

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17726

研究課題名（和文）内皮機能障害による腎間質線維化の分子機序の解明

研究課題名（英文）Nitric oxide attenuates renal interstitial fibrosis

研究代表者

角谷 裕之（Kadoya, Hiroyuki）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70509265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病や加齢、高血圧などの生活習慣病には内皮機能障害が付随し、慢性腎臓病の基盤病態である。一方で末期腎不全に至る共通経路として腎臓の間質に線維化が生じる。内皮機能障害と腎臓の間質線維化にどのような相互作用があるかは不明であった。本研究で内皮細胞から産生される一酸化窒素(NO)の経路が線維化シグナルとして重要であるwnt/ β -catenin経路を抑制的に制御していることが判明した。さらにNO産生障害により腎臓の間質に線維化を認めたが、NO経路の下流に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化薬を投与することで間質線維化を軽減できた。内皮保護は腎臓間質線維化進展を抑制できることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病である糖尿病、高血圧には、内皮機能障害が随伴しており、慢性腎臓病進展機序にも一定の役割を担っていることが示唆されている。内皮機能保持と腎保護効果については種々報告されているが、その詳細な分子メカニズムについては十分検討されていない。本研究では、その分子機序を証明するとともに内皮NOS-NO経路を活性化（sGC活性化薬）することによる治療介入の意義を提示する事ができる。他臓器で臨床的効果も期待されているsGC活性化薬が、腎間質線維化に対する抑制効果を発揮すれば、新規治療法開発の端緒を開き、医療への貢献を果たす可能性があり大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：Renal interstitial fibrosis is a final common pathway in progressive renal disease. It is also well known that endothelial dysfunction is associated with chronic kidney disease. We showed that β -catenin levels in the cytoplasm were decreased by activation of the NO-PKG pathway. Renal fibrotic changes were not observed in wild type (WT)-lithium (Li; glycogen synthase kinase-3 inhibitor) mice. However, renal interstitial fibrosis developed in endothelial nitric oxide synthase knockout (eNOSKO)-Li mice compared with WT-Li mice. β -catenin protein expression was remarkably increased in eNOSKO-Li mice. These changes were suppressed in eNOSKO-Li/Bay (soluble guanylate cyclase [sGC] stimulator) mice. Activation of eNOS signaling could be protective against renal interstitial fibrosis. These findings indicate the potential therapeutic utility of eNOS-NO-PKG stimulation for the amelioration of renal fibrosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎間質線維化 一酸化窒素(NO) 内皮機能障害 可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC) wnt/ β -catenin eNOS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

本邦において高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病は、慢性腎臓病（CKD；Chronic Kidney Disease）の主要な原疾患であり近年、増加の一途をたどっている。さらに末期腎不全患者も同様に増加傾向にあり、現在32万人余が透析療法を余儀なくされている。これに要する医療費は1兆5000億円を超えており、腎臓病の病態解明と有効な治療法開発は喫緊の課題である。CKDの主要原疾患は高血圧、糖尿病、加齢など多岐に渡るが、どの病態においても共通して内皮機能障害を随伴している。我々は各種疾患モデルで、内皮障害が腎症、特に糸球体障害の発症・進展に関与することを明らかにしてきた（Lab Invest. 2016、J Am Soc Nephrol. 2013、Diabetologia. 2010、Am J Physiol Renal Physiol. 2005）。内皮機能として内皮一酸化窒素合成酵素（eNOS）の役割は重要であり、eNOS蛋白発現量の低下やeNOS uncouplingなどの機能異常により一酸化窒素（NO）産生低下が惹起される。私は、eNOS-NO経路の破綻は、腹膜線維化を促進することを報告しており、内皮機能と臓器線維化には一定の関連性があることが示唆される。

