

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790595

研究課題名（和文）アルドステロン負荷腎障害モデルにおけるオステオポンチン発現機序及び抑制効果の解明

研究課題名（英文）The role of osteopontin in aldosterone-induced renal fibrosis

研究代表者

入田 純（IRITA JUN）

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00423442

研究成果の概要（和文）：アルドステロン（ALDO）による腎障害，特に腎線維化において，炎症性サイトカインであるオステオポンチン（OPN）の役割を解明することが本研究の目的である．野生型マウス群，OPN 欠損マウス群にて検討したところ，ALDO は，OPN を介して線維芽細胞増殖やマクロファージを遊走させ，炎症及び酸化ストレスを惹起することで腎線維化を起こしていることが示唆された．そして OPN 発現抑制は，酸化ストレスの抑制，腎線維化抑制を介して腎保護的に作用することが示された．

研究成果の概要（英文）：Osteopontin (OPN) has been implicated in the pathology of several renal conditions. The aim of the present study was to clarify the roles of OPN in aldosterone-mediated renal injury by infusing aldosterone into either wild type (WT) or OPN knockout mice (OPN^{-/-}). We used uninephrectomized mice treated with aldosterone and high salt to exaggerate renal fibrosis. These results indicate OPN is a promoter of aldosterone-induced inflammation, oxidative stress and interstitial fibrosis in the kidney and suggest that inhibition of OPN may be a potential therapeutic target for prevention of renal injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

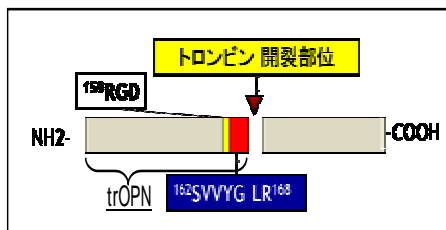
キーワード：オステオポンチン，アルドステロン，腎線維化，酸化ストレス，炎症

1. 研究開始当初の背景

鉱質コルチコイドホルモンであるアルドステロン(ALDO)は、遠位尿細管におけるNa再吸収や水分の恒常性維持などの古典的な作用の他、心血管合併症の独立した危険因子かつ臓器障害因子であることが、大規模臨床研究や基礎的研究から再認識されるようになった。さらにALDOが腎疾患の進展、特に糸球体硬化や腎尿細管間質線維化においても重要な役割を果たしていることが報告されているものの、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

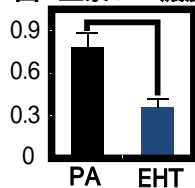
さらに細胞外マトリックスであるオステオポンチン(OPN)は、炎症性サイトカインとしての機能を有し、私たちの治療ターゲットであり炎症性疾患としても捉えられるようになった動脈硬化症や、腎炎などの腎障害の進展にも関与していることが示唆されているものの、その機能はまだ不明な点が多い(図1)。

図1: OPNの構造



これまで申請者らは、動脈硬化性疾患の病態解明を分子生物学的研究やヒト検体を用いた臨床研究にて検討してきた。その中で、心血管合併症の頻度や高血圧性臓器障害の著しい原発性アルドステロン症患者において、OPNの発現亢進が認められることを初めて報告した(図2)。本態性高血圧患者の血清を用いた検討では、血漿ALDO濃度とOPN濃度は正の相関を示し、OPNはALDOの独立した規定因子であることを示した。さらに、腎線維芽細胞を用いた*in vitro*研究で、ALDOにおける腎線維化のメカニズムとして、ALDOによって誘導されるOPNがその中心を担い、腎線維芽細胞増殖やコラーゲン遺伝子発現を制御していることを示した。

図2: 血漿OPN濃度



2. 研究の目的

ALDOによる腎線維化のメカニズムとOPNの関与及びOPNを直接制御することが、腎機能障害のひとつの治療ターゲットとなりうることを証明することである。

3. 研究の方法

27-30gのOPN欠損マウスまたはC57/BL6Jマウス(WT)を用いて、片腎摘出・1%NaCl水負荷を行い、浸透圧ミニポンプにてALDOもしくはVehicleを持続注入した。4週後、血圧・尿中アルブミン排泄量・血液生化学検査・形態学的変化(PAS染色・マッソントリクロム染色)・免疫組織学的検査・real time PCR法による遺伝子発現量・Western blot法・ELISA法によるタンパク発現量を4群間で比較・検討した。

4. 研究成果

図3: OPN

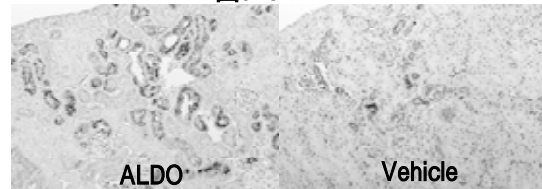


図4: 尿中アルブミン排泄

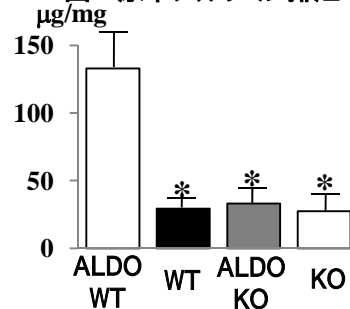


図5: 腎線維化(マッソントリクロム染色)

