

平成21年5月1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890121

研究課題名（和文） C/EBP δ 発現の腎障害進展に果たす役割に関する研究研究課題名（英文） The role of C/EBP δ expression during the progressive renal injury.

研究代表者

川田 典孝 (KAWADA NORITAKA)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80437326

研究成果の概要：ステロイド治療により組織線維化・硬化が進展することが知られているが、その機序についての知見は限られている。本研究では、培養メサングウム細胞へのステロイド負荷が、転写因子である C/EBP δ の発現と、転写制御領域に C/EBP 結合配列を持つ Lysyl oxidase (LOX) 発現を誘導することを明らかとした。LOX はコラーゲン分子のクロスリンキングを促進することで、線維化の進展に関与することが知られており、本研究で得られた成果はステロイド治療による組織線維化、硬化進展機序の一端を明らかとすることで今後の治療への応用につながる可能性を持ち、重要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	0	1,330,000
2009年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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：C/EBP, ステロイド, Lysyl oxidase, 腎線維化

1. 研究開始当初の背景

C/EBP δ は6種類のアイソフォームが存在する C/EBP family のひとつである (JCB. 2004;93:844-56)。C/EBP family は leucine zipper 蛋白に属する転写因子群で、C/EBP family 同士でヘテロ2量体を形成、または細胞周期制御蛋白と結合することで細胞の分化、増殖、アポトーシスに関与する可能性が

示唆されている。最近の報告から、C/EBP δ は脂肪細胞や肺上皮細胞への分化、がん細胞の増殖停止や乳腺上皮細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなりつつある (Development 2005;132:4675-85)。

培養脂肪細胞では、ステロイドが C/EBP 発現誘導を介して、末梢組織でのグルココルチコイド代謝を制御する酵素である 11 β -

hydroxysteriod dehydrogenase1(11 β -HSD1)と11 β -hydroxysteriod dehydrogenase2(11 β -HSD2)の発現を制御することが知られている。しかしながら、腎細胞へのステロイドの直接作用に関する知見は限られている。

興味深いことに、糸球体腎炎や腎間質病変部位ではC/EBP δ (mRNAおよび蛋白)が誘導される(J Am Soc Nephrol. 2004;15:2383-90)。しかしながら、C/EBP δ が腎炎の進展因子であるのか抑制因子であるのかについては未だ明確な答えが得られていない。

2. 研究の目的

本研究では以下の3項目を明らかとすることを目的とする。

(1) 腎細胞へのステロイド負荷によるC/EBP発現誘導の検証。

(2) 腎細胞の炎症および線維化関連遺伝子群の発現へのステロイド負荷の影響。

ステロイド治療では、抗炎症作用や抗線維化作用が期待されるが、既存の線維化病変に対しては、むしろ線維化や硬化を促進する側面を持つことが知られている。この現象の分子生化学的機序にアプローチすることを目的とする。

(3) ステロイドによるLysyl oxidase(LOX)発現誘導へのC/EBP δ の関与、およびLOX発現抑制作用をもつ薬剤についての検討。

3. 研究の方法

(1) 腎糸球体メサンギウム細胞、および腎線維芽細胞のC/EBP発現に対するステロイドの効果の検討。

メサンギウム細胞については、ラットメサンギウム細胞のプライマリーカルチャーを作成、腎線維芽細胞については、NRK-49F細胞を用いた。細胞を無血清培地で24時間培養後、ステロイドとして、ミネラルコルチコイド作用を持たないとされているデキサメサゾン(10⁻⁷, 10⁻⁸M)を負荷し、C/EBP mRNA発現をrealtime RT-PCR法で、蛋白発現を核分画のウエスタンブロッティング法で検討した。

(2) 腎糸球体メサンギウム細胞の炎症および線維化関連遺伝子群の発現に対するステロイドの効果の検討。

培養メサンギウム細胞を無血清培地で24時間培養後、デキサメサゾン(10⁻⁷M)を負荷し、炎症および線維化関連遺伝子群の発現をrealtime RT-PCR法およびウエスタンブロッティング法で検討した。