これまでにeNOS-NO経路と腎間質線維化との関連性を検討した研究はいくつか報告されている。NOの産生抑制（L-NAME、ADMA投与）は、間質線維化を増悪させる。一方で、NOシグナルの増強（Arginine、DDAHの投与）は、間質線維化を軽減させることが報告されている。これらの報告は、腎障害モデルにおいてのみ血管内皮機能障害（NO産生障害）は腎障害促進因子となり、NO産生能保持がその抑制因子となることを検討しているものであり、正常血管内皮が間質線維化を抑制的に制御しているかどうかは不明であり、またその詳細な分子メカニズムの解明も十分でない。

近年、Wntの過剰発現は肺、肝臓などの臓器で線維化を来すことが報告され、Wnt/ β -catenin経路活性化が線維化の分子メカニズムとして注目されている。Wntは分泌性糖タンパク質で、Frizzled受容体に結合する。この結合によって転写促進因子として機能する β -cateninはglycogen synthase kinase-3 β （GSK-3 β ）からのリン酸化から免れ、フリーの β -cateninが細胞質内から核内へ移行し、分化、細胞増殖に関与する。加齢による組織線維化にWnt/ β -catenin経路活性化が関与しており、我々は、抗老化蛋白であるklothoがWnt/ β -catenin経路抑制を介して腎間質線維化を軽減できることを報告している。すなわち、Wnt/ β -catenin経路を制御することで間質線維化進展を抑制できると考えられる。以上の様に進行性腎障害・線維化には、腎内血管内皮障害とWnt- β -catenin経路活性化が関与するが、両者のクロストークの分子実態は不明である。eNOS-NO経路下流に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）活性化薬は、難治性肺高血圧患者へ臨床応用されており、腎線維化抑制へのdrug relocationも期待できる。さらに近年、がん領域の探索的研究においてNO下流シグナルであるsGC/cGMP-dependent protein kinase（PKG）活性化が β -catenin経路を抑制すると報告されている。しかしながら、腎間質線維化機序におけるWnt/ β -catenin経路とeNOS/NO経路破綻との相互作用については不明である。

2. 研究の目的

本研究は「内皮NO/sGC/PKGシグナル伝達経路がWnt/ β -catenin経路を抑制的に制御しており、本経路の破綻が腎間質線維化を促進する」と仮説を立て、その検証を目的とする。正常内皮細胞

が恒常的に発現・産生するNOS/NO/cGMP経路とWnt/ β -catenin経路の分子クロストークの実態を解明し、CKDにおける破綻機序の解明を目標とする。具体的には以下の3課題解明を目的とする。

- 1) Wnt/ β -catenin経路活性化を介した腎間質線維化への内皮由来NOの役割を解明する
- 2) eNOS/NO経路活性化による腎間質線維化抑制効果を検討する
- 3) eNOS/NO/cGMP/PKG 経路と Wnt- β catenin 経路クロストークの分子実態を解明する

3. 研究の方法

1. 間質線維化におけるeNOS/NO/cGMP/PKG経路とWnt- β catenin経路の関与の解析

(a) 10週齢雄性の野生型 (WT; C57Bl6/j) マウス、eNOS欠損 (eNOSKO) マウスを用いる。

β -cateninはGSK-3 β によりリン酸化され、ユビキチン化され分解される。GSK-3 β 阻害薬として炭酸リチウム (LiCl) を使用する。LiClは中毒域を回避し少量投与する。また、eNOS/NOの下流に存在するsGC刺激薬として、Bay41-2272 (10 mg/kg/day) 腹腔内投与群も作成する。(1) WT-Vehicle、(2) WT-LiCl、(3) WT-LiCl/Bay、(4) eNOSKO-Vehicle、(5) eNOSKO-LiCl、(6) eNOSKO-LiCl/Bay群を作成し、4週間の薬剤介入後に屠殺し腎機能、組織変化を検討する。間質線維化はMasson trichrome、sirius red染色で評価し、各種線維化マーカー (TGF- β 、CTGF) をmRNAレベルで評価する。 β -cateninの発現量は Western blot (WB) 法で解析し、発現部位の評価は免疫染色で評価する。 β -catenin下流のマーカーであるWisp-1、cMycなどの発現量はmRNAレベルで評価する。