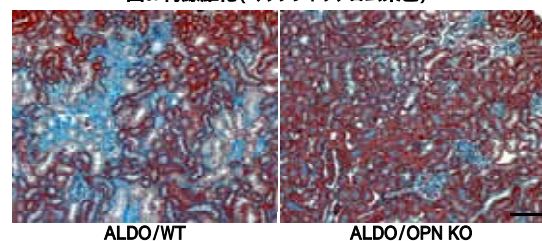


図6: 線維芽細胞

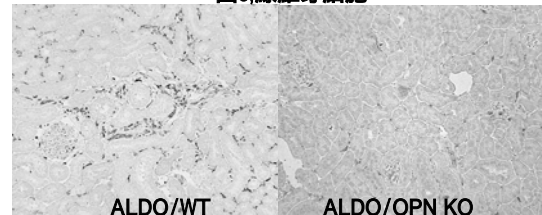
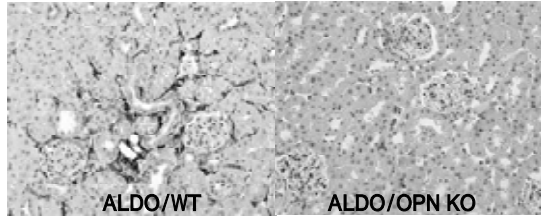


図7;マクロファージ



血清 BUN・Cr に関しては、4 群間に差を認めなかった。ALDO 投与群では、Vehicle 群と比較して血清 K 濃度は有意に低下したが、WT 群と OPN KO 群では有意差を認めなかった。

WT 群において ALDO 負荷は、血圧、一日尿中アルブミン排泄量(図 3)、OPN 及び線維化関連遺伝子であるフィブロネクチン、I・III・IV 型 コラーゲン遺伝子発現を有意に増加させた。さらにマッソントリクロム染色では、尿細管間質の線維化が著明に増強された(図 4)。

免疫組織染色では尿細管に OPN の発現増加を認め、FSP-1 (線維芽細胞) や F4/80 (マクロファージ) 陽性細胞の尿細管間質への浸潤を認めた(図 5・6)。さらに WT 群において ALDO 負荷は、酸化ストレス関連因子(p47phox, p67phox, gp91phox) の遺伝子及び蛋白発現増加を示した。また酸化ストレスマーカーである尿中 8-イソプロスタン排泄量が有意に増加を示した。

一方 OPN KO 群では、ALDO による血圧上昇は WT 群と比較して差を認めなかったが、尿中アルブミン排泄量は有意に低下し、腎線維化も著明に抑制されていた。また、尿細管間質への線維芽細胞やマクロファージの細胞浸潤は抑制され、それぞれの線維化関連遺伝子発現や酸化ストレス関連因子発現及び尿中 8-イソプロスタン排泄は有意に抑制された。

以上の結果から ALDO によって誘導される腎線維化は、OPN の発現を抑制することで改善した。ALDO は、OPN を介して線維芽細胞増殖やマクロファージを遊走させ、酸化ストレス・炎症および線維化関連因子の発現を惹起することで腎線維化を起こしていることが示唆された。

近年、局所炎症性疾患である関節リウマチにおいて、抗 OPN 抗体を用いた治療の臨床試験が開始されている。これまでの申請者らの検討では、ALDO によって誘導された OPN は、炎症性疾患である動脈硬化性疾患や腎線維化の直接的な原因と考えられ、OPN を直接制御できれば、腎障害進行を阻止できるのではないかと考えている。その OPN の発現調節機構や活性化制御機構の解析は、RAS 系阻害薬以外の腎障害に対する治療の選択肢が広がり、将来の CKD を含めた腎障害の治療戦略を確立するうえで大きな意義を持つものと期待できる。

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 4 件)

1. Okura T, Kurata M, Enomoto D, Jotoku M, Nagao T, Desilva VR, Irita J, Miyoshi KI, Higaki J. Undercarboxylated Osteocalcin Is a Biomarker of Carotid Calcification in Patients with Essential Hypertension. *Kidney Blood Press Res.* 2010;33:66-71. 査読有。

2. Okura T, Kurata M, Irita J, Enomoto D, Jotoku M, Nagao T, Koresawa M, Kojima S, Hamano Y, Mashiba S, Miyoshi K, Higaki J. Renal resistance index is a marker of future renal dysfunction in patients with essential hypertension. *J Nephrol.* 2010;23:175-80. 査読有。

3. Okura T, Higaki J, Kurata M, Irita J, Miyoshi K, Yamazaki T, Hayashi D, Kohro T, Nagai R. Elevated serum uric acid is an independent predictor for cardiovascular events in patients with severe coronary artery stenosis: subanalysis of the Japanese Coronary Artery Disease (JCAD) Study. *Circ J.* 2009;73:885-91. 査読有。

4. Irita J, Okura T, Kurata M, Miyoshi K, Fukuoka T, Higaki J. Osteopontin in rat renal fibroblasts: functional properties and transcriptional regulation by aldosterone. *Hypertension.* 2008;51:507-13. 査読有。

[学会発表](計 4 件)

1. 入田純, 大蔵隆文, 檜垣實男. レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系とオステオポンチンとの関連, 第 39 回日本心臓血管作動物質学会シンポジウム, 2010 年 2 月 5 日:名古屋.

2. 入田純, 大蔵隆文他 6 名. アルドステロンによる腎線維化には、オステオポンチンにより惹起される酸化ストレスが関与する. 第 32 回日本高血圧学会総会, 2009 年 10 月 1-3 日: 大津.

3. Irita J, Okura T et al (他 6 名). Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress and interstitial

fibrosis in the kidney. 63rd High Blood Pressure Research Conference 2009, September 23-26, 2009, Chicago, IL, USA.

4. 入田純, 大蔵隆文他 6 名. アルドステロン誘導腎障害におけるオステオポンチンの役割 - OPN KO マウスを用いた検討. 第 59 回日本腎臓学会学術集会, 2009 年 6 月 3-5 日: 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入田 純 (IRITA JUN)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 00423442