(3) ステロイドのLOX誘導作用に対する、SiRNAを用いたC/EBP δ 発現抑制の効果の

検討。

リポフェクタミン2000を用いてC/EBP δ をターゲットとするSiRNAを導入した培養メサンギウム細胞にデキサメサゾン(10⁻⁷M)を負荷し、研究(2)で認められたデキサメサゾンによるLOX誘導のC/EBP δ 依存性について検討した。

(4) ステロイドのLOX誘導作用に対する、各種薬剤(スピロラクトン・ピオグリダゾン)の効果の検討。

これまでに、抗線維化効果を持つことが報告された薬剤のなかから2種類(スピロラクトン・ピオグリダゾン)を選択し、薬剤24時間前処置後の培養メサンギウム細胞にデキサメサゾン(10⁻⁶M)を負荷し、研究(2)で認められたデキサメサゾンによるLOX誘導への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎細胞へのステロイド負荷によるC/EBP発現誘導の検証。

培養MSCではデキサメサゾン(DEX, 10⁻⁷M)負荷により、C/EBP δ mRNAの誘導を認めた(図1:2時間後+1200%, 8時間後+890%, 24時間後+540%)。デキサメサゾンによるC/EBP δ 発現誘導は核蛋白分画を用いたウエスタンブロッティング法にても認められた(図2)。

Figure 1. Dexamethasone (10⁻⁷M) induces C/EBP delta mRNA in rat cultured mesangial cells.

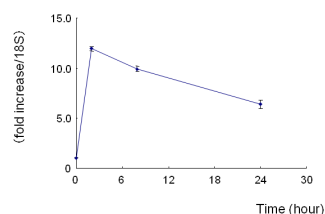
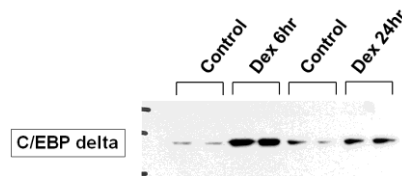


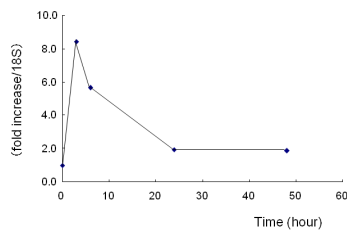
Figure 2. Dexamethasone (10⁻⁷M) induces C/EBP delta protein in nuclear fraction of rat cultured mesangial cells.



NRK-49F細胞ではデキサメサゾン(DEX, 10⁻⁸M)負荷により、C/EBP δ mRNAの誘導を認めた(図3:3時間後+740%, 6時間後+470%,

24 時間後+100%)。

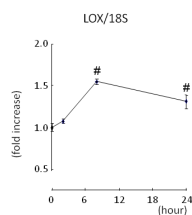
Figure 3. Dexamethasone (10^{-8} M) induces C/EBP delta mRNA in rat cultured NRK-49F cells.



(2) 腎細胞の炎症および線維化関連遺伝子群の発現へのステロイド負荷の影響。

培養 MSC への DEX (10^{-7} M, 6 時間) 負荷により、LOX と HSD1 mRNA の誘導 (LOX: +35%, HSD1: +20%, $p < 0.05$ vs Veh; $n=4$)、TGFbeta, Collagen type IIIA と HSD2 mRNA の抑制 (TGFbeta: -23%, Collagen type IIIA: -24%, HSD2: -26%, $p < 0.05$ vs Veh; $n=4$) を認めた (図 4)。Smooth muscle alpha-actin mRNA は影響を受けなかった。ウエスタンブロッティング法により、prepro LOX および active LOX 蛋白がともにデキサメサゾンで誘導されることが明らかとなった (図 5)。NRK-49F 細胞への DEX (10^{-8} M, 6 時間) 負荷により、LOX mRNA の誘導 (LOX: +40%, $p < 0.05$ vs Veh; $n=4$)、TGFbeta mRNA と Collagen type IIIA mRNA の抑制 (TGFbeta: -28%, Collagen type IIIA: -15%, $p < 0.05$ vs Veh; $n=4$) を認めた。BMP-1 と Smooth muscle alpha-actin mRNA は影響を受けなかった。

Figure 4. Dexamethasone (10^{-7} M) induces LOX mRNAs in cultured mesangial cells

