

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17757

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病進展過程における内皮Pannexin1の役割の検討

研究課題名(英文) Evaluation of the role of endothelial pannexin1 in progression of diabetic kidney disease

研究代表者

城所 研吾 (Kidokoro, Kengo)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50435020

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)：高血糖下における血管内皮由来ATPが、podocyteのATP感受性イオンチャネル型(P2)受容体を介してカルシウム流入を増加させpodocyte障害を促進するとの仮説を立てこれを検証した。ヒト系球体内皮細胞では、高血糖やNOS阻害により上清中のATPレベルが上昇し、ATP放出経路のPannexin1の阻害剤(Probenecid)により抑制された。内皮障害糖尿病マウスでは血漿ATPレベル、アルブミン尿、podocyte内カルシウムレベルが上昇したが、Probenecid投与により抑制された。糖尿病性腎臓病におけるpodocyte障害進展において、ATP/P2受容体経路の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦での慢性腎臓病患者は約1200万人と推計される、高齢化を反映し増加傾向にある。透析に至る疾患の第一位である糖尿病性腎臓病を初めとした多くの腎疾患には有効な治療法は少なく、その病態解明および治療法の確立は喫緊の課題と認識されている。糖尿病性腎臓病をはじめとした様々な腎疾患において、podocyte障害は糸球体硬化への進展における初期病変であり、近年カルシウム動態異常の関与が強く示唆されている。ATP-Pannexin1-P2受容体経路のポドサイト障害の関与は新規のpodocyte障害経路であると考えられ、今後の治療標的となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized and investigated the hypothesis that vascular endothelium-derived ATP under hyperglycemia increases calcium influx into podocytes through purinergic(P2) receptor and promotes podocyte damage. In human glomerular endothelial cells, hyperglycemia and NOS inhibition increased ATP levels in the supernatant. Pannexin 1 inhibitor, probenecid, suppressed the ATP release. Diabetic mice with endothelial dysfunction had elevated plasma ATP levels, albuminuria, and calcium levels in podocytes, which were suppressed by probenecid administration. The importance of the ATP / P2 receptor pathway was suggested in the development of podocyte injury in diabetic kidney disease.

研究分野：糖尿病性腎臓病

キーワード：糖尿病性腎臓病 ポドサイト障害 ATP Pannexin1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は腎障害のみならず心血管病のリスクとなり、これら血管障害の基盤病態として血管内皮障害が存在している。我々はこの内皮機能障害に着目し、糸球体内皮細胞の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)-一酸化窒素 (Nitrogen oxide: NO) の不均衡が、糖尿病性腎臓病 (Diabetic kidney disease; DKD) におけるアルブミン尿出現に関連することを報告している。また糸球体内皮細胞での酸化ストレスの亢進が、糸球体上皮細胞の障害進展にも関与することを見出してきた。糸球体内皮機能障害が糸球体病変の初期病巣と強く関連することが明らかとなってきたが、実際の内皮-上皮細胞間連関の分子メカニズムに関しては不明な点が多い。

糸球体上皮細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は、収縮、骨格維持、顆粒分泌、遺伝子翻訳やアポトーシスと深く関係する。糸球体上皮細胞内への過剰な  $Ca^{2+}$  流入は細胞骨格の remodeling を誘導し、結果アルブミン尿が出現する。近年 TRPC6 や TRPC5 などが糸球体上皮細胞内への重要な  $Ca^{2+}$  流入経路として報告されており、さまざまな腎疾患進展に関与することが知られている。ATP 感受性イオンチャネル型受容体 (Purinergic receptor) である P2 受容体も、糸球体上皮細胞間の傷害伝播 ( $Ca^{2+}$  伝播) に重要な役割を果たしていることが報告されている。1 型糖尿病患者の血漿中 ATP 濃度は健常人と比較して著明に増加しており、慢性高血糖や shear stress による内皮からの ATP 分泌増加がその要因の一つと考えられている (*Front Physiol.* 2012, *Circ. Res.* 2002)。あるいは、高血糖下酸化ストレスの蓄積に伴う内皮アポトーシスが ATP の放出源となりうる (*Circulation.* 2000)。障害内皮細胞から Pannexin1 を介して放出される ATP は糸球体上皮細胞上の P2 受容体を刺激し、過剰な  $Ca^{2+}$  流入を惹起することが想定される。しかし糖尿病における Pannexin1 と糸球体上皮細胞 P2 受容体の腎障害進展における寄与についての検討はされていない。

