

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 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790951

 研究課題名（和文） 腎疾患尿細管に見られる蓄積脂質をターゲットとする新規治療の
確立を目指した基礎研究

 研究課題名（英文） Basis examination aimed at establishing a novel therapeutics
that target the accumulated lipid in diseased kidney

研究代表者

米澤 正（YONEZAWA SEI）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50469988

研究成果の概要（和文）：

種々の慢性腎疾患においてみられる腎尿細管上皮細胞への蓄積脂質について、メカニズムに関する検討では、低酸素誘導因子 HIF-1 α と細胞内脂質の排出に関わる ABCA1 分子の発現変動が細胞内脂質制御において重要であることを明らかにした。本研究ではさらに、アニオン性で水溶性を高める修飾を施したリポソームは疾患腎への集積が高まることを見出した。今後詳細なメカニズムの解析と送達技術の洗練により、新しい腎疾患治療が確立する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focus on lipids accumulating in the renal tubular epithelial cells of chronic kidney disease. But the reason why lipids accumulate in the kidney is unknown. So we looked into the mechanism and purpose of lipid accumulation. Moreover, we tried to establish foundations for clinical application which targeted lipids for treatment of kidney disease.

At first, we have investigated the mechanisms of lipid accumulation by using renal tubular epithelial cells. Hypoxia inducible factor-1 alpha and ATP-binding cassette protein A1 played an important role in the control of intracellular lipids in cells of the kidneys. Moreover, we found out the fact that intracellular lipids could increase by the addition of inflammatory stimulus. The increase of intracellular lipids described above could be inhibited by overexpression of liver X receptor alpha. This result suggests importance of the changes of lipid control in the kidney.

Then, we tried to establish of selective drug delivery system toward kidney. After i. v. injection, liposomes which consist of cholesterol and cationic phospholipid had little occasion to get to kidney. On the other hand, anionic liposomes which was hydrophilic could accumulated in the kidney of the chronic kidney disease model.

We demonstrated importance of lipid control in kidney and a part of its mechanisms. A detailed consideration about mechanisms of intracellular lipids and progress of drug delivery system could lead to a novel treatment of kidney disease.

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	2,000,000	600,000	2,600,000

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

キーワード：ネフローゼ

1. 研究開始当初の背景

我々は、医薬基盤研・保健医療分野における基礎推進事業の一環で「腎疾患の分子標的への抗体スクリーニング」を担当し、種々の腎疾患動物モデルにおける核内受容体の発現を調べてきた。その中で半月体性糸球体腎炎モデルにおいて核内受容体のひとつ Liver X Receptor alpha (LXRα) の発現が亢進していること、さらに腎近位尿細管にコレステロールエステル (ChoE) などの脂質が蓄積していることを見出した。LXR はコレステロールの細胞内脂質のセンサーたんぱく質として、その代謝調節において重要な役割を担うと考えられている。そこでその糸球体腎炎モデルに対して LXR アゴニストの投与実験を行ったところ、アゴニストが病態モデルに見られた腎への蓄積脂質を有意に減らし、病態の進展を抑制することを明らかにした。このことから脂質を減らすことと病態進展の抑制が平行関係にあることが示唆された。

尿細管上皮細胞に対する ChoE の蓄積としては虚血やネフローゼなどにも見られることが知られている (Richard A. et. al. *Kidney Int* 60:2299-2310, 2001) が、その役割などに関する詳細な検討はこれまで行われていない。一方で動脈硬化における泡沫細胞のように、ChoE の蓄積が炎症を引き起こす例もある。そのため腎疾患の進行因子としてこれまでにないアプローチとして、尿細管に蓄積する脂質が病態進展に関与するのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

従来腎疾患の治療を考える上では、腎糸球体における炎症を抑えることが重要視されてきた。本研究はこれまでにない視点 (腎尿細管に蓄積する脂質) からのアプローチで、腎疾患治療に役立つ病態メカニズムを解明することを目標とし、三つの柱で研究を行う。

(1) 脂質が蓄積する機序を明らかにすること。脂質の取り込み、分解、排出、合成のバランスがどのように乱れ、結果蓄積したのかを、各動作に関与する分子や遺伝子について発現量を調べることによって明らかにする。

