

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16231

研究課題名（和文）eNOS-NO経路による糸球体上皮細胞TRPC活性化制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of TRPC activation in glomerular epithelial cells by the eNOS-NO pathway

研究代表者

板野 精之 (Itano, Seiji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：90584889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：糸球体上皮細胞内への過剰なCa²⁺流入は細胞骨格のremodelingを誘導し、結果アルブミン尿が出現する。近年、多くの研究から糸球体上皮細胞におけるTRPC6を介したCa²⁺ influxが上皮細胞障害に重要性が見出されてきた。しかしながら、その制御機構は明らかになっていない。「糸球体内皮細胞は糸球体上皮細胞のTRPC6活性化制御を介し、糸球体内恒常性維持を担う」ことが想定される。この制御機構を解明するべく本研究では、「糸球体内皮由来Nitric oxide(NO)は糸球体上皮細胞におけるTRPC6活性化制御を介し糸球体保護に働く」との仮説を証明するべく検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究から先行する糸球体内皮障害が上皮細胞障害へ関与することを見出した。特に上皮細胞の形態変化には細胞骨格のremodelingが重要であり、TRPC6を介したCa²⁺流入が関与していることを示唆する。また糸球体内皮障害ではbioavailable NOの低下が起きる。その結果、糸球体上皮細胞におけるSGC-PKG経路の活性化が減弱することが想定される。以上の事実からeNOS-NO-SGC経路による糸球体上皮細胞TRPC6依存的Ca²⁺流入制御機構に注目した。「腎症初期に認められる糸球体内皮細胞障害が腎症進行に重要な糸球体上皮細胞障害を惹起するメカニズムは何か？」を本研究の命題としたい。

研究成果の概要（英文）：Excessive Ca²⁺ influx into glomerular epithelial cells induces cytoskeletal remodeling, resulting in the appearance of albuminuria. In recent years, many studies have found that TRPC6-mediated Ca²⁺ influx in glomerular epithelial cells is important for epithelial cell damage. However, the regulatory mechanism remains unclear. It is assumed that "glomerular endothelial cells are responsible for glomerular homeostasis through regulation of TRPC6 activation in glomerular epithelial cells. To elucidate this regulatory mechanism, we investigated the hypothesis that glomerular endothelium-derived nitric oxide (NO) acts for glomerular protection via regulation of TRPC6 activation in glomerular epithelial cells.

研究分野：腎臓学

キーワード：TRPC 糸球体上皮細胞 内皮機能障害

1. 研究開始当初の背景

本邦における慢性腎臓病（CKD）患者は増加傾向にあり、死因の第8位を占め、重要な医療問題としてその解決が望まれる。このため透析に至る原因疾患は糖尿病が第一位でありその治療介入は必須の命題である。多くの基礎研究から糸球体上皮細胞障害が腎不全に至る糸球体硬化病変の形成に重要であることが判明している。他の細胞同様、糸球体上皮細胞内 Ca^{2+} 濃度は、収縮、骨格維持、顆粒分泌、遺伝子翻訳やアポトーシスと深く関係する。糸球体上皮細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入は細胞骨格の remodeling を誘導し、結果アルブミン尿が出現する(J Am Soc Nephrol. 2011)。近年、家族性巣状分節状糸球体硬化症（FSGS）の原因遺伝子として TRPC6 遺伝子のミスセンス変異が同定された(Nat Genetics 2005)。その後多くの研究から、糸球体上皮細胞における TRPC6 を介した過剰な Ca^{2+} 流入が上皮細胞障害に重要であることが見出されてきた。

