病態生理的な意義を持つ刺激であり、高血圧関連疾患の病態解明を目的として多くの研究が為されてきた。血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に伸展刺激を負荷する系も既に多くの報告があり、方法論も確立しつつある。

糸球体高血圧や糸球体硬化症についての研究分野では、これまで個体レベルでの研究が多くを占め、培養細胞を用いた研究はメサングウム細胞に関するものが中心であった。糸球体内皮細胞に伸展負荷をかけるモデルは糸球体高血圧の病態に良く一致していると思われるが、これまでのところ報告がない。一方、動脈硬化の分野では内皮細胞に種々のメカニカルストレスを負荷する研究は一般的であり、その意味で本研究はある程度確立された研究手法を異分野に適用するものであると位置づけられる。また、細胞培養上清を別の培養細胞に添加する実験系も一般的な研究手法ではあるが、これを心腎連関の解析に適用した例は報告されていない。

2. 研究の目的

近年、高血圧やメタボリック症候群に関わって慢性腎臓病(以下、CKD)の重要性が明らかになってきている。本研究では、糸球体内皮に由来する培養細胞株に伸展刺激を負荷することにより、CKD の初期病変である糸球体高血圧の *in vitro* モデルを作成し、これを主に分子生物学的手法を用いて解析する。また、上記伸展培養細胞上清を血管平滑筋培養株 A-10 細胞の培養液中に添加し、A-10 細胞の遺伝子発現変化、形態的变化についても解析する。これにより、CKD 病態下で動脈硬化が進展する機構を解析し心腎連関の *in vitro* モデルを確立する。さらに、得られた結果を CKD の病態モデルとなる *in vivo* の系にフィードバックして検証を行うことにより分子レベルで CKD の病態を解明する。本研究では、このような方法により、CKD の進展を抑制するための生活習慣や治療法を見出すための基盤を形成することを目的とする。

3. 研究の方法

培養細胞に対する伸展刺激の系における解析

ウシ糸球体内皮細胞由来の培養細胞株 GEN-T をシリコン製チャンバーに播種し、培養細胞伸展システム <http://www.strex.co.jp/> を用いて機械的伸展刺激を加えた。細胞より mRNA および蛋白質を抽出し、定量 PCR 法や免疫ブロット法を用いて解析を行った。伸展刺激にあたっては、種々の阻害薬、刺激薬を用いて詳細な解析を行い、メカノセンサーから遺伝子発現に至る細胞伝達経路を解析した。また、伸展培養した GEN-T 細胞上清を血管平滑筋培養株 A-10 細胞の培養液中に添加し、A-10 細胞の遺伝子発現変化、形態的变化についても解析を行った。A-10 細胞より mRNA を抽出し、定量 PCR 法により A-10 細胞の分化相マーカー遺伝子、増殖・遊走相マーカー遺伝子を解析した。

NOS 阻害物質 L-NAME 処理 SHR (高血圧自然発症ラット) を用いて慢性腎臓病 (CKD) モデル動物を作成し、上記の遺伝子発現、蛋白質発現の変化と病理学的変化の関係について形態学的、生化学的に解析した。SHR は高血圧を自然発症するだけでなく、高塩分食摂取により腎障害をきたすことが報告されているが、L-NAME を三週間飲水中投与することにより NOS 活性を抑制した SHR ラットは、腎臓・心臓に高血圧性の変化をきたし、腎硬化症のモデルとして確立されている。この腎硬化症モデルラットを作成し、腎臓より mRNA および蛋白質を抽出し、遺伝子発現について解析を行った。

4. 研究成果

岡山県立大学において、ウシ糸球体内皮細胞由来の培養細胞株 GEN-T をシリコン製チャンバーに播種し、培養細胞伸展システムを用いて機械的伸展刺激を加える系を構築した。本システムは申請者の所属していた岩手医科大学の研究室で既に稼働中のものであり、チャンバーのコーティングや機械の温度管理などについて最適化がなされている。今回、岡山県立大学で購入した培養細胞伸展システムは、同じメーカーではあるが改良、更新されたモデルであり、特にシリコンチャンバーの処理システムが異なるため、伸展培養の要件を再設定した。その後、伸展刺激により発現誘導された 12 の遺伝子群についてタイムコース解析、各種メカノセンサーの阻害薬による解析を行い、データの再現性について検討を行った。さらに、上記伸展培養細胞上清を血管平滑筋培養株 A-10 細胞の培養液中に添加したところ、A-10 細胞において分化相マーカー遺伝子である α SMA; α smooth muscle actin, Adra 1b; adrenoceptor α 1B, Ednr a; Endothelin receptor type A, Agtr 1a; Angiotensin II Receptor, Type 1A の発現が減少し、