### 2. 研究の目的

DKD における糸球体障害進展過程での糸球体内皮-上皮連関の分子機序を解明し、新規治療法構築に資することを目的とする。障害内皮からの ATP 放出、糸球体上皮細胞の P2 受容体に着目し、糖尿病細小血管障害の最早期病変である血管内皮機能障害と糸球体上皮細胞障害の連関機序を解明する。具体的には、高血糖状態下における内皮障害と細胞外 ATP 放出変化について検討する。内皮細胞から放出される ATP により、糸球体上皮細胞内  $Ca^{2+}$  流入増大が、上皮細胞障害、糸球体透過性制御に及ぼす影響及びその分子機序について検討する。糸球体上皮細胞の P2 受容体阻害ないし ATP 放出制御による DKD 進展抑制の可能性を検討する。ATP/P2 受容体の病態進展における関与について解明することで、DKD における病態理解を深めると同時に、新規治療ターゲットの可能性について検証したい。

### 3. 研究の方法

#### 1) 高血糖下における障害内皮細胞からの ATP 放出・産生変化と分子機序の検討

ヒト糸球体内皮細胞 (hGEC) を用いて高血糖刺激 (normal glucose (NG); 5mM, high glucose (HG); 30mM) による ATP 産生能・放出の変化とその機序を解析する。内皮機能障害を想定し NOS (NO 合成酵素) 阻害薬 (L-NAME; 500  $\mu$ M)、PKG 阻害薬 (KT 5823; 500nM) 添加群、及び ATP 放出に関与する Pannexin1 の阻害作用を持つ Probenecid (Probe.) 添加群も作成する。24 時間刺激後、上清中の ATP 濃度測定を行う。

#### 2) 糖尿病モデル動物における血漿中 ATP 濃度と糸球体細胞アポトーシス及びアルブミン尿の解析

内皮機能障害モデルとして eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用い、高血糖下での糸球体障害への影響を検討する。糖尿病モデル作成には Streptozotocin (STZ) の腹腔内投与を行い、STZ、STZ/eNOS-KO マウスを作成する。血糖上昇後 3-4 週間で血漿中 ATP 濃度、尿中アルブミン排泄を測定、TUNEL 染色により糸球体細胞アポトーシスの評価を行う。Probenecid 投与による効果の検討も行う。

#### 3) 内皮障害糖尿病モデルにおける生体内糸球体上皮細胞 $Ca^{2+}$ 動態の in vivo imaging による解析

Podocin-Cre マウスと、 $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパクである GCaMP の flox マウス (GCaMP3) を交配させ、Pod-GCaMP5 マウスを作成する。これらのマウスを内皮障害モデルマウス (eNOS-KO) と交配させることにより、eNOS-KO/Pod-GCaMP3 マウスを作成し、STZ 糖尿病モデルを作成し検討を行う。in vivo serial imaging により上皮細胞  $Ca^{2+}$  濃度の変化を評価する。

#### 4) 培養ポドサイトにおける ATP 刺激に対するカルシウム動態および actin rearrangement の評価

培養ポドサイトに ATP 刺激 (3  $\mu$ M) を行い、細胞内カルシウム濃度変化を可視化する。カルシウム検出試薬には、Fluo4 と Fura red を用いる。コントロールと P2 受容体アンタゴニストである suramin (100  $\mu$ M) 添加群との比較を行う。カルシウム流入により生じる actin 骨

格変化(actin rearrangement)の評価を、蛍光ファロイジン染色にて評価する。

#### 4. 研究成果

HG 群での hGEC 培養上清中における ATP の濃度は、NG 群と比較して有意に高値であった。Probenecid は HG 群の上清中 ATP レベルを有意に低下させた (図 1)。L-NAME、PKG 阻害薬では高血糖状態でも上清中 ATP レベルは有意に上昇していた。Probenecid 添加群では、上清中の ATP レベル上昇は PKG 阻害薬群で有意に抑制されていた (図 2)。高血糖刺激、あるいは内皮機能障害を有する糸球体内皮細胞では、ATP 放出が亢進していた。

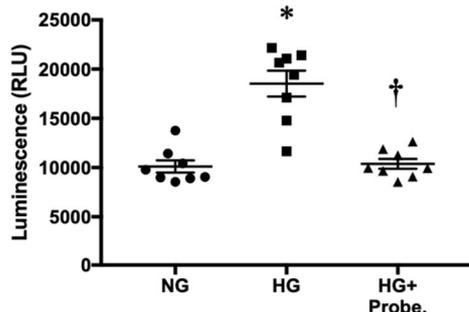


図 1 : 上清中ATPレベル  
NG; normal glucose: 5mM, HG; high glucose: 30mM  
Probe.; probenecid: 200 μM.  
\* p<0.05 vs NG, †p<0.05 vs HG

