

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790593  
研究課題名（和文） vitamin D の糸球体上皮細胞への直接作用を介した腎保護作用の検討  
研究課題名（英文） Podocyte-protective effects of vitamin D  
研究代表者  
松井 功 (MATSUI ISAO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：60456986

研究成果の概要（和文）：我々は、糸球体上皮細胞障害モデルであるラット puromycin aminonucleoside 腎症において、活性型 vitamin D およびその誘導体である 22-oxacalcitriol が、糸球体上皮細胞保護効果を有する事を明らかにし、論文発表した。糸球体上皮細胞障害は、慢性腎臓病進行の重大なリスクファクターであるため、我々の研究結果は、慢性腎臓病進行抑制の新たな治療法を開発する上で有意義である。

研究成果の概要（英文）：We have proved that active vitamin D and its analogue 22-oxacalcitriol protect podocytes from injury in puromycin aminonucleoside induced nephrosis rats. Because podocyte injuries and resultant proteinuria are major risk factors in chronic kidney disease (CKD), our finding provides new therapeutic strategy for the prevention of CKD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：糸球体上皮細胞・vitamin D・慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病 (CKD) 患者では、病変の進行早期から血清活性型 vitamin D 濃度が低下することがよく知られている。しかし現在の臨床において vitamin D 投与は、二次性副甲状腺機能亢進症に対して行われており、活性型 vitamin D 不足が、その活性化に重要な臓器

である腎臓自体に与える影響については明らかではなかった。

(2) 糸球体上皮細胞およびその細胞間接着機構であるスリット膜の障害は、慢性腎臓病進行の重要なリスクファクターである蛋白尿の原因となる。我々は転写制御因子 snail がスリット膜構成蛋白 nephrin の発現を抑制

し尿蛋白を増加させることを、本研究開始時点で既に明らかにしていた。また snail は大腸癌において vitamin D 受容体 (VDR) 発現を抑制する事が当時報告されており、VDR が糸球体上皮細胞に発現しているならば、snail による VDR 発現抑制および血清  $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度低下の両者により、CKD 患者では糸球体上皮細胞における vitamin D シグナル伝達系が障害されている可能性が高いと考えられた。

(3) VDR ノックアウトマウスで腎におけるレニン発現が上昇することなどから、活性型 vitamin D はレニン発現を抑制することが知られていた。Vitamin D が腎保護作用を有する事を示す報告は過去にもあったが、いずれも全身および腎でのレニン・アンギオテンシン-アルドステロン系 (RAS) が亢進したモデルでの検討であり、vitamin D の腎保護作用が RAS 抑制によるものなのか、RAS 抑制非依存性の機序が存在するのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

活性型 vitamin D およびその analogue である 22-oxacalcitriol が、糸球体上皮細胞保護作用を有するか否かを明らかにする。糸球体上皮細胞特異的 VDR ノックアウトマウスを作成し、RAS 非依存性の vitamin D による腎保護作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 糸球体上皮細胞障害モデルとしてラット puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症を作成した。本モデルラットに  $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  およびその analogue である 22-oxacalcitriol を投与して、その糸球体上皮細胞保護効果を、尿蛋白や糸球体上皮細胞マーカーの発現などを検討して明らかにした。

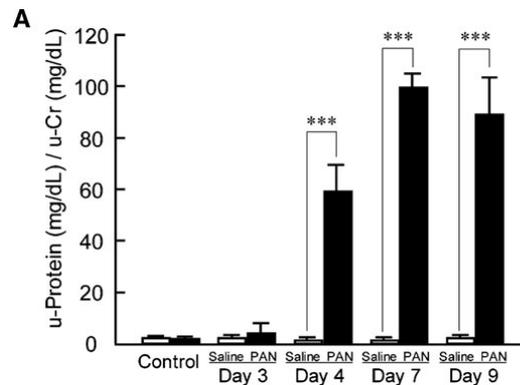
(2) VDR flox マウスと Nephron Cre マウスを掛け合わせ、糸球体上皮細胞特異的 VDR ノックアウトマウスを作成した。全身の VDR ノックアウトマウスも用いて、STZ による糖尿病誘発、および 5/6 腎臓摘出モデルを作成し、VDR 欠損による腎病変の変化、糸球体上皮細胞マーカーなどの変化を検討した。

