

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460216

研究課題名(和文)系球体腎炎の進展過程におけるNotchシグナリングの役割

研究課題名(英文)Role of Notch Singaling in the progress of glomerulonephritis

研究代表者

上村 和秀 (UEMURA, Kazuhide)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：20303844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：末期腎不全に伴う透析患者は近年増加の一途をたどっており、医療費および患者QOLの観点からその対策が求められる。メサンギウム増殖性腎炎は透析導入の原疾患として糖尿病性腎症について2番目に多い主要な腎疾患の一つである。本研究ではメサンギウム増殖性腎炎モデルにおいて腎メサンギウム領域にNotch受容体が一過性に発現することを見いだし、Notchシグナルが本疾患の進展に關与することが示唆された。さらにNotchシグナルが活性酸素種によって調節されることに着目し、活性酸素による腎細胞障害を抑制する化合物を探索したところ、ヒドロキシカルバゾールにその活性を見い出した。

研究成果の概要(英文)：The number of patients of artificial dialysis has been increasing these days. It is desired that the reduction of new end-stage renal disease in which dialysis is required in terms of both national medical expense and quality of patient's life. Mesangial proliferative glomerulonephritis is the largest primary disease after diabetic nephropathy. In this study, we have found that transient expression of Notch1 receptor in a rat model of mesangial proliferative glomerulonephritis, suggesting that Notch signaling may be important in the progress of this disease. We have also found that a certain type of hydroxycarbazole have antioxidant capacity and may affect Notch signaling through the crosstalk of intracellular signaling.

研究分野：医療薬学

キーワード：腎炎 Notch 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全による透析導入患者は増加の一途を辿っており、患者 QOL の著しい低下とともに医療経済の上でも問題となっている。糸球体腎炎は腎不全に至る慢性腎疾患のなかでも主要なものの一つであるが、その病態生理については未だ未解明の部分が多い。IgA 腎症に代表されるメサンギウム増殖性糸球体腎炎は比較的本邦で患者が多く、透析導入にいたる末期腎不全の原因疾患として糖尿病性腎症について多い疾患である。Notch シグナルは細胞の分化や増殖に関与し、ヒトをはじめとする哺乳動物では Notch1, 2, 3, 4 の 4 種の受容体と Jagged1, 2 および Delta1, 3, 4 のリガンドが存在する。研究代表者らは Notch 受容体シグナル伝達の分子機構に関する研究に取り組み、Notch 受容体細胞外ドメインの糖鎖修飾がリガンド依存的な Notch 受容体活性化に必須であることを明らかにした。(J. Biol. Chem. 283, 13638-13651 (2008)) Notch 受容体は細胞と細胞の直接的な接触を介して、細胞増殖および分化の制御に関与する生理活性タンパク質である。Notch 受容体にリガンドが結合するとタンパク質切断が生じ、細胞内ドメインが核内に移行して、転写調節因子 RBP-J と結合して、標的遺伝子の転写を活性化する。腎臓の発生過程においては Notch 受容体およびリガンドが一過性に発現し、腎臓形成に重要な役割を果たしていることが知られているが、腎臓病特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎の病態生理における Notch シグナルの関与についてはまだ報告が少なく十分に解明されていない。原発性糸球体腎炎の中でもっとも頻度の高いメサンギウム増殖性腎炎は、腎糸球体毛細血管の周囲に存在するメサンギウム細胞の細胞増殖および細胞外基質の増生をきたすことを特徴とする疾患である。腎炎の進展に伴ってメサンギウム細胞の増殖と形質転換を伴うことから細胞の分化や増殖に関与する発生シグナルが病態生理に関与する可能性が想定される。また最近、活性酸素種(ROS)による細胞内シグナル伝達経路が Notch シグナル経路とクロストークすることが相次いで報告されてきている。このことから ROS による Notch シグナル活性化が糸球体腎炎の進展に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

腎臓の発生に重要な役割を果たす Notch 受容体に着目し、そのメサンギウム増殖性糸球体腎炎の病態生理への関与を明らかにし、腎炎進行を抑制する治療薬開発の基盤となる知見を提供することを目的とする。また、最近、Notch シグナルは細胞内において活性酸素種による情報伝達系とクロストークすることが報告されてきている。そこで、抗酸化能を有するポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチンがメサンギウム増殖性糸球体腎炎の進展に与える影響を明らかにすることを目的とする。さらに、ROS シグナルを抑制する新規抗酸化物質を探索する目的で各種カルバゾール関連化合物を用いて腎細胞の活性酸素障害抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

Wistar ラットに抗 Thy1 抗体(CD90)を静脈注射し、Thy1 腎炎を惹起させた。その後 1, 3, 5, 8 日後に腎組織を摘出して、組織切片を作成した。腎炎惹起は PAS 染色によって確認した。次に凍結切片を行って、抗 Notch1 抗体を用いた免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡で蛍光観察を行った。腎炎の Notch 受容体の発現を免疫組織化学的に検討した。また、培養ヒトメサンギウム細胞を用いて、同様に Notch 受容体の発現を免疫組織化学的に検討した。

