

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 3月10日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2012～2013
課題番号：24790835
研究課題名（和文）
各種実験腎炎モデルにおける Rac/MR の役割とその作用細胞・機序の探索
研究課題名（英文）
Investigation of the role of Rac/MR cascade in various experimental nephropathy
: its target cells and underlying mechanism
研究代表者
吉田 成孝 (YOSHIDA Shigetaka)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30559430
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）3,300,000 円、（間接経費）990,000 円

研究成果の概要(和文):肥満糖尿病においては血中アルドステロン濃度の上昇と腎局所における Rac1 活性上昇が協同的に腎ミネラルコルチコイド受容体活性を上昇させ、腎障害を強力に進展させることが示唆された。メサンギウム細胞培養株に対するグルコース負荷は同細胞の Rac1 活性化と MR 活性化を惹起し、Rac1 活性の抑制により MR 活性も抑制されることから MR 活性化は Rac1 活性化を介することが示唆された。また肥満ラット由来の脂肪細胞の培養上清は、副腎皮質由来細胞のアルドステロン分泌を著明に増加させ、脂肪細胞由来のアルドステロン分泌刺激因子の存在と肥満におけるその増加が示唆された。

研究成果の概要(英文):Our study suggested that increased plasma aldosterone and local Rac1 activation in the kidneys cooperatively activates MR and strongly develops renal impairment in obesity-related diabetic model mice. Glucose stimulation activates Rac1 and MR in cultured mesangial cells. Since Rac1 inhibition completely suppresses MR activation by glucose, it is suggested that glucose activates MR via Rac1. Cultured medium of fat cells isolated from obese rat strongly stimulates aldosterone secretion of the cultured adrenal cortex cells, and it suggests the fat cell derived aldosterone releasing factor and its increase in obesity.

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：ミネラルコルチコイド受容体・Rac1・アルドステロン・糖尿病性腎症・肥満・脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は透析療法などによる QOL の毀損・高額な医療費・多くの合併症による死亡率の高さなどから国民健康上の大きな問題となっている。なかでもその原因疾患として最も多いのは糖尿病性腎症である。近年の薬物療法の発展にも関わらずその患者数は増加の一途をたどっており、新しい腎障害進展療法の開発は喫緊の課題である。肥満は糖尿病のみならず高血圧・高脂血症の原因であり心血管病と共に血管リスクを介して腎機能低下の重要なリスクであるにとどまらず、近年肥満腎症として肥満それ自体に伴う腎疾患も注目されている。

鉱質コルチコイド受容体(MR)はレニン・アンギオテンシン・アルドステロン(RAA)系の最終産物であるアルドステロンの唯一の受容体であり、その腎障害における重要性が近年注目されており、我々もこれまで腎障害における MR の重要性を報告してきた。肥満患者においては血中アルドステロンが高いことがこれまで数多く報告され、その原因の一つとして脂肪細胞由来の物質によって副腎皮質細胞からのアルドステロン分泌が亢進することが示唆されてきた。我々も過去肥満モデルラットより単離培養した脂肪細胞の培養液によって副腎皮質由来細胞株のアルドステロン分泌が増加することを示してきた。

さらに我々は近年、低分子量G蛋白 Rac1を介したリガンド非依存的なMRの活性化を報告し、MR阻害やRac阻害の高血圧性腎障害などに対する高い有効性を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では近年特に増加している肥満糖尿病性腎症をターゲットに臨床病態に近いモデルでRac/MR系阻害の臨床効果を探ると共に、Rac活性増加の詳細な機序を検討し、臨床応用可能な新規治療法の確立と病態のより詳細な理解を目指すことを目的とする。また肥満モデルにおけるアルドステロン分泌刺激因子の同定も同時に試みた。

3. 研究の方法

肥満糖尿病モデルマウスであるKKA^yマウスを用いて、その腎障害と腎Rac1活性・MR活性を検討し、Rac阻害薬による腎障害の改善効果を検討した。

糖尿病におけるRac1活性上昇の機序の探索としてin vitroによる検討を行った。メサングウム細胞の培養株をもちいてグルコース負荷によるRac1活性とMR活性の変化を検討し、MRの活性化がRac1の活性化を介したものであるかを検討するためにRac阻害によるMR活性の抑制を検討した。

またこれらの過程で肥満糖尿病においては血中アルドステロン値の有意な上昇が認められ、Rac1と協同的にMR活性を上昇させていることが推定された。そのため脂肪細胞からの分泌が示唆されているアルドステロン分泌刺激因子の探索を行った。肥満糖尿病モデルラットであり血中アルドステロン濃度が著明に上昇することが知られるSHR-CPラットと野生型ラットからそれぞれ脂肪組織を採取し、脂肪細胞を単離培養した。その培養液で副腎皮質細胞の培養株を培養し、アルドステロン分泌能の変化を検討した。さらに脂肪培養培養液中のアルドステロン刺激因子の絞込みを行った。

