

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590939

研究課題名（和文） 腎臓における小胞体ストレスの病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文） Pathophysiological contribution of endoplasmic reticulum stress in the kidney

研究代表者

稲城 玲子（INAGI REIKO）

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：50232509

## 研究成果の概要：

初年度に、各種腎臓病モデルラット（ネフローゼ、糸球体腎炎、急性虚血性腎不全）を用いて、糸球体や尿細管病変部において小胞体ストレス、及びその細胞応答経路（unfolded protein response: UPR）が著しく亢進していることを明らかにしてきた。そこで次年度は、それら病変部の小胞体ストレスが病態形成・進展に関与すること、さらにそれを標的とした治療戦略の可能性を明らかにする目的で、小胞体ストレス preconditioning（腎疾患誘導前に腎障害を及ぼさない少量の小胞体ストレス誘導剤、ツニカマイシンあるいはタブシガルギンを前投与）の腎保護効果を検討した。その結果、小胞体ストレス preconditioning、つまり腎毒性の無い少量のツニカマイシンあるいはタブシガルギン投与は腎病理や機能に影響を及ぼすことなく軽度のUPR（GRP78やORP150などの小胞体シャペロン発現亢進やeIF2 $\beta$ 、PERKのリン酸を介した翻訳抑制経路の活性化）を誘導した。preconditioning 4日後にThy-1腎炎を誘導すると、未処置の対照群に比し、糸球体病変（microaneurysm、糸球体の癒着や肥大、メサンギウム細胞増殖）や腎機能低下（蛋白尿）が著明に軽減した。その際、preconditioning 群では、Thy-1腎炎で誘導される過剰なUPR亢進（小胞体シャペロン発現誘導や翻訳抑制）が著明に抑制されており、小胞体ストレス preconditioning によるbasal UPRの軽度惹起が糸球体障害に対して保護的に働くことが明らかとなった。これら成果によって、basal UPRの惹起は腎障害時の腎臓構成細胞の小胞体機能維持、ひいては腎保護効果を有することが示され、腎病態進展時に生じる過剰なUPR変動を制御することによる治療効果の可能性が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	66,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	39,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	105,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：Endoplasmic reticulum stress preconditioning、Unfolded protein response、小胞体シャペロン、翻訳制御、Thy-1腎炎、慢性腎臓病、糸球体障害、尿細管障害

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)腎疾患、及びその治療薬の現状

全世界先進国において、生活習慣病の増加や高齢化に伴い腎疾患患者数は急増しており、近い将来、それら患者が腎不全により血液透析へ移行することが予測されている。これは、社会経済の低迷や国民医療費の破綻を招き、活力ある高齢化社会を構築する上で解決すべき重要な課題とされている。しかし、現時点では、腎臓特異的治療薬の開発は進んでいない。

### (2)新規腎臓特異的遺伝子発見から小胞体ストレスへの発展

我々はこれまでに、新規腎臓特異的セリンプロテアーゼインヒビター“メグシン”を単離同定してきた (J Clin Invest 102:1998)。メグシンは、メサングウム細胞機能維持を担う分子で、糸球体腎炎発症・進展に深く関与する (J Clin Invest 102:1998, J Am Soc Nephrol 10:1999, Biochem Biophys Res Commun 286:2001, J Clin Invest 109:2002)。

さらに予想されない興味ある成果として、メグシン高発現ラットでは、シートに富んだメグシン分子が腎臓細胞(糸球体上皮細胞や尿細管上皮細胞)の粗面小胞体内で凝集・蓄積し、重度の蛋白尿を伴う腎不全を発症することを見いだした (J Am Soc Nephrol 16:2005)。さらに、凝集メグシンが蓄積した小胞体では小胞体機能異常(小胞体ストレス)が強く誘導され、病態形成に寄与していた(Kidney Int 68:2005)。