(b) 腎間質線維化モデルである一側尿管結紮 (UUO) を行い、(1) WT-Sham、(2) WT-UUO、(3) WT-UUO/Bay、(4) eNOSKO-Sham、(5) eNOSKO-UUO、(6) eNOSKO-UUO/Bay群を作成する。UUO後、2週間経過した時点で腎機能、腎組織学的変化を検討する。間質線維化はMasson trichrome、sirius red染色で評価し、各種線維化マーカーをmRNAレベルで評価する。 β -cateninの発現量および β -catenin下流遺伝子の発現量は上記1(a)実験同様に行う。

2. eNOS/NO/cGMP/PKG経路とWnt- β catenin経路クロストークの分子実態の解明

COS細胞または、ヒト近位尿細管培養細胞を用いる。GSK-3 β をLiCl (20 mM) 投与で阻害した状態で、PKG inducerであるmifepristoneと8Br-cGMP (100 μ M) でsGC/PKG経路を活性化し、 β -cateninのリン酸化、蛋白半減期をWBで検討する。また、ユビキチン・プロテアソームをMG-132 (Proteasome inhibitor ; 10 μ M) で阻害することで β -cateninの発現量変化をWBで検討する。また、 β -catenin蛋白リン酸化部位特定のため各種リン酸化抗体を用いてWBで評価を行う。

4. 研究成果

1.(a)まず、はじめに実際に尿細管間質領域に線維化が生じているかどうかをMasson trichrome染色で評価した。LiCl投与によりWTマウスの尿細管間質領域に線維化は全く生じていなかった。しかしながら、LiCl投与によりeNOSKOマウスの尿細管間質領域には顕著な線維化が生じていた。また、同時に尿細管は一部萎縮し、尿細管障害を認めた。pro-fibrotic geneとしてCTGF、TGF- β のmRNAレベルでの発現量を評価したところ、WT-LiCl群ではこれらの発現量は増加していなかったが、eNOSKO-LiCl群で顕著に増加していた。これら一連の変化は、Bay41-2272投与により顕著に改善した (図1)。さらに線維化進展にWnt/ β -catenin経路が関与しているかどうか評価を行った。まず、 β -cateninの発現量をWBで解析したところ、WT-LiCl群ではWT-Vehicle群と比較して