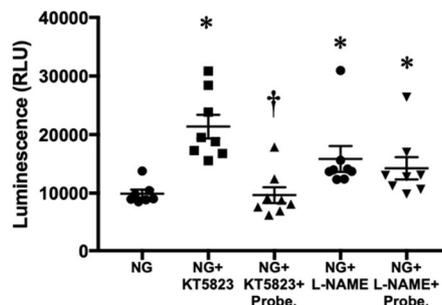


図2 : 上清中ATPレベル  
NG; normal glucose: 5mM, KT5823; PKG阻害薬: 500nM, L-NAME: 500 μ, Probe.; probenecid: 200 μM.  
\* p<0.05 vs NG, †p<0.05 vs NG+KT5823

内皮障害糖尿病 (eNOS-KO/STZ) マウスでは、STZ マウスで尿中アルブミン排泄の有意な上昇を認めない時点で既に有意なアルブミン排泄の増加を認めていた (図 3)。血漿中 ATP レベルも同様に他群と比較し有意な上昇を認めた (図 4)。Probenecid の投薬(100mg/kg/day)により、血漿中 ATP 濃度、尿中アルブミン排泄量は共に低下していた (図 3,4)。

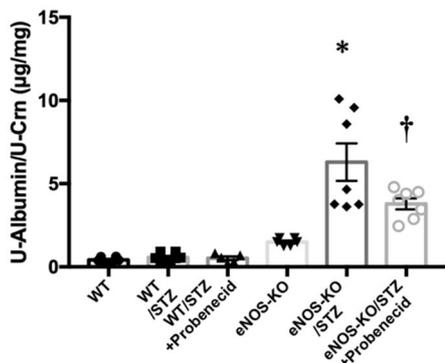


図3 : 尿中アルブミン排泄量  
\* p<0.05 vs WT/STZ, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

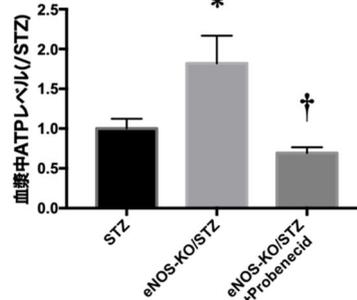


図4 : 血漿中ATPレベル  
\* p<0.05 vs STZ, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

PAS 染色による組織評価では、eNOS-KO/STZ 群において有意に glomerulosclerosis score が高かった。Probenecid 投与により改善傾向を認めた (図 5)。また TUNEL 陽性糸球体細胞数は eNOS-KO/STZ マウスにて多く観察されたが、細胞種までの同定には至らなかった (図 6)。NO bioavailability が低下した状態では血漿中 ATP レベルは高値となり、Pannexin1 阻害による ATP レベル低下とともにアルブミン尿が抑制されたことから、この両者には関連があることが示唆された。

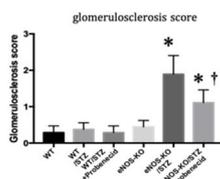
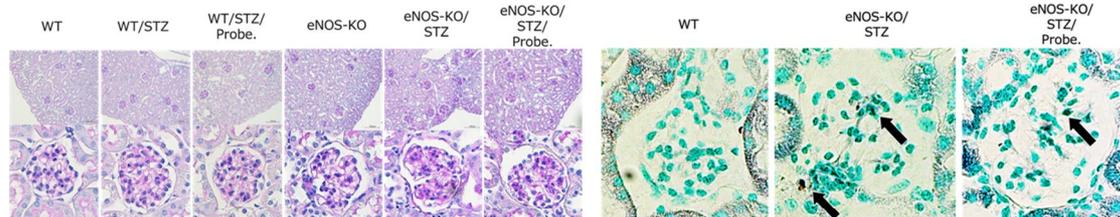


図5 : PAS染色によるglomerulosclerosis score  
\*p<0.05 vs WT, WT/STZ, WT/STZ+Probe., eNO-KO, †p<0.05 vs eNOS-KO/STZ

