様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　６ 月 １３ 日現在

機関番号：３４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０７１４４

研究課題名（和文）アルブミン曝露による尿細管PGE2生成機構とHIF-1誘発腎線維化との連関解析

研究課題名（英文）PGE2 production by albumin exposure in renal tubular cells and its involvement in HIF-1-induced renal fibrosis

研究代表者
永井　純也（Nagai, Junya）

大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：２０３０１３０１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腎近位尿細管上皮細胞におけるアルブミン誘発HIF-1活性に及ぼすPGE2の関与について調べるため、in vitroとin vivoで解析を行った。ヒト腎近位尿細管上皮細胞株HK-2を用いたin vitro実験では、アルブミン処理により濃度および時間依存的にPGE2生成を増加させることを認めた。アドリアマイシン誘発腎障害モデルマウスを用いたin vivo実験では、アドリアマイシン投与後にアルブミン尿が観察されるとともに、PGE2、PGE代謝物およびPGF2αの尿中排泄量が増加することを観察した。以上、アルブミン誘発HIF-1活性化にPGE2生成の増加が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
糸球体から漏出したアルブミンによる尿細管障害発症に関する研究は、これまでに様々な解析が進められてきたが不明な点も多く残されている。一方、今後もさらに増加すると予想される慢性腎臓病(CKD)やその進行に伴う腎不全を回避するための手段を講じていくことは喫緊の課題である。本研究は、糸球体からのアルブミン漏出を端緒として腎不全に進行する過程における分子機構の一端を解明しようとするものであり、その知見はCKDの予防法や治療薬の開発に資するものである。CKD患者はその悪化に伴い血液透析や腎移植に転帰することから、本研究成果はCKD患者のQOL向上に加え、医療経済学的にも波及効果を有するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed in vitro analysis using human renal proximal tubular cell line HK-2 and in vivo analysis using mice with adriamyicin-induced kidney injury in order to investigate the role of PGE2 in albumin-induced HIF-1 activation in renal proximal tubular cells. In HK-2 cells, albumin exposure induced HIF-1 activation and enhanced PGE2 production in a concentration- and time-dependent manner. In mice intravenously injected adriamycin, urinary levels of not only albumin but also PGE2, PGE metabolite and PGF2a were increased compared to mice intravenously injected its vehicle (control mice). Taken together, it has been suggested that increase in albumin filtered through the glomerulus following kidney disease induces HIF-1 activation via enhanced PGE2 production in renal proximal tubular cells.

研究分野：医療系薬学

キーワード：アルブミン　腎近位尿細管　プロスタグランジンE2　HIF-1　腎線維化

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

我が国では世界に先駆けて超高齢社会を迎え、それとともに末期腎不全に至るリスク因子である慢性腎臓病（CKD）を有する患者数が1,330万人にも達すると推定されている。末期腎不全は、透析や腎移植などが必要になることから、患者のQOLのみならず、高額な医療費が必要という点でも種々の課題をはらんでいる。一方、CKDは糖尿病や高血圧などの生活習慣病が原因で惹起することが多いことから、生活習慣の改善あるいは適切な薬物療法により腎機能を維持し、末期腎不全への進行を抑制することが求められている。

CKDの重症度を表す指標としてタンパク尿（アルブミン尿）がある。血漿中タンパクとして最も含量が多いアルブミンは分子サイズが66kDa程度であることから、腎機能が正常時は、腎糸球体のサイズバリア機能によりほとんどろ過されない。しかし、糖尿病や高血圧などに伴う腎糸球体障害はサイズバリア機能を破綻させ、血漿中のアルブミンは尿細管管腔中へと漏出し、アルブミンが尿中に認められるようになる。少量のアルブミンの漏出であれば、腎近位尿細管における受容体（メガリン/キュビリン）を介した再取り込み機構によって尿細管細胞内に回収される。しかし、過剰のアルブミンの漏出は受容体への結合が飽和し、再取り込みを受けることなく、尿中に排泄されることから、尿中アルブミンの多寡が腎糸球体の状態を反映することになるため、腎機能の指標として利用されている。一方、通常ほとんど糸球体ろ過されないアルブミンが尿細管管腔中に漏出すること自体が、腎尿細管細胞障害を引き起こし、腎線維化や腎不全に進行させることが強く示唆されている。しかし、アルブミンが腎尿細管上皮細胞に及ぼす影響や細胞障害の発症機構については、未だ不明な点が多い。