一方で臨床から得られた知見により糖尿病性腎臓病の初期に出現するアルブミン尿は脳卒中、虚血性心疾患等の心血管病（Cardiovascular Disease: CVD）、認知症発症と強く関連していることも判明している。これらの事実から生活習慣病関連 CKD では、共通して血管内皮機能障害（Endothelial cell dysfunction: ECD）が付随する。心血管病発症の最早期病態が ECD であることは既に確立されており、アルブミン尿出現が CVD 発症と関連することからも内皮障害によってアルブミン尿が出現する蓋然性は高い。糸球体内皮細胞における eNOS-NO 経路の破綻と活性酸素種の増加が腎障害発症進展に重要である。内皮特異的 NADPH oxidase（tie2-NOX2 Tg）マウスと糖尿病 Akita マウスを交配し、糖尿病モデルを作成した。糸球体内皮に酸化ストレスを発生させると本来アルブミン尿が検出される以前の超早期段階でアルブミン尿が出現した（Lab Invest 2016）。興味深いことに、この段階から糸球体上皮細胞にも障害が惹起された。

右図：6 週齢 Akita 糖尿病マウスの上皮細胞

（A）糸球体内皮細胞（B）に形態変化を認めず。Tie2-NOX-Tg×Akita 糖尿病モデルでは、

同時点で、内皮障害（fenestrae 減少）・活性化

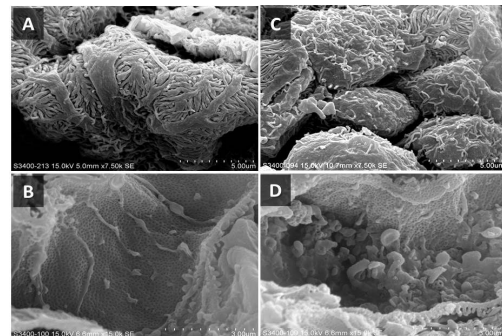
（D）に続いて上皮細胞形態変化（足突起膨

化、融合傾向）を認める（C）。以上の研究結

果から先行する糸球体内皮障害が糸球体上皮

細胞障害へ関与することを見出してきた。特にこのような上皮細胞の形態変化には細胞骨格の remodeling が重要であり、TRPC6 を介した過剰な Ca^{2+} 流入が関与していることを示唆する所見である。また糸球体内皮障害では eNOS 活性化不全（eNOS uncoupling）により bioavailable NO の低下が起きる。その結果、糸球体上皮細胞における sGC-PKG 経路の活性化が減弱することが想定される。さらに心筋細胞においては PKG 活性化により、Threonine 残基のリン酸化により TRPC6 活性が抑制されることが報告されている（Circ Res. 2014）。以上の事実から eNOS-NO-sGC-PKG 経路による糸球体上皮細胞 TRPC6 依存的 Ca^{2+} 流入制御機構に注目した。

学問的問いとして「腎症初期に認められる糸球体内皮細胞障害が腎症進行に重要な糸球体上皮細胞障害を惹起するメカニズムは何か？」を解明することを本研究の命題とした。



2. 研究の目的

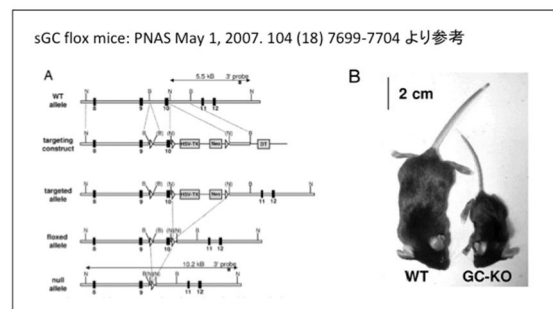
先述した本研究の命題を満たすため以下の目的のもと研究を行う。

1) eNOS-NO-sGC-PKG 経路による糸球体上皮細胞 TRPC6 依存的 Ca^{2+} 流入制御機構の解明

糸球体上皮細胞 Ca^{2+} 変化の評価のため、糸球体上皮細胞特異的 Ca^{2+} 感受性蛍光蛋白質発現マウス由来の単離糸球体を用いて NO-sGC-PKG による TRPC6 依存的 Ca^{2+} 流入制御の検討を行う。