(2) 腎に蓄積した脂質が病態進展において果たす役割を明らかにする。以前からヒト慢性腎疾患において腎に脂質が蓄積すること

は知られていたが、病態の進展におけるその役割に関する詳細な検討は未だに行われていない。尿細管上皮細胞に蓄積した脂質がその細胞に対して炎症や線維化を誘導するのか、あるいは炎症や線維化の反応が先に起こって脂質の蓄積を誘導するのかなど、蓄積脂質と炎症・線維化の関係性はこれまで不明のままである。病態進展に対する蓄積脂質の役割を明らかにすることによって、腎疾患治療の新たなターゲットとしての可能性を明らかにする。

(3) 腎選択的治療効果をもたらす方法を確立する。これまでの検討では、LXR アゴニストを経口投与することによってその効果を得た。この系における問題点として、アゴニストの肝臓に対する作用、脂質合成誘導による高脂血症が挙げられる。血中脂質は腎疾患の増悪因子であると考えられているため、LXR アゴニストを治療薬として考えた場合、実験的にも臨床的にもこの問題点は解決する必要がある。そのため腎へ治療薬を選択的に送達するために、薬物体内動態の精密制御を図る薬物投与技術ドラッグデリバリーシステムを駆使した治療システムの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 脂質が蓄積する機序を明らかにすること。

『動物個体系での検討』正常、ネフローゼモデル動物腎 RNA を Gene Chip 解析に供し、細胞内脂質変化に関与すると考えられる遺伝子群の発現を調べる。さらに脂質が蓄積した尿細管のみから情報を得るためにレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) を用いて、部位特異的な情報を得ることでメカニズムを調べる。『培養細胞系での検討』ネフローゼモデル腎において観察された核内受容体 LXRα の発現亢進を出発点として、ラット尿細管上皮細胞 NRK52E 細胞を用いて、LXRα 高発現細胞を作製する。これにおいて様々な条件下における細胞内蓄積脂質の変化について調べ、それに関与する遺伝子、たんぱく質の発現変動を調べる。

(2) 腎に蓄積した脂質が病態進展において果たす役割を明らかにする。

NRK52E 細胞に脂質が蓄積する条件において炎症・線維化反応に関わる因子の発現変化

を調べる。またこれとは逆に、NRK52E 細胞に対して炎症性刺激や疾患時に増加する血中脂質などを添加した時の脂質動態を調べる。

(3) 治療薬の腎選択的送達システムを構築する。

薬物キャリアとしてリポソームを選択し、種々の表面修飾によって特性の異なるリポソームを作製する。半月体性糸球体腎炎モデル腎において、どのような特性が腎への薬物送達に対して利点となるか検討する。

4. 研究成果

(1) 『動物系での検討』では Gene Chip 解析、LCM による脂質蓄積部位での検討において、脂質代謝関連遺伝子の発現変動を調べた。そのなかで我々はネフローゼ腎において、低酸素誘導因子 HIF-1 α の発現が RNA レベルで上昇していることを見出した (図 1)。そこで培養細胞系において、NRK52E 細胞に対して擬低酸素状態を誘導する塩化コバルト CoCl₂ を添加した場合の細胞内蓄積脂質の変化について検討した。結果、CoCl₂ により HIF-1 α の誘導が起こり、それに伴って細胞内脂質が増加することを明らかにした。一方『培養細胞系での検討』として、ネフローゼモデル腎において観察された核内受容体 LXR α の発現亢進を出発点とし、LXR α を高発現する尿細管上皮細胞という *in vivo* を反映した細胞モデルの作製に成功した。その LXR α 高発現細胞では、Mock 細胞が細胞内に脂質を蓄積する条件下においても、蓄積はほとんど見られず、LXR アゴニストの添加によって、蓄積の減少がさらに進むことを見出した (図 2)。このことからネフローゼ腎において LXR α の発現亢進することは、腎が蓄積した脂質を減少させる方向へ働きかけていると考えることが出来る。また LXR α の下流遺伝子である ABCA1 の発現が LXR α の発現に伴って増減することを明らかにした。そこで *in vitro* においてさらに ABCA1 のノックダウンにより脂質の蓄積が増加することも見出した。