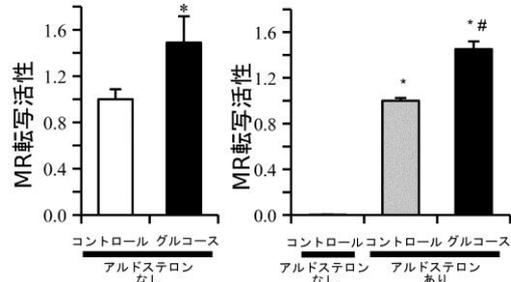
4. 研究成果

1) グルコースによるRac1/MR系の活性化

腎臓由来細胞としてメサングウム細胞の培養細胞株を用いてこれにグルコースを負荷したところ、活性型Rac1の著明な増加を認めた。活性化MRの結合により転写促進をもたらすMR response elementと呼ばれる配列にルシフェラーゼを結合させたコンストラクトを作成し、これを遺伝子導入した同細胞株にグルコースを負荷したところ、ルシフェラーゼ活性の著明な増加を認め、グルコースはRac1・MRを共に活性化することが示された。グルコースによるMR転写活性の上昇は、培養液中にMRのリガンドであるアルドステロンが存在する場合にもしない場合に

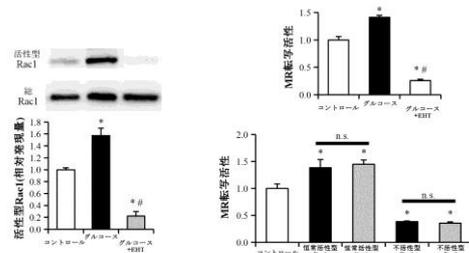
もほぼ同様に認められたことから、グルコースはリガンド非依存的にMRを活性化すると考えられた(図1)。

図1: グルコースによるMR転写活性化



次にRac1の抑制によりグルコースによるMR活性化が抑制されるかを検討した。Rac阻害薬であるEHT1864はグルコースによるRac1活性化を完全に抑制し、同時にグルコースによるMR活性化も抑制した。さらに不活性型Rac1の導入によっても同様にグルコースによるMR活性化は抑制された。また恒常活性型Rac1の導入によりMRの転写活性は増加するものの、ここにグルコースを加えてもそれ以上のMR転写活性増加は認められず、これからグルコースによるMR活性化にはRac1の活性化が必要であることが示された(図2)。

図2: グルコースによるMR転写活性化へのRac1の関与

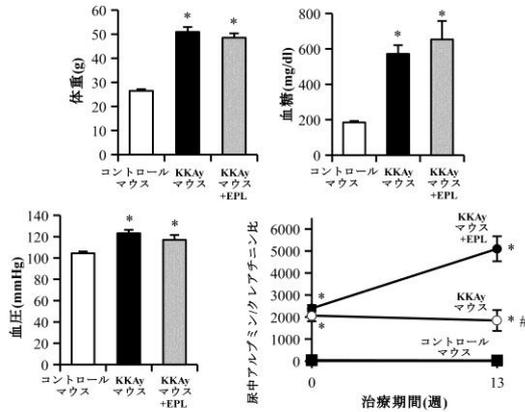


2) 肥満糖尿病性腎症モデルにおけるRac1/MR系の働き

肥満糖尿病モデルマウスであるKKA^yはコントロールマウスに比し著明な肥満・高血糖に加え、著明な高血圧と血中アルドステロン濃度高値を示した。過去の報告で血圧の有意な低下をもたらさないとされた低用量の特異的MR阻害薬EPLを投与したところ、体重・血糖・血圧などの全身的な生理的因子を変化させることなく著明な腎障害の改善を示し、

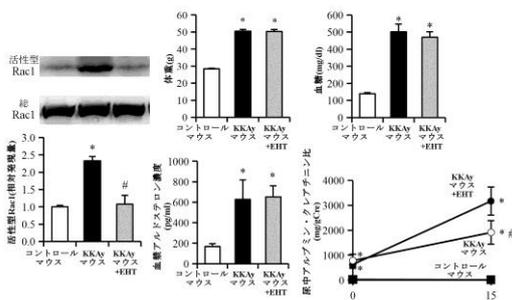
肥満糖尿病モデルにおける腎局所においてMR活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された(図3)。

図3：肥満糖尿病マウスの腎障害に対するMR阻害の効果



そこで腎組織のRac1活性を測定したところKKAYの腎Rac1活性は有意に上昇しており、その活性はRac阻害薬EHT1864投与によりコントロールマウス並みに抑制された。腎MR活性を核内MR量の定量によって測定したところ、無治療KKAYはコントロールマウスに比して著明な核内MR増加を示し、EHT1864投与群で部分的に抑制されていた。EHT1864投与は低用量EPL投与と同様に重・血糖・血圧などの全身的な生理的因子を変化させることなく著明な腎障害の改善を示した(図4)。