図6 : TUNEL染色

糸球体上皮細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度評価を  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光蛋白質 (GCaMP5) 発現マウスを用いて行なった。内皮障害糖尿病 (eNOS-KO/STZ) マウスでは、control や STZ と比較して、GCaMP 蛍光強度増大が確認され、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇していることが示唆された。Probenecid 投与により、この GCaMP intensity の増強は抑制された (図 7)。上皮細胞  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増大は細胞骨格のリモデリングによる foot process の精緻構造消失を惹起する。このことが大量アルブミン尿出現に関与していると考えられた。この現象は内皮障害により増強されることが示唆された。

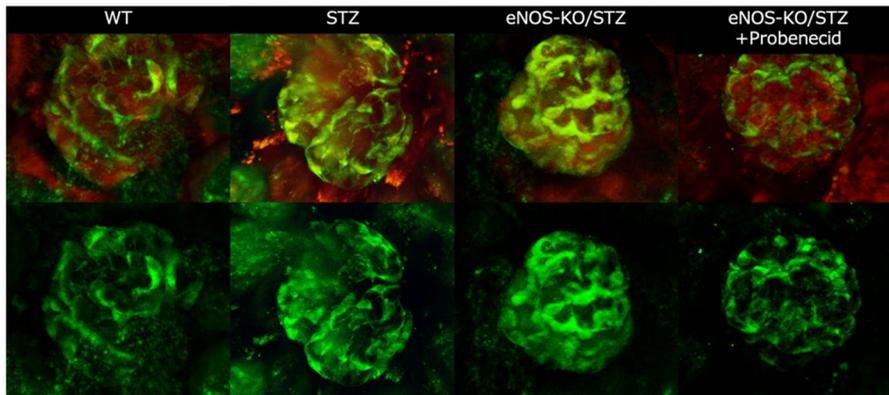


図7: GCaMP5 intensityによる糸球体上皮細胞内カルシウム濃度の比較  
 緑: GCaMP5, 赤: BSA-Alexa594

培養ポドサイトへの ATP 刺激により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が惹起された。P2 purinergic P2 受容体阻害薬である suramin の pre-incubation により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が抑制された (図 8)。ファロイジン染色による F-actin の評価では、ATP 刺激により actin の rearrangement が誘導された。Suramin による pre-incubation はこの actin 変化も抑制した (図 9)。

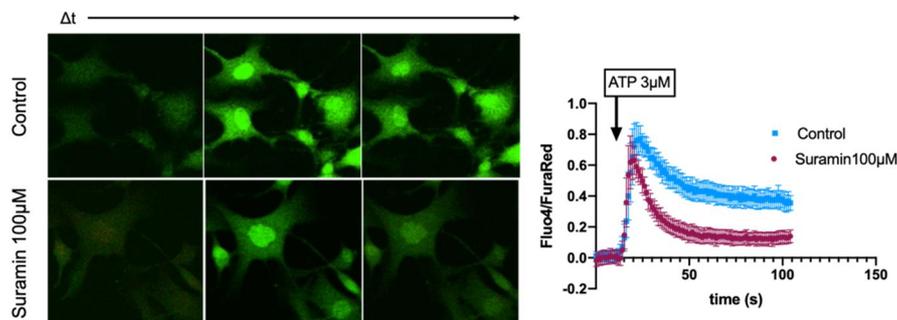


図8: 培養ポドサイトへのATP刺激 (3 $\mu\text{M}$ ) による細胞内カルシウム濃度変化の検証  
 緑: Fluo4, 赤: Fura red

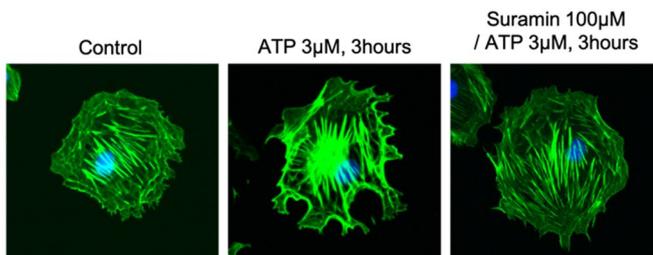


図9: 培養ポドサイトへのファロイジン染色によるF-actin評価

## 結論

DKD におけるアルブミン尿の出現、上皮細胞障害進展には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増大が関与しており、内皮障害により増強された。糸球体内皮-上皮連関の一つのメディエーターとして、糸球体内皮細胞から放出される ATP の関与が示唆された。DKD の糸球体病変進展抑制には単一の細胞に対するアプローチではなく、内皮-上皮連関を意識した治療戦略が重要であると考える。

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 城所 研吾
2. 発表標題 Keap1/Nrf2経路によるGFR制御機構の解明
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
---------	---------