

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860673

研究課題名(和文) 自然炎症とレニン・アンジオテンシン系の相互作用が糖尿病腎症悪化に果たす意義の解明

研究課題名(英文) The relationship between homeostatic inflammation and renin-angiotensin system in the progression of diabetic nephropathy

研究代表者

桑原 孝成 (Kuwabara, Takashige)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：00393356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は糖尿病性腎症における自然炎症の役割を検討する中で、腎組織内でもとりわけ糸球体浸潤マクロファージ(Mf)のMRP8陽性率が高い現象を確認していた。STZ糖尿病マウスへのアンジオテンシンII投与によるアルブミン尿および糸球体MRP8発現の増加はTLR4欠損により抑制されなかった。また培養メサンギウム細胞の培養上清刺激によるMfのMRP8発現誘導はTLR4阻害薬で遮断されなかったため、糸球体内細胞間クロストークによるMRP8発現誘導はTLR4非依存性と考えられた。特に糸球体内細胞間クロストークを伴うような病態においてMRP8を標的とする治療はTLR4遮断とは異なる意義を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously observed that the macrophages (Mf) infiltrated in glomeruli showed higher MRP8 positivity compared to those in interstitium in diabetic nephropathy. TLR4 deletion did not ameliorate the worsening of diabetic nephropathy nor glomerular MRP8 upregulation by angiotensin II infusion. Besides, MRP8 upregulation in Mf stimulated with mesangial cell-cultured medium was not altered by TLR4 antagonist. Taken together, MRP8 could become a novel therapeutic target rather than blockade of TLR4 especially in the pathogenesis associated with intraglomerular cross talk.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自然炎症 糖尿病性腎症 レニン・アンジオテンシン系 MRP8 細胞間クロストーク

1. 研究開始当初の背景

近年、Toll-like receptor 4 (TLR4)をはじめとする自然免疫に関わる病原体センサーと内因性リガンドの相互作用による「自然炎症」が肥満や自己免疫疾患の分子基盤として注目されている。申請者は糖尿病性腎症の糸球体病変に関わる分子の網羅的探索を行い、内因性リガンド/受容体の関係にある Myeloid-related protein 8 (MRP8: S100A8)/TLR4 の両分子が発症機序の全く異なる2種の糖尿病モデルマウス系球体で共通して発現増加していることに着目してきた。同時に高脂血症が糖尿病性腎症の独立した危険因子であることや糖尿病マウスへの高脂肪食(HFD)が腎症を悪化させることから、申請者は糖尿病性腎症の悪化因子としての脂質に着目してきた。その後の検討により、糖と脂質の刺激によって活性化した Mφを介する腎病変悪化の key molecule として内因性リガンド/受容体の関係にある MRP8/TLR4 が重要であることを明らかにした(桑原. Diabetologia 2012)。さらに一連の検討の中でアンジオテシノーゲン(Agt)発現を検討したところ、糖尿病高脂血症合併モデルマウスでは肝臓での発現は抑制される一方、腎臓での発現が大きく増加していたことから、腎組織局所のレニン・アンジオテンシン系(RA系)活性化を引き起こすと考えられた。糖尿病高脂血症合併マウスへのアンジオテンシン受容体阻害薬(ARB)投与により MRP8/TLR4 シグナルの強い抑制が起こることを確認していることから、MRP8/TLR4 シグナルは糖と脂質によって直接活性化を受けるのに加え、RA系の下流で活性化される機序が想定された。しかしながら MRP8/TLR4 シグナルと RA系のクロストークについてその詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では自然炎症の一端を担う MRP8/TLR4 シグナル経路の糖尿病性腎症における役割を明らかにする目的で、MRP8/TLR4 シグナルと RA系とのクロストークが糖尿病性腎症悪化に果たす機序を検討した。さらに糖尿病性腎症および肥満関連腎症を含む患者の腎組織 MRP8 発現を評価、腎機能などと比較検討することで病態における意義の検討を行った。

3. 研究の方法

(1)糸球体内在細胞と Mφの共培養系を用いた細胞間相互作用の検討、および糖尿病マウスへの AII 投与効果に対する TLR4 遮断効果のメカニズムの検討による MRP8/TLR4 シグナルと RA系のクロストークが糖尿病性腎症悪化に果たす機序の解明

1-a) ラットメサンギウム細胞、ラット近位尿管細胞とマウス Mφを共培養し、マウス遺伝子の特異的に検出する系により Mφの遺伝子発現を検討

1-b) 糖尿病高脂血症合併モデルマウス系球体における Agt と MRP8 の局在の組織学的検討

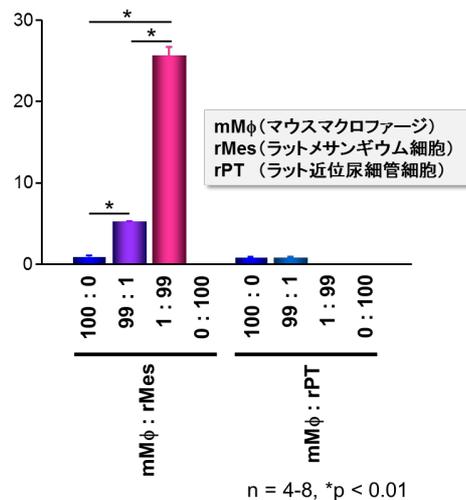
1-c) Mφへのメサンギウム細胞培養上清刺激による MRP8 発現誘導に対する TLR4 阻害効果の検討

(2) 糖尿病性腎症および肥満関連腎症を含む患者の腎組織 MRP8 発現と腎予後との関連の検討。

4. 研究成果

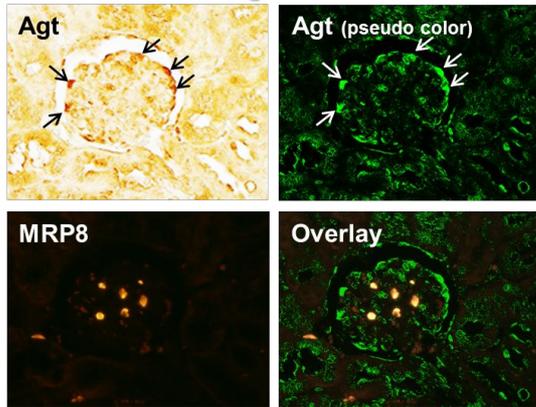
1-a) ラットメサンギウム細胞、ラット近位尿管細胞とマウス Mφを共培養し、マウス遺伝子の特異的に検出する系により Mφの遺伝子発現を検討した。TLR4 遺伝子発現は Mφとメサンギウム細胞あるいは近位尿管細胞との共存による影響は認められない一方、MRP8 は Mφがメサンギウム細胞と共存したときのみ、強力な発現誘導が認められた(図1)。またこの効果はメサンギウム培養上清刺激によってもほぼ同等に認められており、何らかの液性因子を介することが想定された。

図1 MRP8 / GAPDH



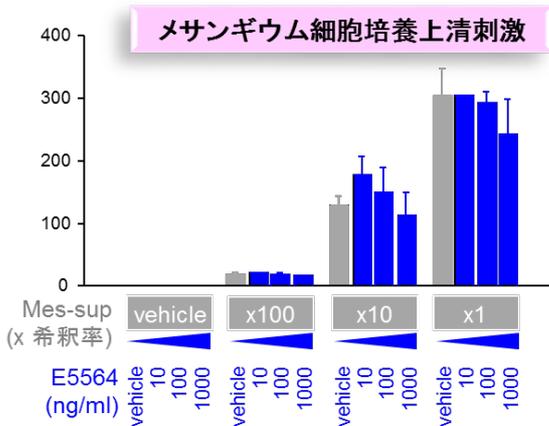
1-b) 糖尿病高脂血症合併モデルマウスでは Agt mRNA の主要産生部位である肝臓での発現は低下する一方で腎臓、特に糸球体での発現が大きく増加することが確認されたため、Agt と MRP8 の局在を免疫組織学的に検討した。その結果、Agt は糸球体上皮細胞、MRP8 は過去に我々が検討した結果同様糸球体係蹄内の浸潤細胞パターンであり、Agt と MRP8 は同一細胞での発現上昇ではないと考えられた(図2)。

**図2: 糖尿病高脂血症合併モデルマウス糸球体におけるAgt, MRP8発現の局在**



1-c) Mφへのメサンギウム細胞培養上清刺激による炎症誘導に対するTLR4阻害薬(E5564)投与効果の検討を行った。Mφに対するMRP8刺激によるIL-1β誘導効果はTLR4阻害薬で遮断される一方、メサンギウム細胞培養上清刺激による効果はTLR4阻害薬では抑制されなかった(図3)。

**図3 IL-1β / GAPDH**

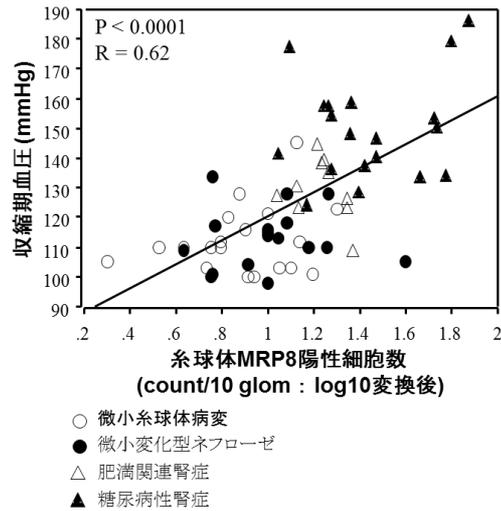


糖尿病マウスへのAngII投与による腎症悪化時の腎糸球体MRP8発現の強力な上昇や糖尿病高脂血症モデルマウスへのアンジオテンシン受容体阻害薬投与による糸球体MRP8発現上昇抑制などを認めることから、糖尿病マウス腎臓で活性化したレニン・アンジオテンシン系はMφの糸球体へのリクルートなどを介して糸球体内細胞間クロストークを促進、MφのMRP8発現を誘導するものと考えられた。また、糸球体内細胞間クロストークによるMRP8発現誘導は少なくとも一部はTLR4非依存性であり、MRP8を標的とする治療はTLR4阻害とは異なる意義を持つ可能性が期待される。

(2) 過去に腎生検を行った患者の腎組織標本を用いて糖尿病性腎症および肥満関連腎症を含む患者の腎組織MRP8発現と腎予後との関連を検討した。腎組織MRP8発現は尿蛋白あるいは血清クレアチニンで示される腎

機能と正の相関を示し、さらに既知の腎予後規定因子で補正後もなお、腎組織MRP8発現は1年後の尿蛋白量を独立して予測する因子であった(発表論文)。またこの検討の中で腎組織MRP8発現と血圧の関連を検討したところ、きれいな正の相関関係を認め、レニン・アンジオテンシン系と腎組織MRP8発現の関連を臨床的に示唆する結果とおもわれる(図4)。

**図4: 腎組織MRP8発現と血圧との関連**



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14件)

Nakano D, Doi K, Kitamura H, Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Nishiyama A. Reduction of Tubular Flow Rate as a Mechanism of Oliguria in the Early Phase of Endotoxemia Revealed by Intravital Imaging. J Am Soc Nephrol. in press (査読有)

Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K. An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions. Clin Exp Nephrol. 19(1):99-106, 2015. (査読有)

Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima S, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive Significance of Kidney Myeloid-related Protein 8 Expression in Patients with Obesity- or Type 2 Diabetes-associated

Kidney Diseases. PLoS One 18;9:e88942, 2014. (査読有)

Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K. Macrophage-mediated glucolipotoxicity via MRP8/TLR4 signaling in diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol. 18:584-92, 2014. (査読有)

Uetake R, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Yoshizawa T, Koyama T, Yang L, Toriyama Y, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Kuwabara T, Mori K, Yanagita M, Mukoyama M, Shindo T. Adrenomedullin-RAMP2 System Suppresses ER Stress-Induced Tubule Cell Death and Is Involved in Kidney Protection. PLoS One. 9:e87667, 2014. (査読有)

Kasahara M, Nakagawa T, Yokoi H, Kuwabara T, Yasuno S, Mori K, Mukoyama M, Ueshima K. Do statins play a role for renoprotection? Clin Exp Nephrol. 18:282-5, 2014. (査読有)

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: 143-54, 2013. (査読有)

早田学、栞原孝成、向山政志：ディポサイトカインと腎障害。腎と透析 78: 印刷中, 2015 (査読無)

栞原孝成、向山政志：S100 タンパク質ファミリー-Myeloid-related protein 8 (MRP8)。別冊 BIO Clinica 4 (1): 94-98, 2014. (査読無)

森 潔、栞原孝成、横井秀基、笠原正登、向山政志、柳田素子：急性腎障害のバイオマーカー動向。臨床化学 43: 5-8, 2014. (査読無)

栞原孝成、今牧博貴、向山政志：糖尿病性腎症における自然炎症とレニン・アンジオテンシン系のかかわり。血圧 20:1079-1083, 2013. (査読無)

栞原孝成、向山政志：糖尿病性腎症における自然炎症の意義とその分子機序。腎・高血圧の最新治療 2 (3): 129-136, 2013. (査読無)

栞原孝成、森 潔、向山政志：腎症と脂質代謝異常～糖脂肪毒性の役割～。静脈経腸栄養 28:933-938, 2013. (査読無)

石井 輝、栞原孝成、笠原正登：スタチン。月刊 糖尿病 5:80-87, 2013. (査読無)

〔学会発表〕(計5件)

Takashige Kuwabara, POTENTIAL ROLE OF MRP8 IN GLOMERULAR INJURY THROUGH INTRAGLOMERULAR CROSSTALK AFFECTING MACROPHAGE CHARACTERIZATION. APCN2014, 2014.5.14, 品川プリンスホテル(東京)

Takashige Kuwabara, Role of chronic inflammation in diabetic nephropathy through glucolipotoxicity and intraglomerular crosstalk, 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress. 2014.9.13, 国立京都国際会館(京都)

栞原孝成、糖尿病性腎症進展に果たす自然炎症の役割とその活性化機序～脂質、RA系として細胞間クロストーク～、日本腎臓学会学術総会、2014.7.5、パシフィコ横浜(神奈川)

Takashige Kuwabara, Glomerular MRP8 expression predicts progression of proteinuria in obese or type2 diabetic patients. Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2014.11.15, Philadelphia (US).

Takashige Kuwabara, Kidney Myeloid-related Protein 8 Expression predicts renal prognosis in obese or type 2 diabetic patients. World Congress of Nephrology, 2015.3.14, Cape Town (South Africa).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称：腎疾患の診断方法  
発明者：栞原孝成  
権利者：国立大学法人京都大学  
種類：用途特許  
番号：特願 2014-261973  
出願年月日：平成 26 年 12 月 25 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.kumadai-nephrology.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栞原 孝成 (Kuwabara, Takashige)  
熊本大学生命科学研究部、助教  
研究者番号：00393356