### (3)小胞体ストレスと腎疾患

近年、蛋白変性疾患 (conformational diseases) と言われる疾患カテゴリーが知られるようになってきた。蛋白変性疾患とは、合成された蛋白が何らかの原因で細胞内、特に小胞体内に凝集・蓄積することで生じる疾患で、神経変性疾患、アミロイド、一部の糖尿病、セルピノパシーと呼ばれる変異セルピン沈着症などが分類される。小胞体ストレスは蛋白変性疾患に共通の病因論として幅広い領域において注目されている。小胞体ストレス状態の細胞は、それを回避するために小胞体ストレス応答経路 (unfolded protein response: UPR, 分子シャペロン発現、蛋白合成抑制) が活性化されるが、過剰な負荷がかかると細胞死に至る。そうした機構に携わる分子を標的として新規の蛋白変性疾患治療戦略が提唱されている。

腎疾患においては小胞体ストレスがいかなる関与を示すかについての研究はほとん

ど皆無である。これまでのところ、国外では補体による糸球体上皮細胞障害に小胞体ストレスが関与すること (J Biol Chem, 2002)、国内では、我々が小胞体ストレスによる糸球体足細胞機能不全が蛋白尿の原因になること (J Am Soc Nephrol 16:2005, Kidney Int 68:2005)、蛋白尿による尿細管上皮細胞死に小胞体ストレスが関与すること (Kidney Int 70:2005) などを継続的に報告してきた。腎疾患における新しい病因論として小胞体ストレスの意義、それに基づく治療法概念の確立が見込まれており、この領域の研究報告が年々増えている。

## 2. 研究の目的

(1) 各種腎疾患モデル動物における小胞体ストレスの動態を分子レベルで詳細に比較検討する。

(2) 小胞体ストレス改善が腎病態を軽減できるか否かを検討する。

上記を総括して、小胞体ストレスの腎臓病における病因論の位置づけを明確にする。

## 3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス応答 (UPR) 経路、つまり小胞体シャペロン (ORP150, GRP78, GRP94)、それらの転写因子 (IRE1, ATF6, CHOP)、蛋白翻訳抑制因子 (リン酸化 eIF2 $\alpha$ )、細胞死誘導分子 (caspase12, PERK) などの発現変動を各種腎疾患ラットの腎組織において比較検討する。

解析する腎疾患モデルラットとしては、糸球体障害モデル (Thy-1 腎炎ラット)、急性腎不全モデル (虚血再灌流ラット)、慢性腎不全モデル (5/6 腎摘ラット)、ネフローゼモデル (puromycin 腎症ラット)、糖尿病性腎症モデル (STZ 投与ラット) などを用いる。

(2) 化学分子シャペロン (4-PBA) あるいは小胞体ストレスプレコンディショニング (小胞体ストレス誘導剤を微量前投与) によって、小胞体ストレスを改善することで、腎病変が軽減するか否かを検討する。

## 4. 研究成果

(1) ネフローゼモデル (puromycin 腎症ラット) や糸球体障害モデル (Thy-1 腎炎ラット)

において、小胞体ストレス応答性のシャペロン (ORP150, GRP78) の発現が、puromycin 腎症ラットでは尿細管に、Thy-1 腎炎ラットでは糸球体に誘導されることを見いだした。さらに急性腎不全モデルである虚血再灌流ラットにおいても同様に、病変部の尿細管において ORP150, GRP78 の発現亢進が認められた。これらのことから、尿細管や糸球体の障害時に小胞体ストレスを伴う可能性が示された。

(2)Thy-1 腎炎ラットにおける小胞体ストレスの経時変化を詳細に検討したところ、小胞体ストレス応答性シャペロン分子の発現は糸球体障害の程度に伴って過剰に亢進することや、小胞体ストレス回避機構の一つである蛋白翻訳抑制因子 (eIF2, PERK) が著明に活性化(リン酸化)していた。つまり、Thy-1 腎炎の病態進行と共に、小胞体ストレス応答経路が過剰に誘導されていることが示された。

(3)腎病変部の小胞体ストレスが病態形成・進展に病因として関与すること、さらにそれを標的とした治療戦略の可能性を明らかにする目的で、小胞体ストレスプレコンディショニング(腎疾患誘導前に腎障害を及ぼさない少量の小胞体ストレス誘導剤、ツニカマイシンあるいはタプシガルギンを前投与)が腎保護効果を有するか否かを検討した。その結果、プレコンディショニング、つまり腎毒性の無い少量のツニカマイシンあるいはタプシガルギン投与は腎病理や機能に影響を及ぼさないが、軽度の UPR (GRP78 や ORP150 などの小胞体シャペロン発現亢進や eIF2, PERK のリン酸を介した翻訳抑制経路の活性化)を誘導した。

