

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15981

研究課題名(和文) 糖尿病におけるマクロファージによる尿細管障害とアルブミン再吸収障害の機序の解明

研究課題名(英文) the mechanism of albumin reabsorption modulated by macrophage driving proximal tubules damage in diabetic kidney

研究代表者

江里口 雅裕 (Eriguchi, Masahiro)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40572102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎尿細管および内皮細胞におけるアンジオテンシン変換酵素(ACE)発現が欠損しているが、マクロファージでのみACEを発現しているACE 10/10マウスを使用して、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルを検討した。腎内ACEの欠如は、糖尿病ACE 10/10マウスにおける糸球体肥大および糸球体過濾過を正常化した。ただし、これらのマウスは、糖尿病の野生型マウスで観察されたものと同様のメサンギウム拡張、尿細管損傷、および蛋白尿を認めた。in vivoではACEを過剰発現するマクロファージの遊走能や炎症性サイトカインの放出が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病ではマクロファージにおけるACE発現は増加しており、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病性腎臓病におけるアルブミン尿および尿細管間質性線維症の発症に重要な役割を果たしていた。

研究成果の概要(英文)：We examined streptozotocin induced diabetes model with ACE 10/10 mice lacking ACE expression in renal tubules and endothelial cells, which are the main sources of ACE expression in the kidney, but expressing ACE only in macrophages. The absence of intra-renal ACE normalized the glomerular hypertrophy and glomerular hyperfiltration in diabetic ACE 10/10 mice. However, these mice developed mesangial expansion, tubular injury, and albuminuria that were similar to that observed in diabetic wild-type mice. The studies using macrophage cell line; Raw 264.7 and mouse-ACE overexpressing plasmid confirmed that LPS-induced IL-6 and nitric oxide release from macrophages overexpressing ACE was significantly higher than those from macrophage treated with control vector. The migration ability of macrophages overexpressing ACE was also significantly higher than that of control vector-expressing cells.

研究分野：糖尿病性腎臓病

キーワード：アンジオテンシン変換酵素 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在も増え続ける透析患者数の約半数を糖尿病性腎症が占める。そのため糖尿病性腎症の進行機序の解明と新たな治療介入の開発は、医療資源上きわめて重要である。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) が糖尿病性腎臓病 (DKD) の治療の重要な因子であることはよく知られている。最近の蓄積された証拠より、免疫活性化と単球由来細胞における ACE 発現との関連を明らかになっている。

また、また、腎障害の種類によらず、マクロファージが腎尿管間質障害および線維化の進行に重要な役割を果たしている事は以前より良く知られた事実である。

従来、糖尿病性腎症の腎予後因子として重要なアルブミン尿は、糸球体内圧の上昇に伴う糸球体 (アルブミン濾過機能) 障害を反映していると解釈されていたが、原尿中の尿蛋白を尿管で再吸収することで尿蛋白量が調節されているため、尿管障害が尿蛋白と関連する報告もある。

しかし、マクロファージにおける ACE の発現 が DKD の進展に関与しているかどうかは不明のままである。

2. 研究の目的

DKD における、マクロファージに発現する ACE が糖尿病性腎症の進行に対してどのような働きがあるかを明らかにする。

3. 研究の方法

使用する ACE 10/10 マウスは ACE をマクロファージに過剰発現 (ACE タンパク発現量は wild-type マウスの 8 倍) させたマウス (Background : C57B6) である。マクロファージ以外の他臓器の ACE 発現に関して、ACE 10/10 マウスでは ACE 発現が KO されている。

この遺伝子改変マウスおよび Wild-type マウスに対して low-dose streptozocin protocol (55mg/Kg/日 5日間腹腔内投与) によって糖尿病を引き起こした糖尿病群と非糖尿病群の 2 群を 6 ヶ月間観察した後に腎臓を採取する。

観察期間中は毎月、24 時間蓄尿して、ELISA による尿中のアルブミンおよび尿管障害マーカーである尿中 Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) を測定する。また、アルブミン尿の排泄に影響を与える因子である血圧 (tail cuff 法) および糸球体濾過量 (GFR; 糸球体高血圧の評価として) を経皮的 GFR モニターを用いて毎月評価する。さらに、採取した腎臓を用いて 糖尿病性腎症による糸球体変化 (障害) の評価: PAS 染色を用いたメサンギウム領域の面積および糸球体サイズ (糸球体肥大の評価) の評価、および 糖尿病性腎症による尿管間質障害および腎内炎症性サイトカインの評価; Sirius Red 染色を用いた腎間質尿管領域の炎症細胞浸潤と線維化を評価する。

さらなるメカニズムを解明するために、in vivo および Ex-vivo の実験を行った。STZ 誘発糖尿病マウスの末梢血および腹膜マクロファージでの ACE の発現の変化を検討した。

また、ACE を過剰発現させたプラスミドおよび raw 264.7 細胞を用いてリポポリサッカリド (LPS) による炎症誘発に対するサイトカインの放出 (ELISA による測定) および細胞の遊走能を検討した。

4. 研究成果

腎内 ACE の欠損 (ACE 10/10 マウスでは ACE の主な発現部位である尿管および血管内皮細胞で ACE 発現を認めない為に、腎臓のホモジネートを用いた ACE 活性はほぼ 0 である) は、糖尿病 ACE 10/10 マウスにおける糸球体肥大および糸球体過濾過を正常化した。しかしながら、糖尿病の ACE10/10 マウスは、糖尿病の野生型マウスで観察された程度と同等のメサンギウム拡張、尿管損傷、および蛋白尿を認めた。

野生型マウスに糖尿病を誘導した後、末梢血単球および腹膜マクロファージを採取して ACE mRNA レベルを測定したところ、糖尿病の誘発後にこれらの細胞での ACE mRNA は増加していた。

さらに、マクロファージ細胞株である raw 264.7 およびマウス-ACE 過剰発現プラスミドを使用した研究では、ACE を過剰発現させたマクロファージからの LPS 誘導 IL-6 および一酸化窒素放出が、対照ベクターで処理されたマクロファージからのものよりも有意に高いことを確認した。ACE を過剰発現させたマクロファージの遊走能も、対照ベクター発現細胞の遊走能よりも有意に高かった。

我々の以前の報告では、糖尿病性腎症の腎間質尿細管障害の進展には尿細管上皮細胞に発現する ACE がその障害の進行に寄与していることを報告している。
本研究により、たとえ尿細管の ACE が発現していない環境であっても、糖尿病によりマクロファージにおける ACE の発現は増加し、STZ 誘発性 DKD におけるアルブミン尿および尿細管間質性線維症の発症に重要な役割を果たしていることを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keigo Tomita, Masahiro Eriguchi, Kumiko Torisu, Jorge F. Giani, Kenneth E. Bernstein, Kazuhiko Tsuruya, Toshiaki Nakano, Takanari Kitazono |
| 2. 発表標題 Overexpression of ACE in macrophages accelerates diabetic kidney disease |
| 3. 学会等名 American society of nephrology, kidney week (国際学会) |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|