我々は、腎近位尿細管上皮細胞におけるアルブミンや薬物のメガリン/キュビリンを介したエンドサイトーシス機構とその制御について研究を進めている中で、アルブミンを負荷したヒト腎近位尿細管上皮細胞株HK-2において、転写因子である低酸素誘導因子HIF-1のサブユニットHIF-1α発現が顕著に誘導されるともに、HIF-1経路が活性化されることを見い出した。HIF-1は少なくとも百を超える遺伝子の発現調節に関わっており、HIF-1標的遺伝子の中には線維化に関与するものもある。さらに研究を進めたところ、脂肪酸を除去処理したアルブミンで負荷した場合には、HIF-1αの発現誘導がほとんど起こらないことを見い出した。このことは、アルブミン分子そのものではなく、アルブミンに結合している脂肪酸が、腎近位尿細管上皮細胞におけるHIF-1活性化に関わっていることを強く示唆するともに、以前より報告されている食餌中の脂肪酸を制限したラットにおいて腎障害が軽減されることとの関連性が提示された。さらに、我々はアルブミンに結合している脂肪酸の中から結合量の多いものを選択し、その選択した脂肪酸による HIF-1 活性化の有無を調べたところ、アラキドン酸を脂肪酸除去したアルブミンと共存させてHK-2細胞に処理した場合にHIF-1 mRNAの発現上昇を認めた。加えて、アラキドン酸はプロスタグランジンの前駆体であることから、アラキドン酸処理時における培地中の PGE_2 生成を予備的に調べた結果、アラキドン酸添加により培地中 PGE_2 含量が増加する結果を得た。

以上の一連の研究によって、アルブミンによるHIF-1活性化には、アルブミンに結合しているアラキドン酸からの PGE_2 生成が関与している可能性が示され、ひいてはアルブミンの尿細管管腔中への漏出に伴う腎線維化の進行に PGE_2 が重要な役割を果たしていることが考えられる。こうした知見をさらに発展させるために、本研究に至った。

２．研究の目的

慢性腎臓病（CKD）や薬剤投与による糸球体ろ過バリア機能の低下は、通常では糸球体ろ過が制限されているアルブミンの尿細管管腔中への漏出を引き起こす。こうしたアルブミンの漏出自体が腎線維化、ひいては腎不全につながる要因となることが示唆されているが、その分子機構は不明である。申請者はこれまでにアルブミンに結合している脂肪酸が転写因子 HIF-1 を活性化させること、その脂肪酸としてアラキドン酸が有力であることなどを見い出してきた。そこで、本研究では尿細管管腔中へのアルブミン漏出に伴う腎線維化の発症過程におけるアラキドン酸カスケードと HIF-1 活性化の関連性について明らかにすることを目的とした。本研究によって得られる成果は、CKDならびに腎不全の発症機構の解明に加えて、その進展を抑制するための標的分子、ひいては治療薬の開発を進める上で意義のある知見が得られるものと考えている。

３．研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト腎近位尿細管上皮細胞由来HK-2細胞は、10% FBSを含むDMEM/F-12培地を用い、CO_2インキュベーター内 (37°C、5% CO_2-95% air)で90%程度コンフルエントになるまで6～7日間培養し

た。細胞の継代は 0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA を用いて細胞を剥離し、100 mm culture dish(維持用)に 80～100 x 10^4 cells/dish となるように播種した。24-well plate(実験用)には 5～10 x 10^4 cells/well となるように播種した。培地交換は 2～3 日毎に行い、実験前日にも行った。実験には 5～7 日間培養した細胞を用いた。

(2) グルコース取り込み活性解析

GLUT 活性評価のための取り込み実験で用いた緩衝液には、塩化ナトリウムを塩化コリンに置換した Na^+-free phosphate-buffered saline (Na-free PBS)を用いた。HK-2 細胞は 24-well プレートに播種後 4 日間程度培養し、無血清培地に置換後 24 時間培養した。その後、各種目的化合物を含む無血清培地で 48 時間処理し、その培地を除去後、細胞を Na-free PBS で 2 回洗浄し、37℃の Na-free PBS で 10-20 分間プレインキュベーションした。その後、プレインキュベーション溶液を除いて D-[^{3}H]glucose (1 mM)を含む溶液を添加し、10 分間インキュベーションした。基質溶液を除去した後に氷冷した Na-free PBS で 2 回洗浄した。GLUT 阻害剤として phloretin(100 μM)を用いた。洗浄後、0.1 M NaOH を加えて細胞を溶解し、遠心（10,000 rpm x 5 min）を行い、その上清の細胞溶解液に Liquiscint (National Diagnostics)を加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。また、細胞タンパク量は Lowry 法にて測定した。

