

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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590238

研究課題名（和文）PPAR α アゴニストを利用した新たな慢性腎臓病治療法の開発研究課題名（英文）Development of the novel therapy against chronic kidney disease that utilizes PPAR α agonist

研究代表者

上條 祐司 (KAMIJO YUJI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50377636

研究成果の概要（和文）：

本研究は、腎障害動物モデルに PPAR α アゴニストを投与することで、糸球体および尿細管保護効果を示すか検討し、ヒトへの臨床応用の前段階としての有益な基礎情報を得ることを目的とした。2011 年に腎内 PPAR α の活性化が蛋白尿による尿細管毒性を抑制できること、2012 年には、ラット Thy1 腎炎において腎内 PPAR α 活性化により糸球体腎炎の病勢が抑制されることを発表した。これらの研究成果から、PPAR α 活性化は腎細胞保護に有益であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To obtain basic information for clinical utilization of the PPAR α agonist-utilizing therapy, we investigated the glomerular and tubular protective effects of PPAR α activation by using experimental animal model of kidney diseases. In 2011, we published that treatment of clofibrate, a representative PPAR α agonist, exerts tubular protective effects against tubular damages caused by proteinuria. In 2012, we also reported that the maintenance of PPAR α activation via PPAR α agonist administration attenuated the disease activity of Thy1 glomerulonephritis, a most famous rat model of mesangium proliferative glomerulonephritis. These results suggest that renal PPAR α activation exerts glomerular and tubular protective effect in various experimental model of kidney diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
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：基礎医学・薬理学一般

キーワード：腎臓、慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病（CKD）は、①罹患率が極めて高いこと（成人人口の 10 % 程度）、② CKD 患者は増加し続ける血液透析患者予備軍であると同時に心血管病発症の高リスク群

であり極めて生命予後が不良であることが判明したため、世界的にも注目を集めている。CKD の進展メカニズムや CKD 対策に関する研究は精力的に行われているが、CKD の最終段階である末期腎不全患者は増加し続けてお

り、現状の治療やCKD対策のみでは不十分であることが考えられる。よって、より効果的な新たな治療法の開発が必要と思われる。

様々な研究結果から、

(1) CKDの原疾患としては、糸球体性疾患が多いこと、

(2) 糸球体性疾患においてメサンギウム細胞の活性化が病態形成に関与していること、

(3) 糸球体障害により生じた蛋白尿は尿細管・間質障害を引き起こす可能性があること、

(4) 尿細管・間質障害の程度がCKDの予後と強く相関すること、が判明している。

我々は、PPAR α 遺伝子欠損マウスの腎病変の解析により、

(1) PPAR α 欠損により、糸球体腎炎が炎症反応と酸化ストレスの増加を介し悪化すること (Kamijo Y et al. J Am Soc Nephrol 18: 176-188, 2007)

(2) 活性化メサンギウム細胞では、PPAR α の活性化はNF κ B炎症経路の抑制を介して抗炎症作用を発揮すること

(Kono K, Kamijo Y et al. Am J Physiol-Renal-Physiol 296: F328-F336, 2009)

(3) PPAR α は尿細管細胞の脂肪酸代謝を支配し、脂肪酸代謝の恒常性維持と正常な尿細管機能の発現に必要であること (Kamijo Y et al. J Am Soc Nephrol 13: 1691-1702, 2002)

(4) 大量の脂肪酸が蛋白尿と共に尿細管に負荷されるprotein overload nephropathyにおいて、PPAR α の欠損により脂肪酸代謝の恒常性が破綻し代謝不全脂肪酸による尿細管毒性が出現すること、そして脂肪酸毒性発揮過程において、酸化ストレス、アポトーシス、炎症が増強し、尿細管障害が悪化すること (Kamijo Y et al. J Am Soc Nephrol 18: 3089-3100, 2007) を報告してきた。

これらの研究結果はCKDの進展過程においてPPAR α アゴニストによるPPAR α の活性化が、糸球体内炎症を抑制する可能性や、蛋白尿に伴う脂肪酸毒性に対し脂肪酸代謝の恒常性の維持・抗酸化ストレス作用・抗アポトーシス作用・抗炎症作用を介し尿細管保護的に機能する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、PPAR α アゴニストによる新たなCKD治療の開発にむけ、PPAR α アゴニストによる腎実質細胞のPPAR α 活性化が糸球体・尿細管保護作用を発揮するか動物実験を用いて明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

①尿細管障害モデルとしては、マウスを用い

たprotein-overload nephropathyを選択した。大量のウシ血清アルブミンを腹腔内に投与し高蛋白血症を作ること、腎前性の要素により尿蛋白を惹起することが可能となる。糸球体障害の関与なしに蛋白尿と尿細管障害の関係を検討することのできる確立した動物実験モデルである。