増殖・遊走相マーカー遺伝子である PDGFR; platelet-derived growth factor receptor の発現が上昇することがわかった。すなわち、糸球体内皮細胞を伸展刺激して糸球体高血圧を模した刺激を与えることにより、血管平滑筋細胞を増殖・遊走相に誘導する液性因子が分泌される可能性が示唆され、CKD 病態下で見られる心腎連関を培養細胞レベルで再現できる可能性を見出した。その後、さらに詳細な解析を進める予定であったが、岩手医科大学より分譲を受けた GEN-T 細胞が生育しなくなったため、作成元の東京女子医科大学腎臓内科に分譲を依頼したが、これまでのところ分譲を受けるに至らなかった。

一方、糸球体高血圧モデルである伸展刺激を受けた GEN-T 細胞が何らかの液性因子を放出して、遠隔臓器の内皮機能を傷害する可能性の検討について、最近の研究の動向から、GEN-T 細胞由来のエクソソームが関与する可能性が浮上してきたため、エクソソーム解析を行う予定で準備を進めた。これは、伸展刺激を受けた GEN-T 細胞と刺激を受けていない同細胞の上清からエクソソーム画分を精製し、ここに含まれる RNA を網羅的に比較解析するものである。エクソソーム解析は次世代シーケンサーを使用する予定であるため、現在、別プロジェクトのサンプルを用いて次世代シーケンサーの手法についてデータ解析法も含めて習熟を図った。