(3) Real-time PCR 法

一定期間培養した細胞から培地を除去した後、PBS で 2 回洗浄し、RNeasy® Mini Kit(QIAGEN)を用いて取扱い説明書に記載されたプロトコールに従い total RNA を抽出した。抽出した RNA 濃度は 260 nm における吸光度を測定することで算出した。PCR 反応は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（TOYOBO）を用い、取扱説明書に記載されたプロトコールに従って行った。PCR 反応の後、融解曲線分析を行い、非特異的産物が生成されていないことを確認した。各装置での PCR 反応条件は、前熱変性(95℃, 30 秒)、その後、熱変性(95℃, 10 秒) → プライマーのアニーリング(60℃, 15 秒) → 伸長反応(72℃, 15 秒) を 40 サイクルとした。補正用の遺伝子マーカーとしてβ-アクチンを選択した。

（4）動物実験

実験動物として BALB/c 雄性マウス(5～6 週齢)を使用し、自由飲水、自由摂食下で一週間馴化させた。なお、ADR 投与後の実験動物は、明期：暗期＝12：12 の明暗サイクル、自由飲水・自由摂食下で飼育した。ADR 投与に際して、生理食塩水を用いて 2.0 mg/mL の濃度の ADR 溶液を調製し、10 mg/kg の用量で尾静脈投与を行った。対照群として、等容量の生理食塩水を投与した。ADR 投与前日を day0、ADR 投与日を day1 として、day0、day7 および day14 に代謝ケージを用いて 24 時間尿サンプルを回収し、尿量を測定した。回収した尿サンプルは、15,000 rpm で遠心分離後上清を回収し、-20 ℃で保存した。day14 の尿サンプルを回収後、心採血および腎摘出を行った。摘出した腎のうち、1/4 を RNAlater に浸漬しリアルタイム PCR 用サンプルとした。

（5）各種アッセイ

クレアチニンはクレアチニン測定キット(Jaffé 法)により測定した。PGE_2、PGE の代謝物(PGEM)および $PGF_{2\alpha}$の定量は市販キットを使用して測定した。アルブミンは免疫学的測定法(ELISA 法)により定量した。

（6）統計処理

統計処理は、2 群間の平均値の比較には Student t-test (有意水準 5％)を用い、3 群以上の平均値の比較には Tukey's HSD test あるいは Scheffé 検定(有意水準 5％)を用いて行った。

４．研究成果

（１）ヒト腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 におけるアルブミン誘発 PGE_2生成とその生成に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害剤の影響

本研究では、ヒト腎近位尿細管上皮細胞由来 HK-2 細胞を用いて、ヒト血清アルブミン曝露に伴う PGE_2生成の経時変化を調べるとともに、その PGE_2生成に及ぼすシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤の影響について検討を行った。

まず、HK-2 細胞における脂肪酸結合型ヒトアルブミン[FA(+)HSA]（脂肪酸を除去していない通常型）処理が PGE_2 生成に及ぼす影響について検討した。その結果、脂肪酸除去型ヒト血清アルブミン[FA(-)HSA]処理では PGE_2 生成に変化は見られないものの、脂肪酸結合型ヒト血清アルブミン処理（48 時間）では処理濃度依存的に PGE_2 生成が増加した。次に、PGE_2 生成に及ぼすアルブミン処理時間（20 mg/mL）の影響について検討した。その結果、FA(-)HSA 処理では処理後 1 時間以降では PGE_2 生成に変化は見られなかったものの、FA(+)HSA 処理では FA(-)HSA 処理に比べて有意に高値であるとともに、処理時間依存的に PGE_2 生成が増加した。次に、FA(+)HSA 処理における PGE_2 生成に及ぼす各種 COX 阻害剤の影響について検討した。その結果、FA(+)HSA 処理

