

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591024

研究課題名（和文）脂質転送蛋白と脂質応答性転写因子の腎線維化抑制作用の解析と新規治療薬の探索

研究課題名（英文）Investigation for anti-renal fibrotic effects of lipid-binding proteins and lipid-activated nuclear receptors and search for new therapeutic reagents

研究代表者

木村 秀樹（KIMURA HIDEKI）

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：20283187

研究成果の概要（和文）：

腎障害の進行過程で主たる炎症の場となる近位尿細管細胞とメサンギウム細胞に、機能的なペロキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)- δ , γ 蛋白の発現を確認した。アンジオテンシンII受容体阻害薬であるテルミサタンはPPAR活性化作用を有し、標的遺伝子である脂肪酸結合蛋白(FABP),肝X受容体等の発現を誘導するとともに、単球走化性蛋白-1(MCP)-1産生を抑制し抗炎症作用を呈した。PPARの配体の転送蛋白であるFABPを過剰発現するマウス尿細管細胞では、PPAR- α 発現が増強し、MCP-1産生が抑制された。以上より、PPAR,FABPの機能・動態に影響しうる活性化物質は、慢性腎臓病の新規治療薬の可能性があると推測された。

研究成果の概要（英文）：

Presence and activities of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- δ and γ were confirmed in human proximal renal tubular epithelial cells and mesangial cells which inflammatory insults targeted mainly during progression of renal injury. An angiotensin II receptor blocker, telmisartan was shown to have PPAR- δ and γ -induced transcriptional activities and increase expression of their target genes such as fatty acid-binding protein (FABP) and liver X receptor. Telmisartan also decreased gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In the mouse immortalized proximal renal tubular cell line with over-expression of human liver-type FABP, a putative transporter of PPAR ligands, mouse PPAR- α was up-regulated and MCP-1 down-regulated. These results suggest that some bioactive molecules with a potential to affect function and dynamism of PPAR and FABP are candidates of new therapeutic reagents for chronic kidney disease.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学 ペロキシソーム増殖剤応答性受容体 脂肪酸結合蛋白 尿細管上皮細胞
メサンギウム細胞 炎症 アンジオテンシンII受容体拮抗薬

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管上皮細胞は主たる腎実質細胞であり、炎症・低酸素刺激に反応して、TNF- α , CTGF, PDGF, ケカイン, VEGF などの炎症・線維化誘導因子を産生し、尿細管間質領域の線維化と周囲血管の新生に関連し、腎障害の進展に重要な役割を果たす (JASN, 2006)。また、メサンギウム細胞は糸球体構成細胞であり、炎症性サイトカインに反応して細胞外基質を産生し、糸球体硬化の中心的役割を果たす。一方、脂質応答性転写因子であるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は、脂質代謝に関与するだけでなく、炎症性転写因子の抑制を介して免疫担当細胞に抗炎症作用を示し、組織の線維化を抑制する (PNAS, 2003; NDT, 2007)。また、PPAR の標的遺伝子である脂肪酸結合蛋白 (FABP) は、脂質の抗酸化作用を有し、その発現増強はマウスやヒトの組織保護作用を誘導すると推測されている (Kidney Int, 2008)。また、FABP は、PPAR 発現の調節を介してリンパ球の分化・免疫応答にも影響する (J Immunol, 2009)。以上の知見から、PPAR やその関連遺伝子である FABP は、腎実質細胞である尿細管細胞、メサンギウム細胞においても、炎症・線維化に対して保護的に作用する可能性が推察される。

近年、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の一つである telmisartan (Telm) が PPAR 活性化作用を有する可能性が注目されている (Hypertension, 2004, 2010)。腎実質細胞に於いて、ARB を含む PPAR の活性化薬がどのような作用を示すかを解析することは、慢性腎障害を管理する上で重要な情報となる。

2. 研究の目的

(1) ヒト近位尿細管上皮細胞 (HPTEC) とヒトメサンギウム細胞 (HMC) において、内因性の機能的 PPAR 蛋白が存在するか否かを解析し、次に、線維化惹起性サイトカイン刺激と低酸素刺激下での PPAR を含む脂質応答性転写因子の発現動態を検討する。さらに、同転写因子の活性化による抗炎症作用・抗線維化作用の有無を検討する。

(2) FABP の抗炎症作用を検証するため、ヒト L-FABP ゲノム遺伝子導入のマウス近位尿細管細胞株 (FABP-mProx) と対照細胞株 (mProx) を用いて、両細胞の炎症への反応を比較する。