プレコンディショニング 4 日後に Thy-1 腎炎を誘導すると、未処置の対照群に比し、糸球体病変 (microaneurysm、糸球体の癒着や肥大、メサンギウム細胞増殖) や腎機能低下 (蛋白尿) が著明に軽減した。その際、プレコンディショニング群では、Thy-1 腎炎で誘導される過剰な UPR 亢進 (小胞体シャペロン発現誘導や翻訳抑制) が著明に抑制されており、小胞体ストレスプレコンディショニングによる basal UPR の軽度惹起が糸球体障害に対して保護的に働くことが明らかとなった。

これら成果によって、basal UPR の惹起は腎障害時の腎臓構成細胞の小胞体機能維持、ひいては腎保護効果を有することが示され、腎病態進展時に生じる過剰な UPR 変動を制御することによる治療効果の可能性が示唆された。

## 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 )( 英文国際誌 計 16 件 )

1. Inagi R: Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. **Nephron Exp Nephrol** “ in press ” 査読有
2. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R: Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Am J Physiol Renal Physiol** “ in press ” 査読有
3. Eto N, Miyagishi Y, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. **Am J Pathol** “ in press ” 査読有
4. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Metallothionein is up-regulated by hypoxia and stabilizes HIF in the kidney. **Kidney Int** “ in press ” 査読有
5. Nishi H, Inagi R, Kato H, Tanemoto M, Kojima I, Son D, Fujita T, Nangaku M: Hemoglobin is expressed as anti-oxidant factor by mesangial cell. **J Am Soc Nephrol** 19, 1500-1508, 2008. 査読有
6. Inagi R, Kumagai T, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol** 19, 915-922, 2008. 査読有
7. Son D, Kojima I, Inagi R, Matsumoto M, Fujita T, Nangaku M: Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn-SOD - a proteomic analysis. **Am J Physiol Renal Physiol** 294, F62-72, 2008. 査読有
8. Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Tanaka T, Sassa R, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M: Albumin suppresses vascular endothelial growth factor via alteration of hypoxia-inducible factor / hypoxia-responsive element pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 367, 305-310, 2008. 査読有
9. Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T: Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease. **Nephron Exp Nephrol** 110, e1-7, 2008. 査読有

10. Kumagai T, Nangaku M, Inagi R: Pathophysiological role of the glyoxalase system in renal hypoxic injury. *Ann N Y Acad Sci* 1126, 265-267, 2008. 査読有
  11. Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T: Angiotensin-induced hypoxia in the kidney: functional and structural changes of the renal circulation. *Adv Exp Med Biol* 618, 85-99, 2007. 査読有
  12. Inagi R, Izuhara Y, Tominaga N, Nangaku M, Kurokawa K, Miyata T: Establishment of a sandwich ELISA for human megsin, a kidney-specific serine protease inhibitor. *Nephrol Dial Transplant* 22, 3311-3317, 2007. 査読有
  13. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, Ohneda O, Takeda N, Sata M, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Protective role of HIF-2 $\alpha$  against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 18, 1218-1226, 2007. 査読有
  14. Eto N, Wada T, Inagi R, Takano H, Shimizu A, Kato H, Kurihara H, Kawachi H, Shankland SJ, Fujita T, Nangaku M: Darbepoetin protects podocytes by preservation of the cytoskeleton and nephrin distribution. *Kidney Int* 72, 455-463, 2007. 査読有
  15. Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Sassa R, Adler S, Eto N, Kato H, Fujita T, Nangaku M: Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 928-934, 2007. 査読有
  16. Shao J, Nangaku M, Inagi R, Kato H, Miyata T, Matsusaka T, Noiri E, Fujita T: Receptor-independent intracellular radical scavenging activity of an angiotensin II receptor blocker. *J Hypertens* 25, 1643-1649, 2007. 査読有
- [学会発表](国際学会 計23件)
1. Nishi H, et al. Transgenic Overexpression of Cytochrome b5 Improves the Kidney Ischemia/Reperfusion Injury Via Amelioration of Oxidative Stress. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
  2. Kawakami T, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Autophagy in Renal Proximal Tubular Cells. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
  3. Inagi R, et al. Glyoxalase I Relieves Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Hypoxia. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
  4. Kojima I, et al. Microarray Analysis of Chronic Hypoxic Kidney Revealed Activation of HIF by Metallothionein. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
  5. Inagi R. Organ protective effects of tunicamycin as an endoplasmic reticulum stress inducer. World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II). October 3-5, 2008. Nurnberg, Germany
  6. Inagi R, et al. Glyoxalase I overexpression lowers hypoxia-induced oxidative stress and ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in the rat. International Society of Oxygen Transport to Tissues. August 3-7, 2008. Sapporo, Japan
  7. Inagi R, et al. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates anti-Thy1 glomerulonephritis in rats. Congress of ERA/EDTA. May 11-14, 2008. Stockholm, Sweden
  8. Kumagai T, et al. Glyoxalase I overexpression lowers oxidative stress and ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in the rat. Keystone Symposium. January 15-20, 2008. Vancouver, Canada
  9. Kojima I, et al. Microarray analysis of chronic hypoxic kidney revealed activation of HIF by metallothionein. Keystone Symposium. January 15-20, 2008. Vancouver, Canada
  10. Nangaku M, et al. A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. Keystone Symposium. January 15-20, 2008. Vancouver, Canada
  11. Eto N, et al. MAP3 kinase 6 mediates VEGF expression and participates in tumorigenesis and angiogenesis. Keystone Symposium. January 15-20, 2008. Vancouver, Canada
  12. Son D, et al. Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn-SOD - a proteomic