条件下における PGE_2 生成量は、COX 阻害剤であるジクロフェナク、セレコキシブの併用によって顕著ではないものの有意な減少が見られた。一方、インドメタシン、イブプロフェンでは有意差は検出されないものの、減少傾向が観察された。次に、HK-2 細胞における COX mRNA 発現に及ぼす FA(+)HSA および FA(-)HSA の影響を解析した。その結果、構成型 COX である COX-1 mRNA 発現においては、いずれの処理群においても対照群と比べて顕著な変化は見られなかった。一方、誘導型 COX である COX-2 mRNA 発現は、対照群や FA(-)HSA 群に比べて、FA(+)HSA 処理群において上昇傾向が見られた。また、本リアルタイム PCR 解析で得られた対照群の Ct 値は、COX-1 mRNA で 26.0±0.1 (n=3)、COX-2 mRNA で 33.6±0.1 (n=3)であった。この結果より、HK-2 細胞において COX-2 に比べて COX-1 の mRNA が量的に多いことが示唆された。

以上の結果より、HK-2 細胞においてアルブミンに結合している脂肪酸から PGE_2 が生成されることが見出された。また、アルブミン曝露に伴う腎近位尿細管上皮細胞における PGE_2 生成には、少なくとも一部 COX が関与する可能性が示唆された。

（2）ヒト腎近位尿細管細胞株 HK-2 におけるアルブミン曝露による HIF-1 活性化に及ぼすプロスタグランジントランスポーター阻害剤の影響

本研究では、アルブミン誘発 HIF-1 の活性化におけるプロスタグランジントランスポーター（PGT）の関与について検討した。そこで、典型的 HIF-1 標的遺伝子産物 GLUT1 を反映したグルコース取り込み輸送、HIF-1 関連遺伝子および PGT の mRNA 発現変動および PGE_2 生成に対して、PGT 阻害剤として知られているブロモクレゾールグリーン(BCG)の影響を検討した。まず、アルブミン誘発 GLUT 活性に及ぼす BCG の影響を検討した。その結果、BCG 共存によりアルブミン誘発 GLUT 活性の上昇は増強する傾向が観察された。次に、GLUT1 および HIF-1α mRNA 発現に及ぼす BCG の影響を検討した。その結果、BCG 共存は、アルブミン処理（48 時間）によって上昇した GLUT1 および HIF-1α mRNA 発現のいずれにおいても、明確な変化は観察されなかった。

以上、PGT 阻害剤 BCG は、アルブミン誘発 GLUT 活性上昇を増強する傾向がみられた一方で、アルブミンによって上昇する GLUT1 や HIF-1α の mRNA 発現変動および PGE_2 生成には明確な変化は認められなかった。アルブミン誘発 HIF-1 活性化における PGT の関与については、種々の処理時間で検討する等、さらなる解析を行う必要があるものと考えている。

（3）腎障害性薬物アドリアマイシン投与マウスの尿中排泄におけるアルブミンとプロスタグランジンの相関解析

本研究では、アドリアマイシン(ADR)誘発アルブミン尿発症マウスを用い、腎障害過程におけるアルブミン尿中排泄量と PGE_2 量の相関解析を行った。すなわち、ADR 投与後 14 日までの尿中 PGE_2 量の経日変化を評価した。また、PGE_2 は体内において速やかに不活性型の代謝物に変換されることから、PGE_2 生成量をより総括的に評価するため、尿中における PGE 代謝物(PGEM)の測定を行った。さらに、尿中 $PGF_{2\alpha}$ の排泄変動についても検討を行った。

<u>体重、摂餌量、飲水量および尿量に及ぼす ADR 投与の影響</u>

体重変化については有意な体重の減少はみられず、また摂餌量についても両群に差はみられなかった。尿量や飲水量も各群間に有意な差は認められなかった。

<u>血清クレアチニンおよび血清アルブミンに及ぼす ADR 投与の影響</u>

腎機能マーカー血清クレアチニン値に及ぼす ADR 投与の影響について検討した。その結果、対照群に比べて ADR 群では、血清クレアチニン値は有意な差はないものの増加する傾向が認められた。一方、血中アルブミン値については、day14 において ADR 群では対照群と比較して、有意差は検出されないものの、やや減少傾向が認められた。

<u>尿中アルブミン量に及ぼす ADR 投与の影響</u>

尿中へのアルブミン排出量の変動については、尿中クレアチニン量で補正した尿中アルブミン/クレアチニン比を算出することで評価した。まず、day0 における尿中アルブミン/クレアチニン比については、両群においてほぼ同程度の値であることが確認された。ADR 投与後 day7 および day14 において、ADR 群は対照群と比較して尿中アルブミン/クレアチニン比は上昇傾向を示し、特に ADR 投与後 day14 においては、day0 と比較して有意な増加を認めた。これらの結果から、ADR 投与が糸球体から尿中へのアルブミン漏出を誘発することを認め、本病態マウスが本解析を進めていくうえで妥当な実験モデルであることが示された。

