

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 20日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790939
 研究課題名（和文） 高脂血症による糖尿病性腎症悪化の新たな分子機構：MRP8/TLR4 シグナル経路
 研究課題名（英文） Novel mechanism of progression of diabetic nephropathy by hyperlipidemia: MRP8/TLR4 signaling
 研究代表者
 桑原 孝成 (TAKASHIGE KUWABARA) 京都大学大学院医学研究科、医員
 研究者番号：00393356

研究成果の概要（和文）：近年、生活習慣病の分子基盤として内因性リガンドと病原体センサー間で誘導される自然炎症が注目されている。本研究により、自然炎症の一端を担う MRP8/TLR4 シグナル経路の活性化が糖尿病性腎症の進展に重要であることが明らかとなった。さらに MRP8 発現はヒト糖尿病性腎症の腎組織においても病態を反映できる可能性が確認され、新しい治療標的として期待される。

研究成果の概要（英文）：Homeostatic inflammation which is induced by endogenous ligands and pathogenic receptors has been emerged as a molecular basis of life style-related diseases. In this study, it has been clarified that MRP8/TLR4 signaling, involved in homeostatic inflammation, might play an important role in the progression of diabetic nephropathy. Furthermore, renal MRP8 expression in human biopsy samples could predict the renal prognosis of diabetic nephropathy. Blockade of MRP8/TLR4 signaling could become a novel strategy for diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：糖尿病性腎症、自然炎症、TLR4, MRP8, マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝異常が糖尿病性腎症悪化の独立した危険因子であることは多くの疫学的研究から報告されており (Perkins BA et al. *New Engl J Med* 2003; Ravid M et al. *Arch Intern Med* 1998; Appel GB et al. *Diabetes Care* 2003)、申請者は高脂肪食負荷が糖尿病モデルマウスの腎病変を悪化させることを確認している。さらに糖尿病性腎症の病態

に關与する新規分子を同定する目的で行った網羅的スクリーニングにより、自然免疫を司る主要な分子である Toll-like receptor 4 (TLR4) 及びその内因性リガンド Myeloid-related protein 8 (MRP8) が全く異なる 2 種の糖尿病モデルマウス系球体で共通して増加する分子であることを見出した。MRP8 は元来細胞質内に存在するカルシウム結合蛋白として好中球・単球などから分離、

同定された分子 (Odink K et al. Nature 1987) であるが、最近になって種々のストレスにより細胞外に放出され、TLR4 の強力な内因性リガンドとして敗血症性ショック (Vogl T et al. Nat Med 2007)、SLE (Loser K et al. Nat Med 2010)、腫瘍細胞の転移 (Hiratsuka S et al. Nat Cell Biol 2008) など様々な病態で重要な役割を果たすことが報告されている。さらに我々はストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスに高脂肪食を追加すると腎症が悪化すると同時に糸球体における MRP8/TLR4 発現がさらに増加することを見出した。また糸球体で増加する MRP8 の局在はマクロファージであり、マクロファージに MRP8 刺激を行うと強力な TLR4 リガンドである lipopolysaccharide (LPS) 刺激と同等の炎症を惹起することを確認している。しかしながら、MRP8/TLR4 シグナルの糖尿病性腎症における意義は不明であった。

2. 研究の目的

(1) 糖尿病・高脂血症合併モデルマウスにおける TLR4 シグナル経路の解明および高血糖・脂質刺激が MRP8/TLR4 発現に与える機序の検討

本モデルマウス腎臓で活性化される TLR4 シグナル下流の細胞内シグナルを詳細に解析することで、脂質による糖尿病性腎症悪化機序の解明を目指す。

(2) TLR4 欠損マウスおよび欠損マクロファージを用いた、高脂血症が糖尿病性腎症進展に及ぼす MRP8/TLR4 シグナル経路の病態生理学的意義の解明

TLR4 シグナル遮断が糖尿病性腎症の新たな治療手段になり得るかどうかの検討を主な目的とする。

(3) 肥満・糖尿病患者の腎組織における

MRP8/TLR4 シグナル発現と糖脂質代謝・腎障害パラメーターとの関連の検討

ヒト肥満・糖尿病患者の腎組織における本シグナル経路を検討した報告はなく、ヒトにおける意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病・高脂血症合併モデルとしてストレプトゾトシン (STZ) と高脂肪食 (HFD: 45%脂質含有) の併用により、STZ+HFD マウスを作成。本モデルの腎組織における TLR4 下流の細胞内シグナルについてウエスタンブロット、および PCR Array を用いて検討する。腎内の MRP8 主要産生細胞であるマクロファージに対して高糖濃度、脂肪酸刺激を加えて、MRP8/TLR4 発現に及ぼす影響を検討する。

(2) TLR4 欠損マウスに対して STZ+HFD 併用モデルを作成し、TLR4 シグナル遮断が腎症進展に果たす役割を検討する。さらに TLR4 欠損が内因性リガンド MRP8 の発現に及ぼす影響を免疫染色および定量的 PCR 法により蛋白・mRNA レベルで検討する。また野生型および TLR4 欠損マウス骨髄から分化誘導したマクロファージを用いて(1)で検討する、糖と脂質刺激による MRP8 発現に TLR4 が果たす役割を検討する。