2) 生体における糸球体上皮細胞 sGC 活性化による TRPC6 依存的 Ca^{2+} 流入制御機構の解明

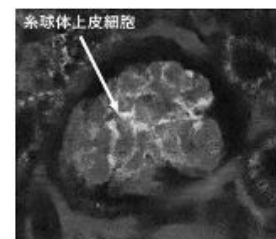
糸球体内皮細胞から産生される Nitric Oxide が糸球体上皮細胞における sGC 活性化を介して細胞保護的に働くことを想定して研究を行う。sGC^{fl/fl} マウスを用いて臓器・細胞特異的な効果・影響を検討する。右図の写真は sGC の $\beta 1$ サブユニットの general knockout (GC-KO) のものであり、GC-KO は出生直後 60% の個体が死亡する。このため本研究では cre-loxp system を用いて臓器特異的・細胞種特異的 sGC 欠損マウス (sGC-CKO) を作成し、その意義を検討する。現在、podocin-cre マウスを取得しており糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を検討することができる。



3) sGC 活性化制御による治療介入意義の検討

eNOS-NO-sGC 経路をターゲットとした治療戦略として PDE 阻害薬と sGC 活性化薬、また下流の PKG 活性化薬を使用する。

これらの目的を達成することは糖尿病性腎臓病及び腎硬化症における病態の移行機序を解明することになる。臨床的事実から腎臓病の最早期病変である微量アルブミン尿では内皮機能障害が重要な因子であることが想定され、申請者らの基礎的検討結果もそれを支持するものである。また申請者らは生体内で Ca^{2+} 流入を評価する新規技術を用いて糸球体上皮細胞内の Ca^{2+} 動態を評価することが可能である (右図)。



3. 研究の方法

実験 1) eNOS-NO 経路による糸球体上皮細胞 Ca^{2+} 流入制御の検討

WT-pod/GCaMP5 及び eNOSKO-pod/GCaMP5 から単離糸球体を行い、ex vivo 実験を行う。単離された糸球体に対して Angiotensin II 及び H_2O_2 刺激を行い蛍光強度の変化を検討することで細胞内 Ca^{2+} の変化を検討する。WT-pod/GCaMP5 に比較し eNOSKO-pod/GCaMP5 では細胞内 Ca^{2+} が有意に上昇する可能性がある。また、in vitro の実験系により NO による Ca^{2+} 流入制御機構を解明する。マウス由来不死化糸球体上皮細胞 (podocyte cell line: PCL) とマウス由来 primary podocyte を用いて検討を行う。PCL に対して Angiotensin II 及び活性酸素種 (H_2O_2) 刺激を行い細胞内 Ca^{2+} 変化を Fluo4 で評価する。primary podocyte では pod/GCaMP5/sGC^{fl/fl} および GCaMP5/sGC^{fl/fl} から単離し、実験

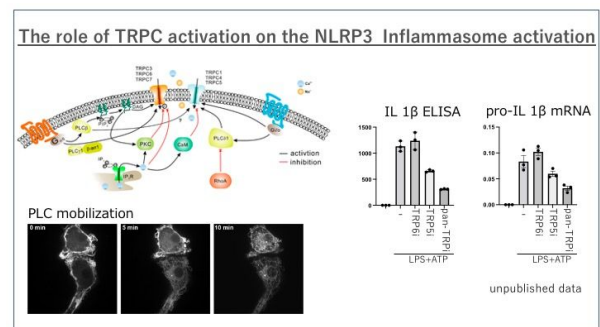
を行う。この検討により糸球体上皮細胞における sGC 活性化が細胞内 Ca^{2+} 変化へ与える影響を観察することができる。

さらに in vivo で検討するべく pod/GCaMP5/sGC^{fl/fl} を作成し糸球体上皮細胞における sGC 活性化と細胞内 Ca^{2+} の検討を行う。これにより、糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を証明することができる。