<u>ADR 投与後における尿中 PGE_2/クレアチニン比の経日変化</u>

尿中 PGE_2 量については、尿中クレアチニン量で補正することで評価を行った。その結果、対照群では、day7 および day14 において、day0 と比較して尿中 PGE_2/クレアチニン比の有意な差は見られなかった。一方、ADR 群においては、day7 および day14 のいずれにおいても、有意ではないものの day0 と比較して尿中 PGE_2/クレアチニン比が増加する傾向が観察された。

ADR 投与後における尿中 PGEM/クレアチニン比の経日変化
尿中 PGE_2 量と同様に尿中 PGEM についても尿中クレアチニン量で補正することで評価した。その結果、対照群と ADR 群を比較すると、尿中 PGEM/クレアチニン比は day7 において有意な差が見られた。また、ADR 群において day0 と比較した場合においても、day7 で有意な増加が見られた。day14 においても PGE_2 と同様に day0 と比較し増加傾向が見られたが有意な差としては検出されなかった。

ADR 投与後における尿中 $PGF_{2\alpha}$/クレアチニン比の経日変化
Day0、7、14 で採取した尿サンプルを用いて対照群と ADR 群において $PGF_{2\alpha}$ 排泄量を測定し、クレアチニン量で補正を行い評価した。その結果、ADR 群において尿中アルブミン排泄量の増大に伴って、尿中 $PGF_{2\alpha}$/クレアチニン比は増加する傾向が観察された。

HIF-1 関連腎線維化遺伝子 mRNA 発現に及ぼす ADR 投与の影響
Day14 で摘出した腎サンプルを用いて、対照群と ADR 群における HIF-1 関連腎線維化遺伝子の mRNA 発現を解析した。その結果、VEGF mRNA 発現は対照群に比べ、ADR 群において有意に低下した。また CTGF および LOX の mRNA 発現は ADR 群において低下する傾向が見られた。これらの遺伝子発現の変動については、ADR 投与後 day14 においてのみの解析であるため、異なる投与後の日数における発現変動についても検討を進める必要があるものと考えている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Minori Nakatsuji, Yumiko Urakami-Takebayashi, Sae Miyadokoro, Toyoaki Ikeda, Ikki Takehara, Hongxin Sun, Hideyuki Motohashi, Yoshio Ohno, Junya Nagai	４．巻 530
２．論文標題 Fatty acids bound to albumin induce prostaglandin E2 production in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	６．最初と最後の頁 273～277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 永井純也、濱口真歩、津田裕里、足立瑠衣、山口大輝、竹林裕美子、本橋秀之、大野芳正
２．発表標題 アルブミン曝露による腎近位尿細管上皮細胞HIF-1活性化におけるPGE2の役割
３．学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 濱口真歩、津田裕里、足立瑠衣、山口大輝、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
２．発表標題 腎近位尿細管上皮細胞株HK-2におけるアルブミン曝露によるHIF-1活性化に及ぼすプロスタグランジントランスポーター阻害剤の影響
３．学会等名 日本薬剤学会第37年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 足立瑠衣、山口大輝、中逵 穂、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
２．発表標題 腎近位尿細管上皮細胞株HK-2におけるアルブミン誘発HIF-1活性化とPGE2受容体の関与
３．学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
４．発表年 2021年

１．発表者名 大西未企代、落合春香、西脇　唯、吉川由理佳、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
２．発表標題 アドリアマイシン誘発アルブミン尿発症マウスにおける腎HIF-1発現と尿中PGE2排泄量の変動
３．学会等名 日本薬剤学会第36年会
４．発表年 2021年

１．発表者名 落合春香、大西未企代、西脇　唯、吉川由理佳、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
２．発表標題 アドリアマイシン誘発アルブミン発症マウスにおける尿中PGE2排泄量の変動
３．学会等名 日本薬学会第141年会
４．発表年 2021年

１．発表者名 中逵 穂、池田豊聡、宮所冴衣、竹林裕美子、本橋秀之、永井純也
２．発表標題 アルブミン曝露に伴う腎近位尿細管細胞におけるPGE2生成とHIF-1活性化
３．学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.oups.ac.jp/academics/lab/pharmaceutical.html

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