②糸球体障害モデルとしては、ラットThy1腎炎を選択した。ラットThy1腎炎は確立したメサンギウム増殖性腎炎ラットモデルであり、その進展過程においてメサンギウム細胞の活性化や形質転換が起こることが知られている。

両動物実験モデルとも、PPAR α アゴニストとしては主にクロフィブラートをを用いた。フィブラート投与群と非投与群(コントロール群)に分けて検討を行った。また、クロフィブラート以外のPPAR α アゴニストとしては、ベザフィブラート、フェノフィブラートも用いた。用量依存性の尿細管保護効果また糸球体保護効果を確認するために、それぞれの薬剤に対し、低用量群、中等用量群、高用量群の用量別グループを作成し解析した。また、PPAR α 依存性の腎保護効果の検証のために、マウスモデルに関しては、PPAR α 遺伝子欠損マウスを用いた検討も行った。

両モデルとも、尿量変化、血圧変化、体重変化、尿蛋白量変化、病理学的変化(光顕、電顕、蛍光抗体所見)を経時的に観察することで、PPAR α アゴニストの腎保護効果について確認した。

腎障害惹起後、経時的に各群から6匹ずつ無作為抽出し、血清・腎皮質・糸球体サンプルを採取し、分子的解析を行うことで、腎保護効果メカニズムの解明を行った。

分子生化学的解析項目としては、

(1) PPAR α 活性変化については、核蛋白を用いたimmunoblot法、real-time PCR法を用いたmRNAの発現変化(PPAR α 及びその標的遺伝子群)、PPRE(PPAR結合DNA部位)固相化マイクロプレートを用いたELISA法によるPPAR α の転写活性測定などの検査法により検討した。

(2) 炎症伝達経路としては、主にNF κ B経路について検討した。具体的には、核蛋白を用いたimmunoblot法によるNF κ B蛋白の発現変化、real-time PCR法を用いたI κ B α 及びNF κ B標的遺伝子群の発現変化、NF κ B結合DNA固相化マイクロプレートを用いたNF κ B転写活性変化について検討した。

(3) 脂肪酸代謝変化については、腎組織内脂肪酸含有量を比色定量法、脂肪酸代謝酵素

群の発現及び機能変化について immunoblot 法および real-time PCR 法にて解析した。

(4) 酸化ストレス変化の解析については、脂質過酸化マーカーおよび DNA 酸化マーカーに対して、比色定量法や免疫組織化学法にて解析した。

また、NADPH oxidase・酸化ストレス消去酵素群の発現について immunoblot 法および real-time PCR 法にて確認した。

(5) アポトーシス変化については、TUNEL 染色法にてアポトーシス細胞の出現の有無を検討した。また、Bcl-2 family 蛋白質群の発現変化について immunoblot 法、real-time PCR 法にて確認した。

(6) 炎症変化については、炎症細胞浸潤の有無を組織学的に確認した。

4. 研究成果

2011 年には、PPAR α 作動薬であるクロフィブラートの尿細管毒性抑制作用について発表した (Takahashi K et al. Toxicol Appl Pharmacol, 252:237-49, 2011)。

以下に成果の要点について述べる。

コントロール群に比較し、フィブラート投与群では、protein-overload nephropathy における脂肪酸毒性による急性尿細管障害は軽減されていた。

急性尿細管障害時には、PPAR α の発現量が低下し、PPAR α の転写能力が低下するため脂肪酸代謝能力が低下してしまうが、フィブラートにより PPAR α 発現量を維持することで、遊離脂肪酸の腎への流入減少、脂肪酸酸化機能の保持、過剰遊離脂肪酸の細胞内蓄積の減少が生じ脂肪酸代謝の恒常性が維持されることが判明した。それに加えて、酸化ストレス抑制蛋白質 (スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなど) の発現維持作用、アポトーシス抑制蛋白質である Bcl2, Bcl-xL の発現維持作用、NF κ B 抑制蛋白質である I κ B α の発現維持作用により、酸化ストレス・アポトーシス・炎症といった疾患進行要因がフィブラートにより軽減されたと考えられた。

このような効果は、他の種類のフィブラートでも認められたこと、また PPAR α 遺伝子欠損マウスでは効果が認められなかったことから、PPAR α 依存性の作用と考えられた。しかしながら、興味深いことに、高用量のフィブラート投与の場合や、PPAR α 欠損マウスの場合には、クロフィブラートは逆に腎障害を増加させる可能性があることも判明した。これらの事実は、フィブラートには用量により効果が変わる可能性があること、また PPAR α 非依存性の尿細管毒性を発揮する可能性があることを示唆している。つまり、フィブラートの有益な腎保護作用は、

PPAR α 依存性の尿細管保護効果が PPAR α 非依存性の尿細管毒性効果を上回る際に発現するという可能性が考えられた。

以上の結果から、腎疾患における治療として、フィブラートを用いる場合には、適切な投与量を確立することがとても重要になると考えられた。特に腎障害時には腎排泄性のフィブラートの場合に、血中濃度がかなり上昇するため注意が必要である。今後は、たとえ腎機能障害の存在下であっても、血清中の濃度が安定する新たな PPAR α 作動性薬を確立することの重要性が明白となった。