実験2) eNOS-NO 経路による TRPC 6 依存的糸球体上皮細胞 Ca^{2+} 流入制御の解明

想定してる eNOS-NO 経路による TRPC 6 制御機構として、sGC-PKG 活性化による 69-Threonine 残基(Thr69)のリン酸化を考えている。このため PCL に対して(Thr69)に変異を入れた TRPC6 を導入し、NO による影響を検討する。基礎的検討で PCL に対する導入効率を確認しているが、効率が悪い場合には HEK293 細胞を用いる。

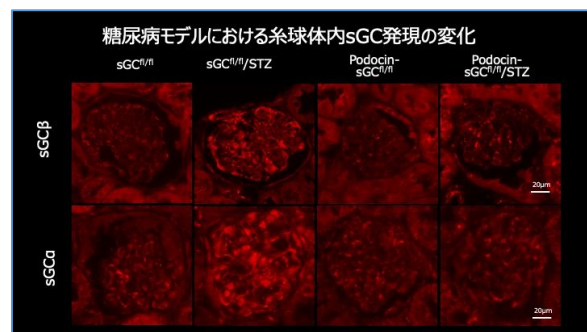
TRPC 抑制による細胞保護作用の検討も同時に行う。特に予備的検討では TRPC 阻害により TLR4-Nfkb 経路が抑制されることを見出している(右図)。糸球体上皮細胞を用いて TRPC 活性化による細胞障害メカニズムの検討を行う。特に Inflammasome 活性化には Ca^{2+} 流入が必要であることが知られており、本研究で TRPC 制御による Inflammasome 活性化制御の可能性を証明したい。



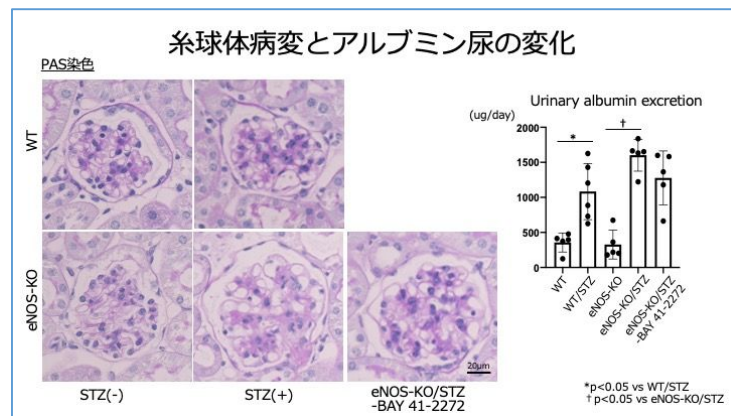
4. 研究成果

まず podocyte 得意的 sGC 欠損マウスを作成し糸球体血行動態に与える影響を検討した。

- 1) 糸球体上皮細胞 sGC 活性化の意義について検討するため、糸球体上皮細胞特異的 sGC 欠損マウス (podo-sGCfl/fl) に Streptozotocin (STZ) 糖尿病モデルを作成した。免疫染色で確認したところ糖尿病発症により糸球体上皮細胞 sGC 蛋白発現が上昇していた(右図)。また sGCfl/fl-STZ では糖尿病発症により、GFR 増加と糸球体肥大が観察される。しかしながら podo-sGCfl/fl-STZ では抑制されていた。これらの結果から podo-sGCfl/fl-STZ では、これらの代償性 GFR 上昇が認められなかった。この結果から仮説のように sGC 活性化が糸球体の代償性肥大に関与する可能性が示された。現在、 Ca^{2+} 動態について検討を行っている。



2) 内皮機能障害存在時における sGC 活性化の意義について検討するため、eNOS 欠損マウス (eNOS-KO) に STZ 糖尿病モデルを作成した。eNOS-KO/STZ では WT-STZ と比較しアルブミン尿が有意に増加した。eNOS-KO/STZ に sGC 活性化薬投与でアルブミン尿お



よび糸球体病変の改善が見られた。このように内皮機能障害 (eNOS-NO 経路の破綻) 存在下であっても sGC 活性化薬は腎障害の改善効果を認めることがわかった。

現在、更なる詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

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
---------	---------