図4：肥満糖尿病マウスの腎障害に対するRac1阻害の効果



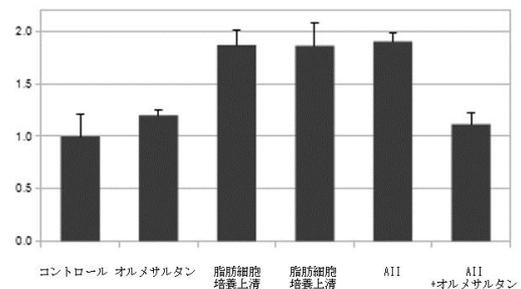
われわれの過去の報告では血中アルドステロンが正常ないし低値を示すモデルにおいてRac1抑制がMR抑制・腎障害改善効果を持つことを示してきたが、今回の研究においては血中アルドステロンが高値であるモデルにおいても同様にRac1抑制がMR抑制・腎障害改善効果を持つことを示しており、MR活性におけるRac1のより広範な重要性を示

している。これらの内容をまとめて論文化しNephron Experimental Nephrology誌に報告している。

3) 脂肪細胞由来アルドステロン分泌刺激因子の探索

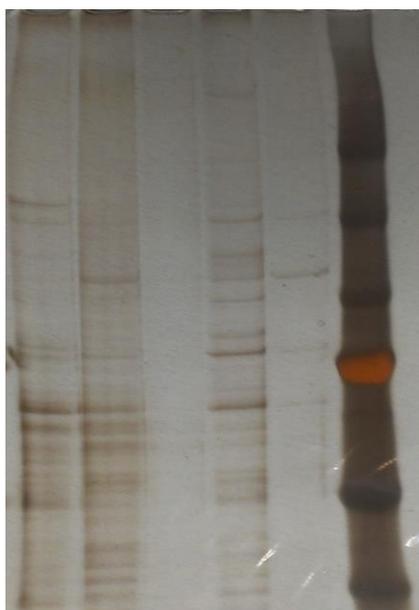
肥満糖尿病モデルラットより脂肪細胞を単離培養し、その培養液によって副腎皮質由来細胞株を培養したところ、コントロールラットの脂肪細胞の単離培養によって得た培養液より、副腎皮質由来細胞のアルドステロン分泌を増加させた。そこで肥満糖尿病モデルラットの脂肪細胞の培養液に含まれるアルドステロン分泌刺激因子を同定を試みた。培養液中のアルドステロン濃度の測定では時間を要する上に高額であり、また培養液を多く要することから効率が悪いので、まずより効率のよいアルドステロン分泌刺激能アッセイ系の構築を行った。アルドステロン合成酵素であるCYP11B2のプロモータ部位にルシフェラーゼを結合したコンストラクトを作成し、これを副腎皮質由来細胞株に遺伝子導入したところ、培養液中のアルドステロン濃度増加と同様に、肥満糖尿病モデルラット由来の脂肪細胞培養液によってルシフェラーゼ活性が増加した。この反応はアンジオテンシンIIの阻害薬であるオルメサルタンによっては阻害されず、アルドステロン分泌刺激因子は古典的なRAA系のものとは異なることが示された(図5)。

図5：脂肪細胞培養上清によるアルドステロン分泌刺激



次に目的とする因子の候補を絞り込むため肥満糖尿病モデルラット由来の脂肪細胞培養液を密度勾配遠心分離による分子サイズごとの分離、硫酸アンモニウム沈殿による分離などいくつかの方法で分離したものの、十分に効率のよい絞り込みを行い得なかった。そこでCYP11B2のプロモータ部位に磁気ビーズを結合させ、それに脂肪細胞培養液で培養した副腎皮質細胞の細胞液を反応させることでの絞り込みを行っており、現在候補を絞り込みつつあるところである(図6)。

図 6：脂肪細胞培養上清で培養した副腎皮質細胞液中の CYP11B2 プロモータ結合物質



脂肪細胞 培養上清① コントロール AI1 脂肪細胞 培養上清②

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 2 件)

①吉田成孝・長瀬美樹、肥満とアルドステロン-腎障害、医学のあゆみ、査読なし、273 巻 7 号、2012、p573-578

②Shigetaka Yoshida, Kenichi Ishizawa, Nobuhiro Ayuzawa, Kohei Ueda, Maki Takeuchi, Wakako Kawarazaki, Toshiro Fujita, and Miki Nagase. Local mineralocorticoid receptor activation and the role of Rac1 in obesity-related diabetic kidney disease. Nephron Experimental Nephrology. 2014;126(1):16-24. DOI:10.1159/000358758

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 成孝 (YOSHIDA Shigetaka)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30559430