3. 研究の方法

HPTECs (三光純薬; 第 3-5 継代細胞) と HMC

を 12-well plate で REGM (増殖培地; 三光純薬) を用いコンフルントまで培養する。その後、0.5%FBS 含有 DMEM で 24 時間静止培養後、サイトカインあるいは低酸素で 24-48 時間刺激し、その総 RNA と上清を解析する。TNF- α は 10ng/ml, TGF- β は 25pg/ml で使用し、低酸素 (1%O₂) 環境は、1%O₂, 5%CO₂, 94%N₂ の混合ガスと低酸素チャンバー (Billups-Rothenberg 社製) で作製した。mProx は C57BL/6J マウスの近位尿細管細胞を SV40 処理して作製し、同細胞株に転写領域を含んだヒト L-FABP ゲノム遺伝子 (5360bp) を導入して FABP-mProx を作製した。K1 倍地を用いて培養し、上記と同様に刺激実験を行った。mProx の刺激には、mouse TNF- α (5 ng/ml) を用いた。

(1) PPAR 発現とその機能の検討

各種細胞における PPAR- α , δ , γ mRNA 量を Real time PCR 法で、同蛋白量を Western blot 法で検出した。PPAR の機能発現の評価としては、標的遺伝子として L- α -H-FABP, LXR- α の mRNA 発現の変動を検討した。また、TNF- α , TGF- β 刺激下で PPAR, FABP, LXR- α 発現の変動を検討した。

(2) PPAR 活性化作用の評価

PPRE-luc を細胞にリポフェクションで導入後 24 時間に、各種 PPAR 活性化薬を添加して、PPRE 活性を測定した。PPAR- α 活性化薬としてパルミチン酸 (30 μ M)、PPAR- δ 活性化薬として GW516 (10 μ M) を、PPAR- γ 活性化薬として Pioglitazone (Pio; 3 μ M) と 15d-プロスタグランジン J2 (PGJ2; 5 μ M) を、推定される PPAR- δ , γ 活性化薬として Telm (1, 10 μ M) を用いた。PPAR- δ の特異的阻害は GSK-0660 を 1 μ M、PPAR- γ の特異的阻害薬は GW9662 を 2.5 μ M で使用した。

(3) 各種遺伝子発現と蛋白発現の検討

各種細胞における FABP、肝 X 受容体 (LXR)- α , レチノイド受容体 (RXR), PAI-1, VEGF-C, MCP-1 の mRNA 発現を real time PCR 法 (ABI 社; Gene Expression assay) で測定。同蛋白量は、PPAR については Western blot 法 (細胞破砕液) で、PAI-1, VEGF-C, MCP-1 は上清について免疫比濁法あるいは ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト近位尿細管上皮細胞 (HPTEC) での PPAR- α , δ , γ 機能の解析

HPTEC において、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)- α , β , γ の mRNA 発現を認め、PPAR- γ , δ 蛋白発現を確認した。PPAR- α 活性化薬のパルミチン酸 (30 μ M)、PPAR- δ 活性化薬の

GW516 (10 μ M)、PPAR- γ 活性化薬のピオグリタゾン (Pio: 3 μ M) と PGJ2 (5 μ M)、アンギテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) であるテルミサルタン (Telm: 10 μ M) は pPPRE-TK-luc の活性を増強し、Pio、PGJ2 の活性は PPAR- γ 阻害薬 GW9662 で、Telm の活性は PPAR- δ 阻害薬 GSK0660 で特異的に阻害された (図 1)。また、Pio、GW516、Telm は、PPAR の下流遺伝子である心型 (H-)・肝型 (L-) 脂肪酸結合蛋白 (FABP)、LXR- α の mRNA 発現を増強した。

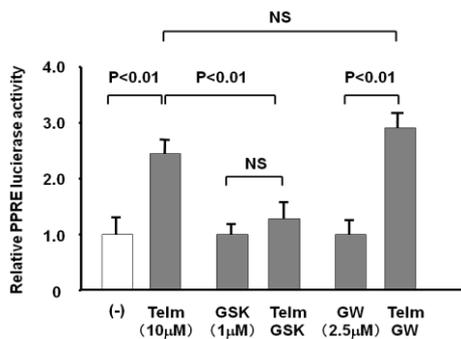


図 1. Telm は PPAR- δ を介して PPRE-luc 活性を増強する。GSK: PPAR- δ 阻害薬, GW: PPAR- γ 阻害薬

(2) ヒトメサンキウム培養細胞 (HMC) での PPAR- α, δ, γ 機能の解析

HMC において、PPAR- α, β, γ の mRNA 発現を認め、PPAR- γ, δ 蛋白発現をイムノブロット法で確認した。GW516 (10 μ M)、Pio (3 μ M)、Telm (10 μ M) は pPPRE-TK-luc の活性を増強し、Pio の活性は PPAR- γ 阻害薬で、Telm の活性は PPAR- δ, γ 阻害薬で特異的に阻害された。また、GW516、Telm は、PPAR の下流遺伝子である H-FABP、LXR- α の mRNA 発現を増強し、LXR- α 発現の増強は PPAR- δ 特異的阻害薬 (GSK-0660) で抑制された。Telm は、HMC において TGF- β (25pg/ml) 誘導性の PAI-1、TGF- β 発現を抑制し、その抑制作用には PPAR- δ が介在する可能性があった。