## 4. 研究成果

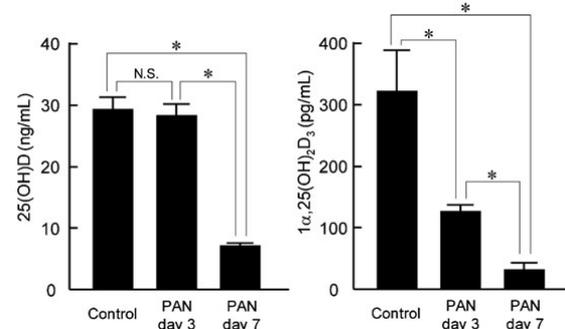
(1) ラット PAN 腎症発症に vitamin D 活性化障害が関与する。

ラット PAN 腎症は、糸球体上皮細胞障害モデルとしてよく用いられているが、本モデルは puromycin aminonucleoside (PAN) を投与後 3

日間は明らかな尿蛋白を生じず、4 日目より大量の尿蛋白を生じるという特徴的な経過をたどる (下図)。



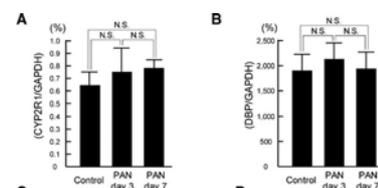
PAN 投与後 3 日間尿蛋白を生じないという経過は、PAN が直接糸球体上皮細胞を障害しているのではなく、PAN によって生じた障害が二次的に糸球体上皮細胞に影響を及ぼして、ネフローゼを発症している可能性を示唆していた。我々は本モデルにおける血清  $25(\text{OH})\text{vitamin D}$  および  $1, 25(\text{OH})_2\text{vitamin D}$  濃度を測定した (下図)。



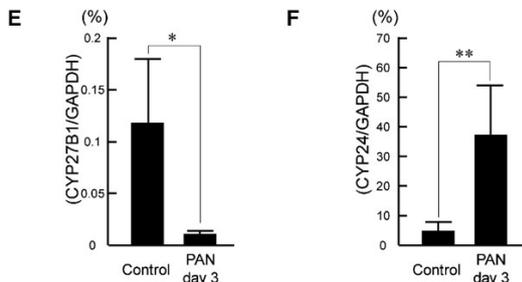
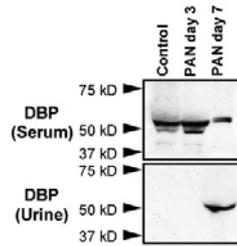
血清  $25(\text{OH})\text{vitamin D}$  は尿蛋白が生じた後で減少していたが、活性型 vitamin D である  $1, 25(\text{OH})_2\text{vitamin D}$  濃度は尿蛋白が生じる前に減少していた。このことから糸球体上皮細胞障害に先行して vitamin D 活性化障害が生じることが示された。

(2) 腎における vitamin D 活性化障害が尿蛋白に先行する。

結果(1)を踏まえ、我々はその機序を検討した。Vitamin D は肝臓で CYP2R1 により 25 位が水酸化され、肝臓で産生される vitamin D binding protein (DBP) と結合して血中を運ばれる。我々は肝臓における CYP2R1 および DBP の発現を real time PCR で検討したが、PAN 腎症の経過中に有意な変化は認めなかった (右図)。



しかし、尿蛋白の出現に伴い DBP は血中から尿に喪失しており（右図）、血清 25(OH)D の 99%以上が DBP に結合していることから、PAN 腎症 day 7 における血清 25(OH)D 濃度低下は DBP の尿への喪失に伴うものと考えられた。また 25(OH)D は腎近位尿細管において CYP27B1 により活性化されるが、尿蛋白出現前の day 3 において腎 CYP27B1 の発現量が有意に低下していることを見出した。また vitamin D 不活性化酵素である CYP24 は逆に PAN 腎症 day 3 において発現上昇しており、CYP27B1 の低下と合わせて、vitamin D の活性化障害に関与していることを明らかにした（下図）。



(3) 糸球体上皮細胞に VDR が発現する。

Vitamin D が糸球体上皮細胞に直接作用し得るか否かを明らかにするため、免疫組織染色にて VDR およびその co-receptor である retinoid X receptor (RXR) の発現を検討した（下図）。

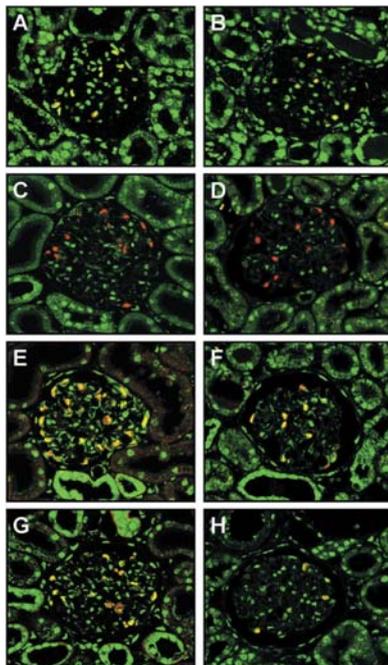
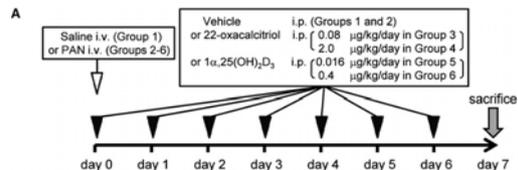