さらに、*in vivo* の腎硬化症モデルとして、飲水中に L-NAME を投与した SHR ラットの腎を用いて、上記遺伝子群の発現を検討した。その結果、Wnt シグナルに関わると想定される SFRP2 遺伝子の発現が、腎硬化症と関連して大きく減少することが分かった。現在、この系についてさらに解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 入江康至	4. 巻 44
2. 論文標題 周期的伸展刺激装置を用いた慢性腎疾患の新しいin vitroモデルの研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 241-244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 井上里加子, 平松智子, 綾部誠也, 瀬戸千尋, 角田光男, 入江康至
2. 発表標題 高齢者における米麹甘酒摂取による腸内環境への影響
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松智子, 井上里加子, 川上貴代, 入江康至
2. 発表標題 2種類（BDHQ/FFFQg）の食物摂取頻度調査法による違い
3. 学会等名 第15回日本栄養改善学会中国支部学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aki Ogawa, Sayaka Yoshida, Takahito Ichi, Rikako Inoue, Aki Ogawa, Yukihiro Yoshimura, Yasuyuki Irie
2. 発表標題 Effect of malted-rice amazake on intestinal environment
3. 学会等名 Asiam Congress of Nutrition 2019 (ACN2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山鈴美、井上里加子、綾部誠也、吉村征浩、望月智子、入江康至
2. 発表標題 運動介入による腸内環境への影響
3. 学会等名 2019日本スポーツ栄養学会第6回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上里加子、平松智子、綾部誠也、瀬戸千尋、角田光男、入江康至
2. 発表標題 高齢者における米麹甘酒摂取による腸内環境への影響
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田恵、井上里加子、綾部誠也、平松智子、入江康至
2. 発表標題 県大メディカルフィットネス講座参加者の身体状況の変化とライフスキルの関連の検討
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上里加子、入江康至
2. 発表標題 高齢者における米麹甘酒摂取による腸内環境への影響
3. 学会等名 第41回臨床栄養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土井美希, 大谷優莉, 井上里加子, 吉村征浩, 平松智子, 角田光男, 瀬戸千尋, 綾部誠也, 入江康至
2. 発表標題 高齢者の低栄養における腸内細菌叢の検討
3. 学会等名 第6回日本サルコペニア・フレイル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綾部誠也, 宮崎亮, 熊原秀晃, 井上里加子, 久保田恵, 入江康至, 大山剛史, 齋藤誠二, 犬飼義秀
2. 発表標題 軽度代謝性疾患と過剰体脂肪蓄積を有する中高齢女性における客観的日常生活活動水準指標と筋量・筋力
3. 学会等名 第6回日本サルコペニア・フレイル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綾部誠也, 熊原秀晃, 久保田恵, 井上里加子, 宮崎亮, 松本希, 飯田智行, 森村和浩, 入江康至, 犬飼義秀
2. 発表標題 肥満中高齢女性の摂食行動と体動計24時間装着により客観的に評価した活動パターンと睡眠効率
3. 学会等名 第84回日本体力医学会 中国・四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山鈴美, 井上里加子, 石原彩花, 細見晃司, 朴鐘旭, 寺本千秋, 須賀朋, 黒橋佳洋, 水口賢司, 國澤純, 入江康至
2. 発表標題 重症心身障害児を含む在宅医療利用者を対象とした 米麹甘酒摂取によるBifidobacteriumの変化と便秘改善効果について
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Rikako Inoue , Aki Ogawa , Yukihiro Yoshimura , Keizo Yamabe , Yasuyuki Irie
2. 発表標題 Effect of malted-rice amazake on intestinal environment
3. 学会等名 3rd International Conference on Biologically Active Substance (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江康至
2. 発表標題 周期的伸展刺激装置を用いた慢性腎疾患の新しいin vitro モデルの研究
3. 学会等名 第9回川崎医科大学学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江康至
2. 発表標題 Viewing nutritional science from the perspective of pharmacology
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本菜瑠 , 井上里加子 , 麻野綾香 , 山辺啓三 , 小川亜紀 , 山下広美 , 吉村征浩 , 住吉和子 , 入江康至
2. 発表標題 米麹甘酒による腸内環境への影響
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川亜紀、池水彩夏、吉田早希、吉田清香、市隆人、井上里加子、津曲真弥、浅井美穂、平松智子、住吉和子、入江康至
2. 発表標題 ヒトにおける羅漢果抽出物による 食後血糖値上昇抑制作用
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上里加子、山辺啓三、小川亜紀、山下広美、吉村征浩、住吉和子、入江康至
2. 発表標題 米麹甘酒による便秘改善効果について
3. 学会等名 第51回日本栄養・食糧学会・中国・四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aki Ogawa, Sayaka Yoshida, Takahito Ichi, Rikako Inoue, Maya Tsumagari, Miho Asai, Satoko Hiramatsu, Kazuko Sumiyoshi, Yasuyuki Irie
2. 発表標題 Effect of Siraita grosvenori on postprandial blood glucose elevation in human
3. 学会等名 The 7th Asian Congress of Dietetics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上里加子、小川亜紀、吉村征浩、平松智子、綾部誠也、入江康至
2. 発表標題 サルコペニア患者の腸内細菌構成に着目した検討
3. 学会等名 日本スポーツ栄養学会第5回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aki Ogawa, Sayaka Yoshida, Takahito Ichi, Rikako Inoue, Maya Tsumagari, Miho Asai, Satoko Hiramatsu, Kazuko Sumiyoshi, Yasuyuki Irie
2. 発表標題 Effect of Siraita grosvenori on postprandial blood glucose elevation in human
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井美希, 井上里加子, 小川亜紀, 吉村征浩, 平松智子, 綾部誠也, 入江康至
2. 発表標題 サルコペニア患者の腸内細菌構成に着目した検討
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川亜紀, 吉田清香, 市隆人, 井上里加子, 津曲真弥, 浅井美穂, 平松智子, 住吉和子, 入江康至
2. 発表標題 Siraitia grosvenori suppresses glyceimic rise after loading carbohydrate in human with hyperglycemia
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rikako Inoue, Aki Ogawa, Yukihiro Yoshimura, Keizo Yamabe, Yasuyuki Irie
2. 発表標題 Effect of malted-rice amazake on intestinal environment
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Satoko Hiramatsu, Takayo Kawakami, Yasuyuki Irie, Chikako Mizote, Motohiro Fujii, Kenichi Kikumoto, Hisako Fujii
2. 発表標題	Comparison of estimated and measured body weight of homebound elderly persons who cannot be weighed using a scale
3. 学会等名	The 11th Conference on Nutrition between Nanchang, Okayama Prefectural, Sichuan and Woosong Universities (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	井上里加子, 小川亜紀, 入江康至
2. 発表標題	羅漢果抽出物の甘味成分による食後血糖値上昇抑制作用について
3. 学会等名	第39回日本臨床栄養学会総会 第38回日本臨床栄養協会総会 第15回大連合大会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	小川亜紀, 平松智子, 住吉和子, 市隆人, 入江康至
2. 発表標題	羅漢果抽出物の甘味成分による食後血糖値上昇抑制作用
3. 学会等名	第64回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	入江康至
2. 発表標題	Viewing nutritional science from the perspective of pharmacology
3. 学会等名	第72回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム
4. 発表年	2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----