(3) 刺激下での HPTEC の FABP、PPAR、RAR、FXR 発現動態と PPAR 活性化の抗炎症・抗線維化作用の検討

48 時間の低酸素刺激で、PPAR- γ mRNA 発現が高度 (50%以上) に減少し、PPAR- α, β と RXRs は軽度 (20-30%) に減少し、RARs と FXR

の発現量は不変であった (cDNA アレイ解析)。TNF- α (10 ng/ml) あるいは TGF- β (5 ng/ml) は、PPAR- γ 、H-・L-FABP、LXR- α の mRNA 発現を抑制した。L-FABP 発現ベクターで HPTECs に十分な L-FABP の発現を誘導したところ、PGJ2 による PPRE 活性亢進が約 20%程度増強した。Pio と Telm は、基底状態の MCP-1 発現と PAI-1 発現を抑制したが、PPAR 作用を有さない ARB であるエポサルタン (10 μ M) は、PAI-1 発現を抑制しなかった。Telm は、TGF- β 誘導性の PAI-1 発現と TNF- α 誘導性の VEGF-C 発現を 20-30%程度抑制し (図 2)、後者のシグナル経路の解析では、ERK 経路ではなく p38MAPK 経路を介している可能性があった。さらに、ファルネチド X 受容体 (FXR) 活性化薬で GW4064 は、基底状態、TNF- α 誘導性の MCP-1 と VEGF-C 発現を抑制しなかったが、基底状態の PAI-1 発現を抑制した (図 3)。以上の知見より、上記の薬剤は本来の作用以外の多面的薬理作用で、抗炎症・抗線維化作用を呈することが想定された。

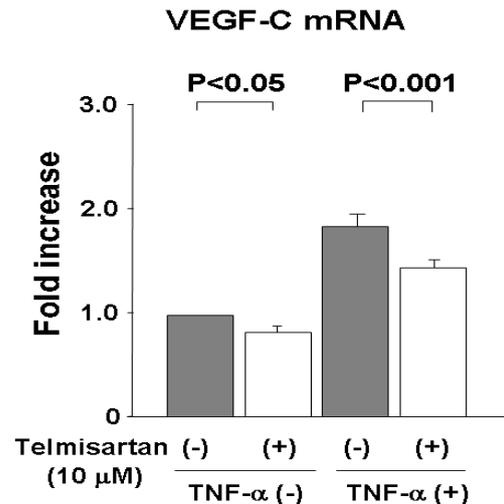


図 2. Telm は TNF- α 誘導性 VEGF-C 発現を抑制する。

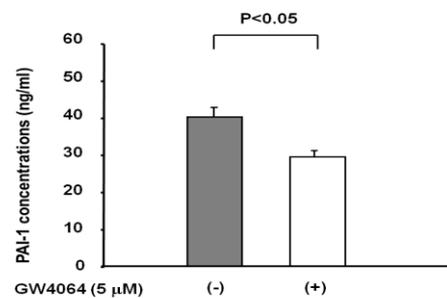


図 3. FXR 活性化薬の GW4064 は HPTEC において基底状態の PAI-1 発現を抑制する。

(1)-(3)の結果より、ヒト腎実質細胞には機能性 PPAR が存在することが判明した。また、ARB である Telm はその多面的作用として PPAR- δ , γ 活性化作用があり、抗炎症作用も有していた。

(4) FABP 過剰発現マウス近位尿細管上皮細胞における FABP、PPAR 発現動態と炎症性サイトカインへの反応性の検討

マウス近位尿細管上皮細胞 (mProx) にヒト L-FABP のゲノム遺伝子を導入した L-FABP-mProx では、パルミチン酸による PPRE 活性亢進が約 60%程度増強し、PPAR- α mRNA が約 10 倍に、マウス L-FABP が 30 倍に増加した。また、L-FABP-mProx では、既定状態、TNF- α 誘導性の MCP-1 発現が mProx に比して、有意に低下した(図 4)。この結果は、FABP 発現の増強が PPAR 発現にも影響し、抗炎症作用を誘導する可能性を示していると考えられた。