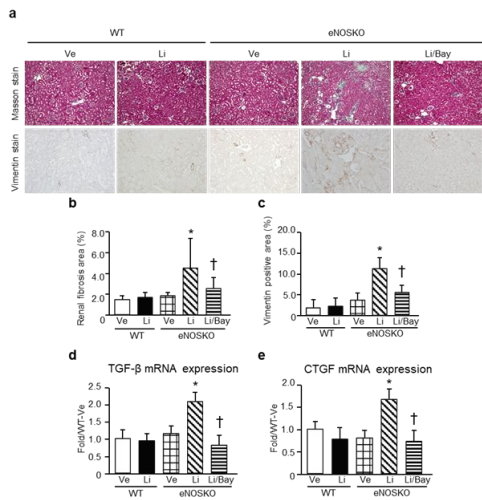


図1. LiCl投与による尿細管間質の線維化評価

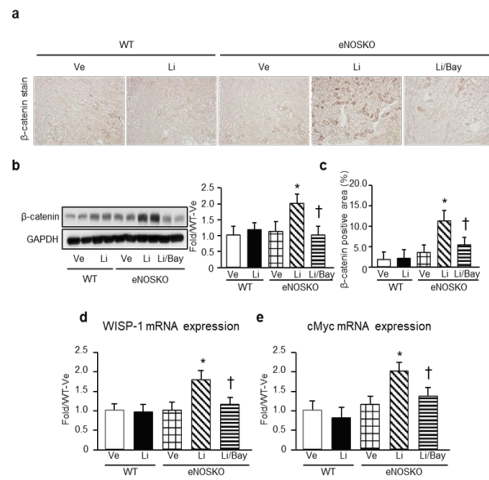


図2. LiCl投与後のβ-catenin発現量

発現量の増加を認めなかったが、eNOSKO-LiCl群においては、WT-LiCl群と比較して発現量の有意な増加を認めた。さらにβ-cateninの発現はどの細胞で増加しているかどうかを免疫染色法で評価したところ、尿細管細胞においてβ-cateninの染色性が有意に増加していた。さらに、β-catenin下流のマーカーであるWisp-1、cMycなどの発現量をmRNAレベルで評価したところ、WT-LiCl群ではWT-Vehicle群と比較して発現量の増加を認めなかったが、eNOSKO-LiCl群においては、WT-LiCl群と比較して発現量の有意な増加を認めた。これら一連の変化は、Bay41-2272投与により顕著に改善した (図2)。

1. (b) つぎに腎間質線維化モデルを作成し、(a)と同様の変化が起こっているかどうかを検討

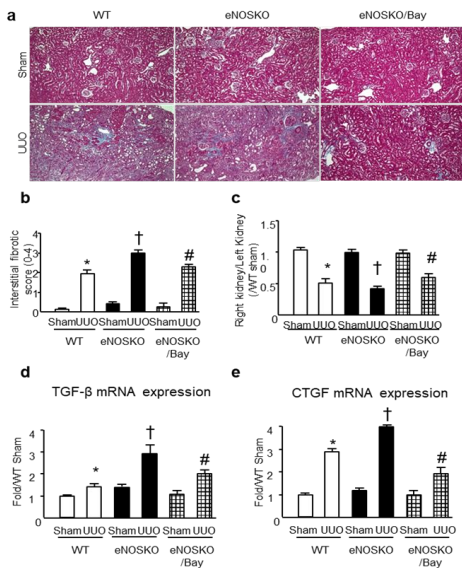


図3. 尿管結紮後の組織線維化とsGC活性薬投与の効果

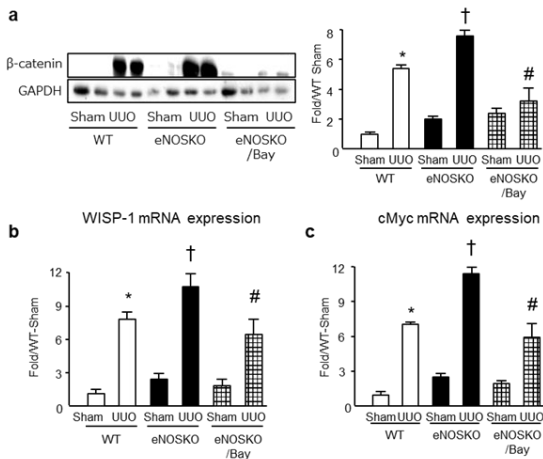


図4. 尿管結紮後のβ-cateninおよび標的遺伝子発現変化とsGC活性薬投与の効果

した。まず実際に尿細管間質領域に線維化が生じているかどうかをMasson trichrome染色で評価した。WT-Sham群と比較してWT-UUO群では尿細管の萎縮、尿細管障害に加えて間質線維化が増悪していた。WT-UUO群に比較してeNOSKO-UUO群では尿細管の萎縮、尿細管障害に加えて間質線維化がさらに増悪していた。pro-fibrotic geneとしてCTGF、TGF-βのmRNAレベルでの発現量を評価したところ、WT-UUOで認めたこれらの発現量増加は、eNOSKO-UUOでさらに顕著に増加していた (図3)。次にUUOモデルにおいてWnt/β-catenin経路が活性化しているかどうかを評価した。過去に、UUOを行うと尿細管でWntが活性化していることをすでに我々は報告しており、今回の実験系でも同様の変化を認めた。Wntが活性化することで、β-cateninの発現量が増加して

いるかどうかをWBで解析したところ、WT-UUO群ではWT-Sham群と比較して発現量の増加を認め、eNOSKO-UUO群においては、WT-UUO群と比較してさらに発現量増加を認めた。β-catenin下流のマーカーであるWisp-1、cMycなどの発現量をmRNAレベルで評価したところ、WT-UUO群ではWT-Sham群と比較して発現量の増加を認めたが、eNOSKO-UUO群においては、さらに顕著な発現量増加を認めた。これら一連の変化は、eNOSKO-UUO/Bay41-2272投与群において顕著に改善した(図4)。