2012 年は、メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルであるラット Thy1 腎炎における糸球体障害に対して、クロフィブラートの効果について検証した (Hashimoto K et al. PPAR Res, 976089, 2012)。

以下に成果の要点について述べる。

抗 Thy1 腎炎を惹起後、全ての群で尿蛋白の急速な増加を認めたが、フィブラート投与群では用量依存的に尿蛋白が減少していた。

また、抗 Thy1 腎炎を惹起後、全ての群で高度な腎炎所見 (メサンギウム増殖、メサンギウム融解、糸球体血管瘤形成、管外増殖) が認められたが、フィブラート投与群では用量依存的に病理学的腎炎所見が抑制された。

コントロール群では、抗 Thy1 腎炎惹起に伴い、PPAR α の PPRE 結合能低下および PPAR α 標的遺伝子の発現低下を認めたが、フィブラート投与群では、用量依存的に PPAR α 活性が強化され、抗 Thy1 腎炎が惹起されても、PPAR α の PPRE 結合能・PPAR α 標的遺伝子発現が保たれた。PPAR α 作動薬は、腎炎進行過程における PPAR α の機能劣化を防いだと考えられた。

また、コントロール群では、抗 Thy1 腎炎が惹起されるに伴い、NF- κ B の DNA 結合能が亢進し、NF- κ B の標的遺伝子である COX2, TNF α , ICAM1 の mRNA 発現が増加したが、フィブラート投与群では、PPAR α 活性化と同調し I κ B α が誘導され NF- κ B 経路が抑制された。

以上の結果から、メサンギウム増殖性腎炎モデルである Thy1 腎炎ラットモデルにおいて PPAR α 作動薬が尿蛋白を減少させ腎炎活動性病変を改善させること、また PPAR α 作動薬は腎炎進展の過程において生じる PPAR α の発現低下を防ぎ、糸球体内の PPAR α を活性化させることを示した。

過去の報告では、PPAR α 活性化は I κ B α の発現を亢進させ NF- κ B 経路を抑制する可能性が示されているが、抗 Thy1 腎炎においても PPAR α の活性化が NF- κ B 経路を抑制し糸球体内炎症を軽減する可能性が考えられた。この結果は PPAR α の活性化を介した糸球体腎炎治療の可能性を示唆している。

この研究ではクロフィブレートの高用量群においても、腎への悪影響を生じることなく抗腎炎効果を示すことができた。

クロフィブレート高用量による毒性は、PPAR α 非依存性の尿細管毒性と考えられるが、このモデルでは主に障害部位が糸球体であり尿細管は大きな障害を受けないため、顕著な尿細管毒性を呈さなかったと考えられる。

実際のヒトのCKD患者の場合には、腎機能障害時には糸球体障害のみならず尿細管間質障害を伴っていることが多いため、フィブレート製剤を腎炎治療に応用する際には適切な用量管理と注意深い経過観察が必要であると考えられる。

将来的には、尿細管毒性が無く腎障害時でも使用可能な薬物動態の安定したPPAR α 作動薬の開発が必要と思われた。

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3件)

① Hashimoto K, Kamiyo Y et al. PPAR α activation protects against anti-Thy1 nephritis by suppressing glomerular NF- κ B signaling. PPAR Res. 1-11, 2012, 査読あり。

doi: 10.1155/2012/976089.

② Kamiyo Y et al. Pharmacological and toxicological advances in PPAR-Related medicines. PPAR Res. 1-2, 2012, 査読あり。

doi: 10.1155/2012/940964.

③ Takahashi K, Kamiyo Y et al. Pretreatment by low-dose fibrates protects against acute free fatty acid-induced renal tubule toxicity by counteracting PPAR α deterioration. Toxicol Appl Pharmacol. 252:237-49, 2011, 査読あり。

doi: 10.1016/j.taap.2011.02.012.

[学会発表] (計3件)

① Hashimoto K, Kamiyo Y et al. PPAR α activation improves glomerular injury caused by anti-Thy1 nephritis through suppression of NF- κ B signaling. ASN Kidney Week 2012.11.2, San Diego, CA.

② 橋本幸始、上條祐司 他, PPAR α 活性化はNF- κ B系を抑制し腎炎における糸球体障害を軽減する, 第55回日本腎臓学会学術総

会, 2012.6.3. 横浜

③ 橋本幸始、上條祐司 他, PPAR α 活性化によるThy1腎炎の組織障害軽減効果, 2011.6.16. 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上條 祐司 (KAMIJO YUJI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50377636

(2) 研究分担者

青山 俊文 (AOYAMA TOSHIFUMI)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50231105