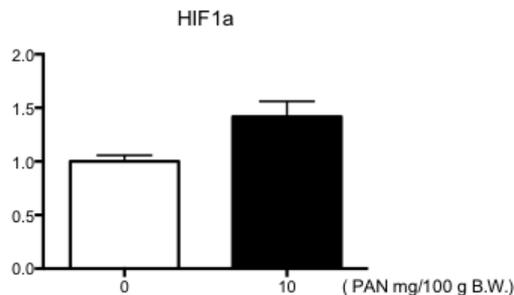


図 1 PAN ネフローゼにおける HIF-1 α の発現

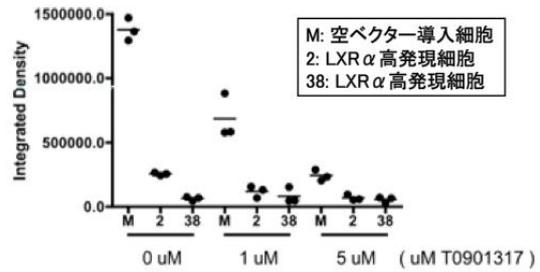


図 2 LXR α 高発現細胞に対するアゴニストの作用

(2) まず、細胞に脂質が蓄積する条件下において NRK52E 細胞を培養し、細胞内において炎症・線維化を示唆する反応の有無を調べたが、それを示唆するデータは得られなかった。一方、炎症性刺激 (IL-1 β) あるいはネフローゼモデル血清を添加した NRK52E 細胞において、いずれも細胞内に蓄積する脂質が有意に増加することを見出しており、現在発現変動する遺伝子、たんぱく質の解析を行っている。

(3) 腎選択的な薬物送達を目指した検討として、まず蛍光標識したリポソームを尾静脈内投与し、腎における観察・評価が可能であることを示した。カチオン性またはアニオン性のリン脂質を構成成分として含むリポソームを調製し、その腎疾患モデルにおける体内動態を調べた。結果、カチオン性のリポソームは腎への分布はほとんど見られなかった (図 3、赤色がカチオン性リポソーム) 一方、水溶性を向上させさらにアニオン性の特性を持たせたりポソームは、炎症の激しい腎糸球体内のみならず、尿細管間質領域にも多く分布することが明らかとなった (図 4、赤色がアニオン性リポソーム)。今後更なる検討により腎特異的な薬物送達の基盤を作りたいと考えている。

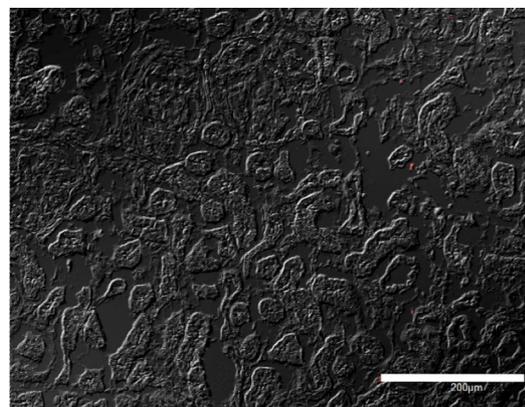


図 3 腎におけるカチオン性リポソームの挙動

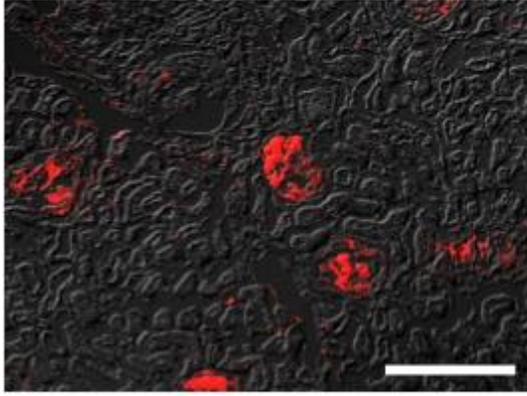


図4 腎におけるアニオン性リポソムの挙動

本研究において脂質蓄積のメカニズムについて、低酸素誘導因子の関与を初めて明らかにした。これまでの腎疾患治療は主に糸球体における炎症を抑えることに主眼が置かれていたが、今回新たな機序亢進の可能性を示した。これまでにない新たな角度からアプローチした腎疾患治療が確立する可能性があり、健康・福祉に及ぼす社会的意義は世界的な視点から見ても極めて大きい。さらにドラッグデリバリーシステムを駆使した腎特異的な薬物送達技術の革新は、腎がんなど様々な疾患治療に応用することが可能であると考えられることから、本研究の応用性は極めて大きく、国民医療費のかなりの部分を占める腎疾患治療に対して有効な、新規の治療効果をもたらすことが期待される。

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0件)

[学会発表] (計1件)

- ① 米澤 正、ネフローゼモデルに対するLXRアゴニストの治療効果と脂質代謝への影響、先端医療薬学研究センター講演会、2012年3月16日、岩手

[図書] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 正 (YONEZAWA SEI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：50469988

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：