- analysis. Keystone Symposium. January 15-20, 2008. Vancouver, Canada
13. Son D, et al. Chronic Hypoxia Aggravates Renal Injury Via Suppression of Cu/Zn -SOD – A Proteomic Analysis. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  14. Inagi R, et al. Preconditioning of endoplasmic reticulum (ER) stress ameliorated anti-Thy1 glomerulonephritis of rats. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  15. Kawakami T, et al. Indoxyl Sulfate Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Cell Injury in Human Proximal Tubular Cells. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  16. Kumagai T, et al. Glyoxalase I Overexpression Lowers Oxidative Stress and Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  17. Eto N, et al. Darbeopetin Ameliorates Urinary Protein Excretion by Preservation of the Cytoskeleton and Nephtrin Distribution in the Podocytes. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  18. Eto N, et al. Suppression of MAP3 Kinase 6 Mediates Anti-Angiogenic and Tumor-Suppressive Effects Via VEGF Repression. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  19. Ohtomo S, et al. Cloning and Characterization of Novel Gene, PLEP, in Human Glomerular Cells. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  20. Nishi H, et al. Cytoglobin, a Novel Member of the Globin Family, Protects the Kidney Against Oxidative Stress under Ischemic Conditions. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
  21. Inagi R, et al. Involvement of endoplasmic reticulum(ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. World Congress of Nephrology2007. April 21 -25, 2007. Rio de Janeiro, Brazil
  22. Eto N, et al. Darbeopetin protects podocytes by preservation of the cytoskeleton and nephtrin distribution. World Congress of Nephrology2007. April 21 -25, 2007. Rio de Janeiro, Brazil
  23. Inagi R, et al. A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by megin overexpression in the RAGE/iNOS transgenic mice. World Congress of Nephrology2007. April 21 -25, 2007. Rio de Janeiro, Brazil
- 〔図書〕(計3件)
1. 稲城玲子、南学正臣. 医薬ジャーナル. C K Dに伴う貧血 印刷中
  2. Kumagai T and Inagi R: **Annals of the New York Academy of Science**. The Maillard reaction Recent Advances in food and biomedical sciences. 2008, pp337.
  3. 稲城玲子、南学正臣. 南山堂. 薬局: 病気と薬の説明ガイド2007. 2007, pp1327
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
稲城 玲子 (INAGI REIKO)  
東京大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号: 50232509
  - (2)研究分担者  
南学 正臣 (NANGAKU MASAOMI)  
東京大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号: 90311620  
和田 健彦 (WADA TAKEHIKO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90447409