次に Thy1 腎炎モデルを用いて、ポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチンを連日経口投与し、Thy1 腎炎の抑制効果を検討した。8 日後に 24 時間尿、血液を採取するとともに腎臓を摘出した。Thy1 腎炎の改善効果は尿中総タンパク量および尿中微量アルブミンによって評価した。尿中総タンパク量は Bradford の方法を用いて定量し、また、尿中微量アルブミンはモノクローナル抗体を用いた ELISA 法によって定量した。

次に、有効な成分を探索するために各種カルバゾール関連化合物を用いて、活性酸素による腎細胞障害抑制効果を調べた。ブタ腎細胞由来 LLC-PK1 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、カルバゾール関連化合物を過酸化水素曝露 1 時間前から 24 時間後まで 25 時間インキュベートした。過酸化水素曝露は 100 μ M の濃度で 2 時間行い、過酸化水

素を含まない培地に交換してさらに 22 時間培養した。最後に WST-1 と 1-methoxyPMS を含む培地で 1 時間インキュベートした後、その上清の吸光度を測定し、細胞生存率を求め、細胞障害作用は細胞生存率の減少として求めた。

4. 研究成果

ラット Thy1 腎炎モデルを用いて、メサングウム増殖性腎炎の進展に伴う Notch1 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、Thy1 抗体による腎炎惹起 8 日後に Notch1 が顕著に発現することを見出した。また、8 日目の腎系球体を PAS 染色で観察したところメサングウム細胞と思われる顕著な細胞増殖像が散見された。また、メサングウム細胞のマーカーである SMA(平滑筋アクチン)との2重免疫組織染色により Notch1 と SMA の共局在が認められた。さらに、増殖中ヒトメサングウム細胞の初代培養において同様に免疫組織化学的に検討したところ、その細胞表面に Notch1 受容体の発現を認めた。ヒトメサングウム細胞は体内では通常増殖しないが、初代培養では勢いよく増殖する。初代培養に用いる培養液の刺激により、形質転換を生じて増殖を開始するものと考えられており、この初代培養メサングウム細胞は、メサングウム増殖性系球体腎炎の病態生理の一部を反映するものと考えられている。これらのことから、メサングウム増殖性系球体腎炎の進行過程において、一過的に Notch1 が発現し、Notch シグナルがメサングウム増殖性腎炎の進展に関与することが示唆された。

次に、抗酸化能を介して Notch シグナルに影響を与えると考えられるポリメトキシフラボノイドの一種ノビレチンを経口投与して、Thy1 腎炎の抑制効果を調べたところ、尿中総タンパク量、尿微量アルブミンにおいて有意な改善効果を認めなかった。その理由として、今回使用したノビレチンが高度に精製された純結晶から成るため、消化管からの吸収率が低いことが考えられた。最近、ノビレチンの極微細粒化により吸収を改善したという報告も出ており、本研究の結果については今後さらに用量設定や投与方法を工夫した上で再検討する必要があると考えられる。

また、各種カルバゾール関連化合物を用い

て腎細胞株 LLC-PK1 の過酸化水素による細胞障害に対する抑制効果を調べたところ、ヒドロキシカルバゾールの一種が顕著な抑制作用を示すことを見いだした。また、この化合物は ROS が細胞障害に関与することが知られている抗がん剤シスプラチンによる細胞障害に対しても保護作用を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yuhzo Hieda, Noriyuki Hatae, Makoto Anraku, Nobuyasu Matsuura, Kazuhide Uemura, Satoshi Hibino, Tominari Choshi, Hisao Tomida, Osamu Hori, and Haruto Fujioka
“Antioxidant Effects Of The Hydroxyl Groups In The Simple Phenolic Carbazoles”
Heterocycles, 92(1),120-132 (2016)
査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 上村 和秀、杉田 智也、稗田 雄三、波多江典之、藤岡 晴人、町支 臣成、日比野 俐
カルバゾール関連化合物による腎尿細管細胞酸化ストレス障害抑制効果の検討
日本薬学会第 136 年会
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2016 年 3 月 26 日～29 日
2. Kazuhide Uemura, Masashi Honda, Yuuki Hashizume, Tatsuya Morimoto, Takahiko Ono, Toshisuke Kawasaki
Mesangial Deposition of Mannan-Binding Protein during Exacerbations of IgA Nephropathy in HIGA (High IgA) Mice
Society for Glycobiology Annual Meeting 2015
Hilton San Francisco Union Square
(アメリカ合衆国サンフランシスコ市)
2015 年 12 月 1 日～4 日
3. 上村 和秀、三浦 典子、大野 尚仁、鈴木 和男、森本 達也、小野 孝彦、川崎 敏祐
系球体腎炎および血管炎モデルマウスにおける血清マンナン結合タンパク質の沈着

東京大学安田講堂（東京都文京区）

2015年7月31日～8月2日

〔その他〕

ホームページ

<http://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/f5d25ad1537602c1b1f62fe88a27e284b90b1ad4.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

上村 和秀 (UEMURA, Kazuhide)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：20303844