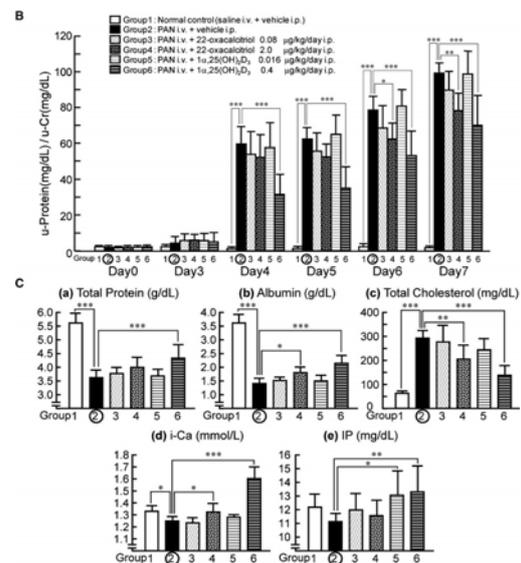
図 A, C, E, G は正常ラット腎、図 B, D, F, H は PAN 腎症 day 7 の腎臓である。各図では糸球体上皮細胞の核を WT-1 (赤) で二重染色した。A, B は VDR の発現部位を緑で示しているが、糸球体上皮細胞核が黄色に染色されており、糸球体上皮細胞に VDR が発現していることが確認された。また co-receptor RXR に関しては RXR-β (図 E, F) および RXR-γ (図 G, H) が糸球体上皮細胞に発現していたが、RXR-α (図 C, D) は糸球体上皮細胞に発現を認めなかった。以上のことから、vitamin D が糸球体上皮細胞に直接的に作用していることが確認された。

(4) 活性型 vitamin D の投与は PAN 腎症ラットのネフローゼを改善させる。

PAN 腎症ラットに高容量あるいは低容量の 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D あるいは 22-oxacalcitriol を投与し、その治療効果を検討した。実験方法は下図に示すとおりである。