(3) 肥満あるいは 2 型糖尿病を有し、かつ蛋白尿を呈する患者の腎生検標本を用いて、MRP8 発現を mRNA, 蛋白レベルで評価する。mRNA レベルの検討は共同研究で行い、レーザーマイクロディセクション法で糸球体、非糸球体に分けて定量的 RT-PCR で評価。蛋白発現については当施設で行った腎生検標本を用いて免疫染色で評価する。

4. 研究成果

(1) TLR4 下流のシグナルは主に MyD88-dependent, TRIF-dependent 経路の 2 つから成る。今回の検討で、STZ+HFD マウス腎組織における炎症の増悪は TRIF-dependent 経路が関与している可能性が初めて示された。TRIF-dependent 経路による TLR4 活性化は endosome 内のリガンド刺激によることが報告されており、endosome 内に異常蓄積した脂質が病態悪化に役割を果たす可能性も考えられる。さらに遊離脂肪酸刺激によるマクロファージにおける MRP8 発現誘導増強は高糖濃度条件下においてのみ認められることが明らかとなり、マクロファージの MRP8/TLR4 シグナル活性化が糖尿病性腎症における糖脂毒性に寄与する可能性が示唆された。

(2) STZ に HFD を併用すると糖脂質代謝・腎脂肪蓄積は野生型・TLR4 欠損マウスの両方で同程度の悪化を呈するにも関わらず、野生型マウスではアルブミン尿、メサングウム基質拡大、マクロファージ浸潤および腎組織の炎症・線維化関連遺伝子発現亢進、糸球体ポドシン発現の低下といった腎病変の形態的機能的な悪化を認めたが、TLR4 欠損マウスではこれらの効果は有意に抑制されていた。さらに特記すべきことに TLR4 の欠損により腎症の悪化が軽減すると同時に糸球体 MRP8 陽性浸潤細胞および MRP8 mRNA 発現増加が著明に抑制されることが明らかとなった。また TLR4 欠損骨髄由来マクロファージを用いた in vitro の検討により、(1) で検討したマクロファージにおける糖と脂質による相乗的な MRP8 発現誘導が TLR4 依存性であることが確認された。

(3) 肥満あるいは 2 型糖尿病を有する患者の

腎組織において MRP8, TLR4 mRNA, MRP8 蛋白が有意に増加していることが確認された。そして、腎組織 MRP8 発現は従来の危険因子として知られている血圧、尿蛋白、腎機能などに関連していた。さらに腎予後予測に関する検討では、従来の危険因子で補正後もなお、腎組織 MRP8 発現が独立した予知因子となり得る可能性が確認された。

これまで糖尿病性腎症における TLR4 の役割は不明であったが、申請者の論文を含め海外の研究室からもほぼ同時に TLR4 遮断の有効性を示す報告がなされたことから、その重要性が確認されたものと考えられる。しかしながら、実臨床の観点から糖尿病患者において TLR4 そのものを遮断することは感染のリスクを考慮すると困難な可能性がある。内因性リガンド (MRP8) の糖尿病性腎症における意義は本研究が初めての報告であり、選択的治療標的として今後の臨床への応用が期待される。

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 4 件)

1. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Ogawa Y, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K. Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia* 55: 2256-66, 2012. doi: 10.1007/s00125-012-2578-1.

2. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Toda N, Yamada R, Namoto S, Yamamoto T, Seki N, Souma N, Yamaguchi T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Peritoneal fibrosis and high transport are induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. *Perit Dial Int.* 33:143-154, 2013. doi: 10.3747/pdi.2011.00033.

3. Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kato Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A,

Nakao K. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 23: 1198-209, 2012. doi: 10.1681/ASN.2011100985.

4. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Ogawa Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Kato Y, Mori KP, Toda N, Ohno S, Muramatsu H, Muramatsu T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 81: 160-169, 2012. doi: 10.1038/ki.2011.305.

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. Kuwabara T

Macrophage-mediated glucolipotoxicity contributes to progression of diabetic nephropathy through MRP8/TLR4 signaling.

Annual Meeting of American Society of Nephrology.

2012 年 11 月 2 日 San Diego, USA

2. 栗原孝成

ワークショップ 3 糖尿病性腎症の新たな発症、進行メカニズム「自然免疫受容体 TLR4 が糖尿病性腎症進展に果たす役割-脂質による悪化-」
第 55 回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)

2012 年 6 月 2 日 横浜

3. 栗原孝成

若手シンポジウム「炎症メディエーター MRP8/TLR4 が糖尿病性腎症進展に果たす役割とは」

FRONT-J 第 3 回学術集会 (招待講演)

2012 年 8 月 11 日

4. 栗原孝成

糖尿病性腎症の治療薬を目指して「糖尿病性腎症における自然炎症の役割～MRP8/TLR4 シグナル経路～」

協和発酵キリン腎臓シンポジウム (招待講演)

2012 年 11 月 23 日

〔図書〕 (計 1 件)

栗原孝成、向山政志、中尾一和. 中外医学社、*Annual Review 腎臓 2012*. p133-139.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

ホームページ

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 孝成 (TAKASHIGE KUWABARA)

京都大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号 : 25860673

(2) 研究分担者

森 潔 (KIYOSHI MORI)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 25670409

(3) 研究協力者

西山 成 (AKIRA NISHIYAMA)

香川大学・医学部・教授

研究者番号 : 10325334