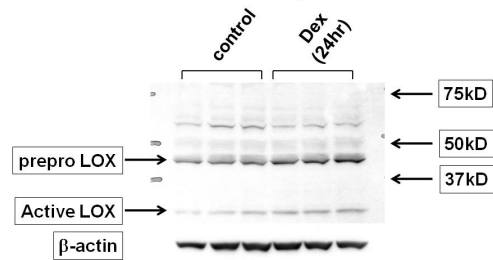


Mean ± SEM values
#: $p < 0.05$ ($n=6$)

(3) ステロイドの LOX 誘導作用に対する、SiRNA を用いた C/EBPdelta 発現抑制の効果の検討。

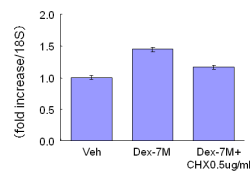
DEX による C/EBP δ と LOX mRNA 発現誘導がステロイドホルモンレセプターを介した直接作用であるか、蛋白合成を介した間接作用であるかを検討するため、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキサミド (CHX: 0.5 μ g/ml) 処置

Figure 5. Dexamethasone (10^{-6} M) induces LOX protein in cultured mesangial cells



培養メサンギウム細胞に DEX (10^{-7} M) を負荷した。CHX は DEX による C/EBP δ mRNA 発現誘導を抑制しなかったが、LOX mRNA 発現誘導を抑制した (図 6 : LOX mRNA: -20%, $p < 0.05$ vs DEX; $n=4$)。

Figure 6. Cyclohexamide blunts the induction of LOX mRNAs by Dexamethasone (10^{-7} M) in cultured mesangial cells

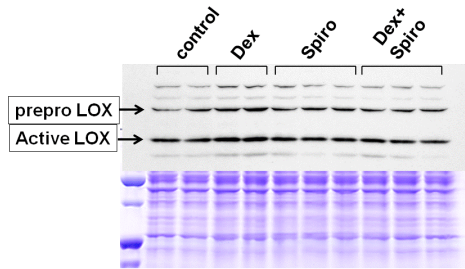


DEX による LOX mRNA 発現誘導が C/EBP δ 依存性であるかどうかを検討するため、培養 MSC への C/EBPdelta の SiRNA 導入をおこなった。SiRNA 導入により、DEX による C/EBP δ mRNA 誘導の抑制が可能であった (-53%, $p < 0.01$ vs DEX)。しかしながら、C/EBPdelta 発現抑制により LOX mRNA の発現抑制は認められなかった。C/EBPdelta mRNA のノックダウンが不十分であった可能性と、LOX mRNA の発現抑制には、他の C/EBP family、特に C/EBP β が共同して関与する可能性が考えられた。

(4) ステロイドの LOX 誘導作用に対する、各種薬剤 (スピロラクトン・ピオグリダゾン) の効果の検討。

培養 MSC に対して、DEX 負荷 24 時間前より各種薬剤の前処置を行った後、DEX による LOX 蛋白誘導をウエスタンブロッティング法で検討した。スピロラクトンは DEX による prepro LOX 蛋白、active LOX 蛋白の発現を低下させた (図 7)。ピオグリダゾンは DEX による LOX 蛋白の誘導には無効であった。このことから、スピロラクトンが LOX の発現抑制を介して抗線維化効果を発現する可能性が示唆された。

Figure 7. Spironolactone blunts the induction of LOX mRNAs by Dexamethasone (10^{-6} M) in cultured mesangial cells



LOX はコラーゲン分子のクロスリンキングを促進することで、線維化の進展に関与することが知られており、臨床的に認められるステロイド投与に伴う臓器線維化・硬化の進展を説明する上で重要と考えられる。本研究から、ステロイドによる LOX の誘導がスピロノラクトンにより抑制される可能性が示唆された。この結果は、ステロイドとスピロノラクトンの併用療法の有用性を分子生化学的に説明する可能性を持ち、重要である。SiRNA を用いた C/EBP δ mRNA の抑制ではステロイド負荷による LOX 誘導は抑制されず、LOX mRNA が C/EBP δ 単独で誘導される可能性は否定的であった。

本研究で得られた成果はステロイド治療による組織線維化、硬化進展機序の一端を明らかとすることで今後の治療への応用につながる可能性を持ち、重要である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川田 典孝 (KAWADA NORITAKA)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80437326

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし