

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 11日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790791

研究課題名（和文） ONO-1301による慢性腎臓病進展抑制効果の検討及び作用機序の解明

研究課題名（英文） Clarification of suppressive effects of ONO-1301 on the progression of chronic kidney disease and its mechanisms

研究代表者

那須 達世（NASU TATSUYO）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70572741

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病（CKD）により末期腎不全に至り透析療法を必要とする患者は増加の一途をたどっている。ONO-1301は長時間作用型のプロスタサイクリン(PGI₂)アゴニストとトロンボキサン A2 阻害作用を有する。本研究では腎疾患動物モデルにて、ONO-1301による抗線維化、抗炎症効果、肝細胞増殖因子（HGF）誘導を介する尿細管間質線維化制御作用、2型糖尿病性腎症進展抑制作用を観察し得た。ONO-1301のCKD進展抑制における有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The number of patients with chronic kidney disease (CKD) requiring dialysis therapy is increasing. ONO-1301 is a long-acting prostacyclin (PGI₂) agonist and possesses thromboxane A2 synthase inhibitory effects. In the present study, therapeutic effects of ONO-1301 on tubulointerstitial injuries and diabetic nephropathy mediated via anti-fibrotic, anti-inflammatory and via inducing HGF, were observed, suggesting the potential of ONO-1301 in suppressing the progression of CKD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：慢性腎臓病、腎線維化、糖尿病性腎症、プロスタサイクリン、線維化、炎症

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病（CKD）は2002年に米国にて提唱されたが、末期腎不全への進展のみならず、心血管イベント発生の危険因子となる。

本邦においてCKDの進展によって末期腎不全から血液透析・腹膜透析に至る患者数は増加の一途をたどっている。さらに、透析導入の原疾患では糖尿病性腎症が第1位となっ

ている。従って、CKDの進展抑制のための有効な治療法の開発が急務である。

慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症など、様々な原疾患から末期腎不全に進展するが、共通した腎組織学的変化は糸球体硬化と尿細管間質線維化である。また、肝細胞増殖因子 HGF は線維化促進因子である TGF- β に拮抗的に作用して線維化を抑制するが、片側尿管結紮逆行性腎障害モデル、糖尿病性腎症モデル等における治療効果が報告されている。そして、腎間質線維化進展への上皮間葉系移行 (epithelial-to-mesenchymal trans-differentiation: EMT) の関与が報告されている。

ONO-1301 は構造的に安定な非プロスタノイド骨格の化合物で、長時間作用型のプロスタサイクリン (PGI₂) アゴニストとトロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素阻害作用による強力な抗血小板作用を有する。さらに、後年開発された徐放性製剤 SR-ONO は皮下もしくは筋肉内投与にて安定した血中濃度を示す。これまでに肺線維症モデルにおける線維化抑制効果、心筋梗塞モデルにおける左室拡張能改善効果、生存率の改善が報告されている。

ONO-1301 による治療効果の発現機序として、血管平滑筋細胞における ERK リン酸化抑制、間葉系細胞 (線維芽細胞など) からの HGF 発現誘導等が検討されている。これまでに、PGI₂ による糸球体硬化・間質線維化制御作用が腎疾患動物モデルにて報告されているが、SR-ONO による腎障害進展抑制効果については不明である。

2. 研究の目的

腎障害が進展する共通のメカニズムである尿細管間質線維化と、糖尿病性腎症による糸球体病変に対して ONO-1301 が抗線維化/HGF 誘導作用等を介し進展抑制効果を示す、との

仮説のもとに、本研究にて以下の検討を行う。

(1) マウス片側尿管結紮 (UUO) モデルを用い、ONO-1301 投与による尿細管間質線維化抑制効果の作用機序について検討する。

(2) ONO-1301 の尿細管間質線維化抑制作用機序として線維化促進因子 (TGF- β 、CTGF)、EMT (α -SMA、Snail)、組織修復因子 (HGF、BMP-7) 等の関与を検討し、HGF 誘導作用の重要性を抗 HGF 抗体同時投与により検証する。

(3) 2 型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) を用い、ONO-1301 投与による腎症治療効果を検討する。

(4) ONO-1301 の糸球体病変改善効果の機序として、培養メサンギウム細胞を用い、炎症・線維化関連因子や HGF 等への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス UUO モデルにおける ONO-1301 による治療効果/作用機序の検討

雄性 C57BL/6 マウスの左側尿管を結紮して UUO モデルを作成する。直後より SR-ONO を 3~10 mg/kg ずつ皮下投与する。結紮後、第 3、7 病日の時点で屠殺して左腎臓を摘出する。採取した左腎からは光顕用切片と凍結切片を作成し、また蛋白と RNA の抽出用にも供する。さらに、一部の実験群では、SR-ONO 投与に加えて中和型抗 HGF 抗体 (金沢大学松本教授より御供与、250 μ g/mouse) を腹腔内投与する。

- ① ONO-1301 血中濃度、腎重量、血圧測定
- ② 腎組織学的検討: 尿細管間質線維化の半定量的解析 (Masson 染色; 画像解析 software)
- ③ 腎免疫組織化学 (IHC): 間質型コラーゲン (I, III 型), 線維化進展因子 (TGF- β , CTGF)、単球/マクロファージ浸潤 (F4/80 免疫染色), ケモカイン (MCP-1, TNF- α), EMT (α -smooth muscle actin (SMA): myofibroblast に発現、FSP-1)
- ④ 組織修復因子・線維化抑制因子の発現変化の検討 (Western blot, real-time PCR,

IHC) : HGF

(2) マウス尿細管上皮細胞を用いたONO-1301の作用機序の検討

マウス尿細管上皮細胞 (mProx24) を基礎条件下にて培養し、ONO-1310 (1nM~1mM) 投与24~48時間後における各種因子/マーカーの発現変化を Western blot, 免疫染色, ELISA, real-time PCR にて検討する。

① 線維化関連因子: TGF- β , α -SMA, I, III, IV型コラーゲン, Fibronectin, FSP-1

② EMT 関連因子: 上皮系マーカー: E-cadherin, ZO-1, 間葉系マーカー: α -SMA, vimentin

(3) 2型糖尿病性腎症モデルにおけるONO-1301による治療効果の検討

2型糖尿病モデルである db/db マウスは視床下部のレプチン受容体を欠損し、7~8週齢に著明な高血糖、高インスリン血症を呈する。8週齢の同マウスに vehicle, SR-ONO (3または10mg/kg) を3週毎に皮下投与する。db/m マウスを正常血糖対照とする。投与開始後から2週間毎に血圧、血糖値と尿蛋白を測定し、8週後に採血後屠殺し腎臓を摘出して、以下の検討を行う。

① 腎機能 (24時間クレアチニンクリアランス)、尿中アルブミン・クレアチニン比、血糖値、血中インスリン、ONO-1301 血中濃度

② 腎組織学的検討: 糸球体容積、メサンギウム基質の定量的評価 (PAS 染色/Image analysis)

③ 免疫組織化学 (腎組織): ・糸球体内皮細胞領域 (CD31: 蛍光抗体法)、糸球体内マクロファージ浸潤 (F4/80: 酵素抗体法)、nitrotyrosine (酸化ストレス)

④ 組織修復・線維化関連因子・ケモカイン等の腎での発現変化: Western blot, real-time PCR: HGF, TGF- β , MCP-1, TNF- α , nitrotyrosine, MDA

(4) マウスメサンギウム細胞を用いたONO-1301の作用機序の検討

マウスメサンギウム細胞を高糖濃度条件下にて培養し、ONO-1301 投与24~48時間後における各種因子の発現変化を real-time PCR, Western blot 等にて検討する。対照には正常糖濃度とマンニトール(高浸透圧)を用いる。TGF- β , MCP-1, α -SMA, IV型collagenの発現変化について検討する。

4. 研究成果

(1) マウスUUOモデルにおけるONO-1301による治療効果/作用機序の検討:

C57BL/6マウスの左側尿管を結紮し、直後にSR-ONO (3-10mg/kg) を1回皮下投与した。結紮後7日の時点で、対照群では間質線維化、炎症細胞浸潤を認めたが、SR-ONO投与により有意に抑制された。さらに、間質FSP1陽性細胞数増加が抑制され、TGF- β 1発現増加、Smad2/3リン酸化がSR-ONO投与により有意に抑制された。抗HGF抗体投与によりSR-ONOによる治療効果は減少し、HGF産生を介する可能性が考えられた。培養尿細管上皮細胞 (mProx24) にて、TGF- β 1刺激下でのE-cadherin低下がONO-1301投与にて抑制され、EMT抑制効果が示唆された。