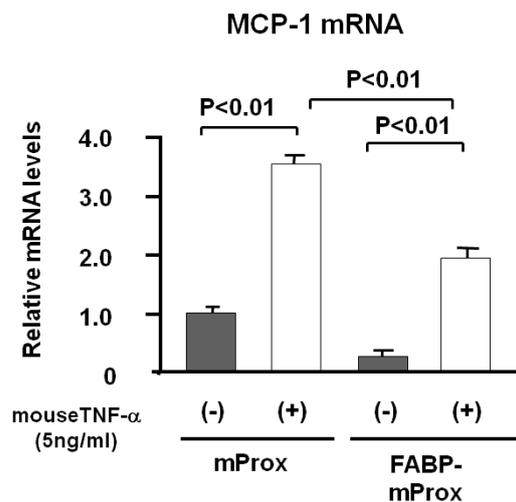


図 4. FABP-mProx では、mProx に比して TNF- α 誘導性 MCP-1 発現が減弱する。

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 7 件)

- ① Takahashi N, Kimura H, (他 12 名、2 番目): Severe intraglomerular detachment of podocytes in a Gitelman syndrome patient. Clin Exp Nephrol. 2012 Apr 7. [Epub ahead of print] (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2484642>
- ② Kimura H, Miyazaki R (他 8 名、1 番目):

Smaller low-density lipoprotein size as a possible risk factor for the prevalence of coronary artery diseases in haemodialysis patients. Nephrology 16:558-566, 2011 (査読有)

DOI: 11/j.1440-1797.2011.01454.x.

- ③ Kimura H, Li X (他 7 名、1 番目): Glucocorticoid enhances hypoxia- and/or transforming growth factor- β -induced plasminogen activator inhibitor-1 production in human proximal renal tubular cells. Clin Exp Nephrol. 15:34-40, 2011 (査読有)

DOI: 07/s10157-010-0351-7

- ④ Kasuno K, Kimura H, (他 6 名、2 番目): Clinical application of urinary redox regulating protein, thioredoxin. J J Clin Pathol 59:189-195. 2011 (査読無)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1476306>

- ⑤ Takahashi N, Kimura H (他 9 名、2 番目): Tubulointerstitial nephritis with IgM-positive plasmacytoid large lymphocyte infiltration in a patient with primary biliary cirrhosis and Sjögren's syndrome. Clin Nephrol, 74, 74-80, 2010 (査読有)

DOI: 5414/CNP74074

- ⑥ Takahashi N, Kimura H (他 9 名、2 番目): Acute on chronic subdural hematoma as a rare complication in a microscopic polyangiitis patient receiving antithrombotic treatment. Clin Nephrol, 72, 211-215, 2009 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761727>

- ⑦ Kimura H, Li X, Torii K (他 9 名、1 番目): Dexamethasone enhances basal and TNF-alpha-stimulated production of PAI-1 via the glucocorticoid receptor regardless of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 status in human proximal renal tubular cells. Nephrol Dial Transplant 24, 1759-1765, 2009 (査読有)

DOI: 10.1093/ndt/gfn756

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kimura H, (他 6 名、1 番目): Overexpression of Human Liver-Fatty Acid-Binding Protein endogenously Enhances Peroxisome Proliferator Activated Receptor- α Activity possibly via inducing Hepatocyte Nuclear Factor-4 α in Immortalized Mouse Proximal Renal Tubular Cells. The annual meeting of American Society of

Nephrology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, November 8-13, 2011

- ② Kimura H. (他 6 名、1 番目): Discrete Regulation of VEGF-A and -C in Human Proximal Renal Tubular Cells under Hypoxic and/or Inflammatory Conditions. Inhibitory Effects of Glucocorticoids on Basal and Inducible VEGF Expression. The annual meeting of American Society of Nephrology, Denver, Colorado, USA, November 16-21, 2010
- ③ Kimura H. (他 9 名、1 番目): LDL size reduction as a possible risk factor for the prevalence of coronary artery diseases in hemodialysis patients. The annual meeting of American Society of Nephrology, Denver, Colorado, USA, November 16-21, 2010
- ④ Kimura H. (他 8 名、2 番目): Acceleration of diabetic glomerulopathy in db/db mice in chronic hypoxia. The annual meeting of American Society of Nephrology, Denver, Colorado, USA, November 16-21, 2010
- ⑤ Kasuno K., Kimura H. (他 7 名、5 番目): Urinary thioredoxin is a quick and predictive biomarker of acute kidney injury. The annual meeting of American Society of Nephrology, Denver, Colorado, USA, November 16-21, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 秀樹 (KIMURA HIDEKI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：20283187

(2) 研究分担者

吉田 治義 (YOSHIDA HARUYOSHI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：80135574
(H21→22：退職)

糟野 健司 (KASUNO KENJI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：60455243

菅谷 健 (SUGAYA TAKESHI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：40381561