2.次にCOS細胞を使用して、実際にeNOS/NOシグナルの下流に存在するPKGがβ-cateninのリン酸化に与しているかどうかをin vitroで検討した。まず、GSK3βをLiClにてブロックした状態でPKGのinducerであるmifepristoneで刺激を行ったところ、mifepristone濃度依存性にtotalのβ-cateninの発現量が低下していくことを確認した。さらに、β-cateninはユビキチン・プロテアソーム系で分解制御されているため、MG132を添加し、同経路をブロックしたところ、totalのβ-cateninの発現量が増加していくことを確認することができた(図5)。

今回の研究で、線維化進展機序として重要な経路であるwnt/β-catenin経路に対して内皮機能(eNOS/NO/sGC/PKG経路)

がブレーキの役割を果たしており、内皮機能障害が存在すると、そのブレーキが外れることで、β-catenin経路を介して間質線維化が増悪することを証明することが出来た(図6)。さらに治療介入として内皮機能障害が存在していたとしてもsGC活性化薬を投与することでβ-catenin経路抑制効果を介して間質線維化を軽減できる可能性が示唆された。近年、このsGC刺激薬はすでに実臨床の現場で使用されている。sGC刺激薬であるリアシグアトは、慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する初の治療薬として承認されている。同薬剤は、血管平滑筋細胞に存在するsGCを直接刺激し、NO非依存性にcGMP産生を促進する一方、NOに対するsGCの感受性も高めることによって、NO依存性のcGMP産生も促進する。今回の研究成果は、sGC刺激薬の腎障害進展抑制効果を証明しており、潜在的な治療ターゲットとして期待できると考えられる。

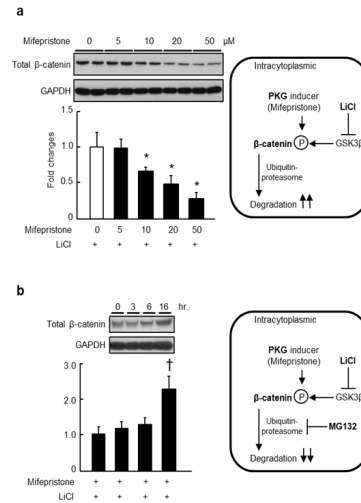


図5. PKGのβ-catenin発現量への影響

今回の研究成果は、sGC刺激薬の腎障害進展抑制効果を証明しており、潜在的な治療ターゲットとして期待できると考えられる。

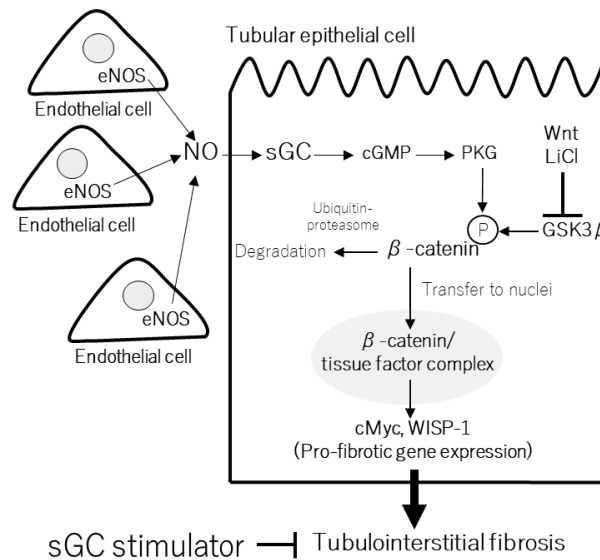


図6. 内皮機能とWnt/β-cateninの相互作用

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 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 角谷裕之 |
| 2. 発表標題 eNOS/sGC/PKG経路活性化はWnt/ -catenin経路抑制効果を介して腎間質線維化 を抑制する |
| 3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|