(2) 2型糖尿病性腎症モデルにおけるONO-1301による治療効果の検討:

自然発症2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスに8週齢よりSR-ONO 3 mg/kg体重を3週間毎に皮下投与した。16週齢にてアルブミン尿、糸球体肥大、メサンギウム基質増加、IV型コラーゲン蓄積、TGF- β 及び α -SMA発現増加、F4/80陽性単球浸潤、TNF- α ・MCP-1発現増加、nitrotyrosine/MDAの増加が、対照db/db群に比して、SR-ONO投与db/db群にて有意に抑制された。培養メサンギウム細胞において、高糖濃度下におけるIV型コラーゲン、TGF- β , α -SMA, fibronectin, MCP-1発現増加が

ONO-1301により抑制された。これらのONO-1301による効果はIPアンタゴニストCAY10449にて一部消失し、IP受容体を介する機序が示唆された。

上記結果について日本腎臓学会、米国腎臓学会にて発表を行い、活発な質疑が行われた。今後、さらに詳細な作用機序の解明を行い臨床応用に向けての基礎的知見の集積に務める。

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 3 件)

① Nasu T, Kinomura M, Tanabe K, Yamasaki H, Htay SL, Saito D, Hinamoto N, Watatani H, Ujike H, Suzuki Y, Sugaya T, Sugiyama H, Sakai Y, Matsumoto K, Maeshima Y, Makino H, A sustained-release prostacyclin analog ONO-1301 ameliorates tubulointerstitial alterations in a mouse obstructive nephropathy model, *Am J Physiol-Renal Physiol*, 査読有、302巻、2012、(in press)

② Saito D, Maeshima Y, Nasu T, Yamasaki H, Tanabe K, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y, Makino H, Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, *Am J Physiol-Renal Physiol*, 査読有、300巻、2011、 F873-F886

③ Yamasaki H, Maeshima Y, Nasu T, Saito D, Tanabe K, Hirokoshi-Kawahara K, Sugiyama H, Sakai Y, Makino H, Intermittent administration of a sustained-release prostacyclin analog ONO-1301 ameliorates renal alterations in a rat type 1 diabetes model, *Prostag Leukotr Ess*, 査読有、84巻、2011、 99-107

[学会発表] (計 8 件)

① Yamasaki H、ONO-1301, a sustained-release prostacyclin analog, ameliorates renal alterations in a mouse type 2 diabetes model through its direct protective effects on mesangial cells、米国腎臓学会、2011年11月11日、Philadelphia

② 山崎浩子、ONO-1301による2型糖尿病性腎症進展抑制効果の基礎的検討、第54回日本腎臓学会学術総会、2011年6月16日、パシフィコ横浜 (横浜市)

③ Yamasaki H, Intermittent administration of ONO-1301, a sustained-release prostacyclin analog, ameliorates renal alterations in obese type 2 diabetes mice、米国腎臓学会、2010年11月16日、Denver

④ Nasu T、Prostacyclin analog ONO-1301 ameliorates tubulointerstitial alterations through induction of HGF、米国腎臓学会、2010年11月16日、Denver

⑤ 山崎浩子、徐放性ONO-1301による2型糖尿病モデルにおける腎症治療効果の検討、第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月16日、神戸国際会議場 (神戸)

⑥ 那須達世、ONO-1301による尿細管間質病変抑制効果におけるHGFの関与についての検討、第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月16日、神戸国際会議場 (神戸)

⑦ Yamasaki H、ONO-1301MS, a sustained-release prostacyclin analog, ameliorates renal damage in obese type 2 diabetic mice、ISN-NEXUS Kyoto in 2010、2010年4月15日、

京都国際会館（京都）

⑧ Nasu T、Prostacyclin analog ONO-1301 ameliorates tubulointerstitial alterations via induction of HGF in a mouse UUO model、ISN-NEXUS Kyoto in 2010、2010年4月15日、京都国際会館（京都）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 達世 (NASU TATSUYO)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号：70572741

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者