その結果、両活性型 vitamin D の高容量群において尿蛋白減少をはじめとしたネフローゼの改善が認められた（下図）。

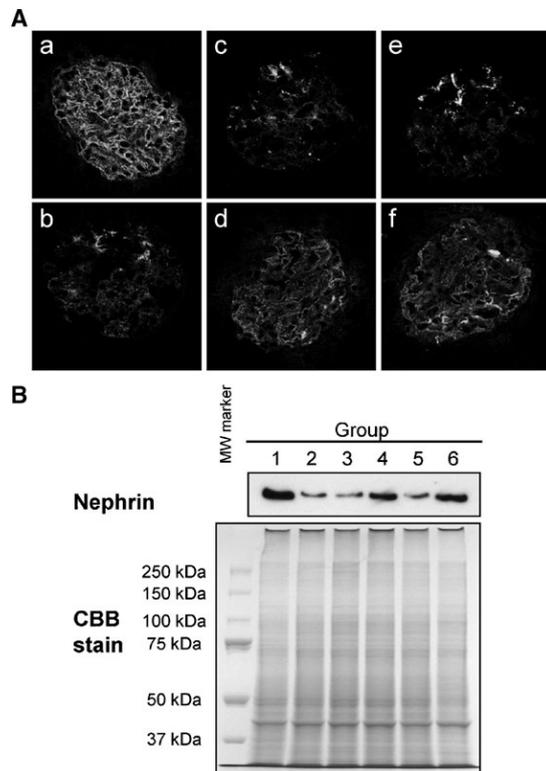


(5) 活性型 vitamin D 投与は糸球体上皮細胞の機能を維持する。

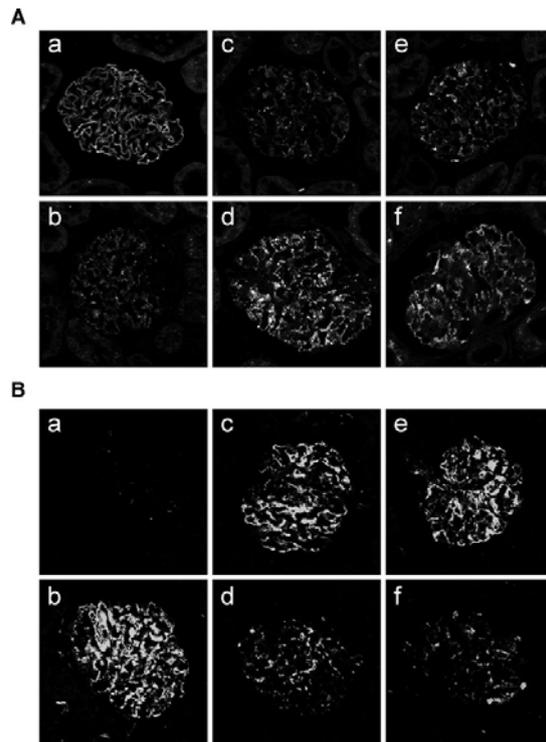
活性型 vitamin D の投与によりネフローゼの改善が認められたため、糸球体上皮細胞の変化についてさらに検討を進めた。

糸球体上皮細胞の細胞間接着機構であるスリット膜は、原尿濾過に重要な役割を担っており、その構成蛋白である nephrin は様々な糸球体疾患で発現が減少することが知られている。下図は nephrin の免疫組織染色で a が正常ラット、b が PAN 腎症ラット、c および d が PAN 腎症に低容量あるいは高容量の 22-oxacalcitriol を投与したラット、e および f が PAN 腎症に低容量あるいは高容量の 1, 25(OH)<sub>2</sub> vitamin D を投与したラットである。

PAN 腎症により発現が低下した nephrin はそれぞれ高容量の活性型 vitamin D より、その発現の回復が認められた。また同様の結果は糸球体蛋白を用いた western blot でも確認された (下図)。



また nephrin 以外の糸球体上皮細胞マーカーについても、免疫組織染色にて確認した。下図 A はスリット膜関連蛋白である podocin、下図 B は糸球体上皮細胞障害マーカーである desmin の免疫組織染色である。Podocin は nephrin と同様の染色パターンを示し、PAN 腎症にて発現低下し、活性型 vitamin D にて発現が回復した。一方、desmin は nephrin、podocin と全く逆の染色パターンを示し、PAN 腎症で発現上昇、活性型 vitamin D で発現低下した。いずれも活性型 vitamin D により糸球体上皮細胞障害が軽減された事を示す結果となった。



(6) 糸球体上皮細胞特異的 VDR ノックアウトマウスの作出。

VDR flox マウスおよび nephrin Cre マウスを掛け合わせ、糸球体上皮細胞特異的 VDR ノックアウトマウスを作成した。糸球体上皮細胞特異的 VDR ノックアウトマウスに STZ による糖尿病誘発あるいは 5/6 腎臓摘出による腎障害モデルを作成したが、WT との間に有意な変化を認めなかった。今回使用したノックアウトマウスのバックグラウンドは C57BL/6 であり、C57BL/6 は腎病変を生じにくいことが知られている。DBA/2 では比較的 STZ による腎病変が生じやすいとされており、現在バッククロスによりノックアウトマウスの遺伝背景を変更しているところである。DBA/2 バックグラウンドの糸球体上皮細胞特異的 VDR ノックアウトマウス作成後は STZ による糖尿病を誘発し、さらなる検討を行う予定である。

## 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] (計 2 件)

① 松井 功、医歯薬出版株式会社、ビタミン D の腎保護作用、医学のあゆみ 233 巻 3 号 256 頁 2010 年 査読なし

② Isao Matsui, Takayuki Hamano, Kodo Tomida, Kazunori Inoue, Yoshitsugu

Takabatake, Yasuyuki Nagasawa, Noritaka Kawada, Takahito Ito, Hiroshi Kawachi, Hiromi Rakugi, Enyu Imai and Yoshitaka Isaka  
Active vitamin D and its analogue,  
22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in rats

Nephrol Dial Transplant. 24(8): 2354-61.  
2009 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

① Kazunori Inoue, Isao Matsui, Chikako Nakano, Yoshitaka Isaka, and Hiromi Rakugi.

Maxacalcitol ameliorates kidney injury in Dahl salt-sensitive rats in a rennin-independent manner.

ISN NEXUS 2010.04.16 Kyoto.

② Isao Matsui. Active vitamin D and its analogue, 22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside -induced nephrosis in rats.

ROD-21 研究会 2009.09.05 船橋

③ 松井 功、濱野 高行、三上 聡司、富田 弘道、田中 啓隆、猪阪 善隆、伊藤 孝仁、今井 圓裕、楽木 宏実

ビタミンDはネフローゼラットの尿蛋白を減少させる

日本腎臓学会総会 2008.05.31 福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/bascresearch.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松井 功 (MATSUI ISAO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60456986

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし