

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461226

研究課題名(和文)生活習慣病関連腎症の発症・進展における臓器・細胞間と内分泌因子の意義

研究課題名(英文) Roles of humoral factors and organ-organ or cell-cell communications in the development and progression of metabolic kidney diseases

研究代表者

向山 政志 (MUKOYAMA, Masashi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40270558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病、肥満や高血圧等の生活習慣病に伴う生活習慣病関連腎症(metabolic kidney diseases)では内分泌調節異常の存在が示唆される。本研究では、この病態における内分泌因子及び臓器・細胞間に関与し、主に動物モデルを用いて研究を行った。

その結果、アルドステロンによるpodocyte傷害に対する内因性Na利尿ペプチド系のp38MAPK抑制を介した保護作用、肥満糖尿病性腎症での交感神経活性化とpodocyte傷害におけるN型Caチャンネルの関与、腎障害進展における自然炎症とRA系のクロストーク及びマクロファージ由来因子MRP8の意義等を明らかにし、新たな創薬への可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Lifestyle-related noncommunicable diseases such as diabetes, obesity and hypertension are the major risk for metabolic kidney diseases, in which endocrine dysregulation in organ-organ or cell-cell communications in the kidney may be suggested. We investigated roles of humoral factors in this pathophysiology.

We found that the natriuretic peptide (ANP and BNP) receptor GC-A in podocytes is important in protecting against aldosterone-induced glomerular injury in mice. We also found the role of N-type calcium channels in sympathetic nerve activation and podocyte injury in obese diabetic mice with nephropathy. Finally, we found the pathogenic role of local homeostatic inflammation driven by toll-like receptor 4 and its endogenous ligand myeloid-related protein 8 (MRP8), a macrophage-derived proinflammatory factor, in mouse models of diabetes-hyperlipidemia as well as proliferative nephritis. These findings may provide potential therapeutic strategies for metabolic kidney diseases.

研究分野：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学 内分泌学 メタボリック症候群 糖尿病性腎症 レニン・アンジオテンシン系 ナトリウム利尿ペプチド N型カルシウムチャンネル 自然炎症

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病、高血圧やメタボリック症候群 (MetS) の増加とともに慢性腎臓病 (CKD) 患者は増加の一途をたどり、この病態は生活習慣病関連腎症 (metabolic kidney diseases) として捉えられる。またいわゆる「心腎連関」をはじめとして、多臓器連関による生体恒常性維持の重要性とその破綻の病態形成における役割が示されてきた。心腎連関 (心腎症候群) の機序には内分泌因子を中心に種々の要因が関与するが、特に CKD では循環血中や組織局所でのレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系活性化の意義が指摘され、RAA 系阻害の有用性が検討されてきた。しかし臨床的にみてその効果は限定的といわざるを得ない。新たな CKD 治療戦略を展開するためには、恒常性維持機構のネットワーク的理解とより広い視野からのアプローチが望まれる。

我々はこれまで、一貫して Na 利尿ペプチド (NP) ファミリー (ANP、BNP、CNP) の translational research を推進してきた。そして、ANP、BNP の心不全、腎不全での診断薬としての有用性 (Mukoyama et al. *N Engl J Med* 1990, *J Clin Invest* 1991 他)、さらに治療薬としての意義を証明するなど、今日の日常臨床応用への展開に貢献した。同時に、NP 系の遺伝子改変動物の開発を通してそれらの意義の解明を追求し、ANP・BNP 受容体 (GC-A) 欠損マウスでの著しい高血圧と心肥大、BNP 欠損マウスでの心室線維化を証明した (Tamura, Mukoyama et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000)。さらに BNP 過剰発現マウスを用いて、NP が種々の腎障害モデルで明らかな腎保護作用を発揮することを示した (Kasahara, Mukoyama et al. *J Am Soc Nephrol* 2000; Suganami, Mukoyama et al. *J Am Soc Nephrol* 2001; Makino, Mukoyama et al. *Diabetologia* 2006)。

最近、MetS による腎障害にアルドステロン-鉱質コルチコイド受容体 (MR) 系の関与が示唆されている。ANP・BNP/GC-A 系は RAA 系に対して強力な拮抗作用を示すが、腎局所での直接作用は明らかでなかった。我々は GC-A 欠損マウスにアルドステロンを投与

した加速型高血圧モデルで検討し、ネフローゼレベルの蛋白尿と podocyte 傷害を来たすことを見出し、作用機序の検討を進めている。

一方、MetS での臓器障害の基盤として、交感神経系の関与や、心臓、血管、脂肪など組織局所での慢性炎症の意義も注目されている。腎臓でもその関与が想定されるが、詳細については不明である。我々は糖尿病・高脂血症合併モデルで検討し、マクロファージ由来炎症惹起因子 myeloid-related protein 8 (MRP8, S100A8) とその受容体 toll-like receptor 4 (TLR4) の発現亢進が病態形成に極めて重要であることを見出し (Kuwabara, Mukoyama et al. *Diabetologia* 2012)、新たな概念の確立と創薬への展開を進めている。

2. 研究の目的

本研究では、生活習慣病関連腎症における蛋白尿と腎障害進行のメカニズム、特に podocyte を中心とした糸球体傷害の分子基盤とネットワーク機構の解明を目指し、特に内分泌因子に注目し研究を行う。NP 系では podocyte GC-A とアルドステロンとのクロストークの解明、肥満糖尿病モデルでは交感神経系と N 型 Ca チャネル (NCaC) の意義を検討し、さらに新規炎症惹起因子としてのマクロファージ由来 myeloid-related protein 8 (MRP8) の腎臓での意義を明らかにする。そして、生活習慣病関連腎症の発症・進展における内分泌因子の意義の解明と臨床応用の実現とともに、新たな創薬へと展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Na 利尿ペプチド (NP) 系の生活習慣病関連腎症における意義の検討:

アルドステロン負荷腎障害モデルにおける podocyte での ANP・BNP 受容体 (GC-A) 及び p38MAPK の意義の解明のために、podocyte 特異的 GC-A 欠損マウス (pod-GC-A KO) マウスを作製、その表現型を解析した。片腎摘後の野生型及び pod-GC-A KO マウスにアルドステロン (0.2 µg/kg/分) の持続皮下注と 6% 高食塩食の投与を行って 4 週間観察し、また p38MAPK 阻害薬 (FR167653) の作用を検討した。さらに、培養 podocyte

を用いた in vitro 解析を行った。

(2) 肥満糖尿病での交感神経系と N 型 Ca チャネル (NCaC) の意義の検討：

NCaC の $\alpha 1$ subunit 欠損マウスと肥満糖尿病マウス (*db/db*) を交配して *db/db* NCaC ホモ欠損マウス (糖尿病 KO) を作製し、ヘテロ KO とともに血圧、糖代謝、腎組織及び交感神経活性などの表現型を解析した。また、培養 podocyte を用いた解析を行った。

(3) 腎症進展における自然炎症とマクロファージ由来 MRP8 の意義の検討：

db/db マウス及び STZ 糖尿病性腎症モデルに angiotensin II あるいは ARB (オルメサルタン) 投与を行い、MRP8 の発現を解析するとともに、RA 系とのクロストークを検討した。さらに、lysozyme M-Cre マウスと MRP8 floxed マウスを交配して骨髄細胞特異的 MRP8 欠損マウス (myelo-MRP8 KO) を作製し、抗 GBM 腎炎モデルでの解析を行った。

4. 研究成果

(1) NP 系の生活習慣病関連腎症における意義の検討：

アルドステロン負荷後、GC-A KO マウスは野生型と比較して 20~30 mmHg 高い高血圧を示すが、pod-GC-A KO マウスは有意の血圧上昇を認めなかった。しかしその一方、pod-GC-A KO では著しい蛋白尿 (~15 倍) と podocyte 傷害、糸球体硬化を認めた。このモデルに p38 MAPK 阻害薬 (FR167653) の投与を行うと、ほぼ正常にまで改善を示し、その機序に p53 と metalloproteinase-10 の発現抑制が重要であることを示した。

培養 podocyte においては ANP が MAPK phosphatase-1 (MKP-1) 活性化を介して p38 MAPK を抑制し、さらに *Bax/Bcl2* 比低下とアポトーシス抑制に働くことを示した。

(2) 肥満糖尿病での交感神経系と NCaC の意義の検討：

糖尿病ホモ KO マウスでは野生型と比べ、軽度血圧低下、糖代謝改善及び尿中カテコールアミン著減とともに、アルブミン尿の明らかな減少 (-70%) を認めた。さらに、糖尿病ヘテロ KO マウスでも、血圧・糖代謝は変

化を認めないがアルブミン尿の有意の低下を認め、この腎保護効果は一部血糖・血圧非依存的と考えられた。培養 podocyte を用いた検討と併せ、この機序に podocyte の NCaC 阻害が直接関与する可能性が示された。

(3) 腎症進展における自然炎症とマクロファージ由来 MRP8 の意義の検討：

db/db マウス及び STZ 糖尿病モデルへの低用量 angiotensin II の投与で腎組織 MRP8-TLR4 系は明らかに活性化し、RA 系賦活時の自然炎症の関与が示唆された。一方、STZ 高脂肪食モデルへの非降圧量 ARB 投与で MRP8 発現が著減し、両システム間でのクロストークの存在が考えられた。マウス培養マクロファージ (RAW264.7) とラットメサンギウム細胞との共培養を行うと、マクロファージで著しく MRP8 発現が誘導され、この際メサンギウム細胞由来エクソソーム中に含まれる液性因子が関与することを見出した。

また、myelo-MRP8 KO マウスに抗 GBM 腎炎を発症させると、野生型と比べ腎障害及び腎組織の明らかな改善を認め、自然炎症が広く腎症進展に関与する可能性が示された。

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 18 件)

1. Kato Y, Mori K, Kasahara M, Osaki K, Ishii A, Mori KP, Toda N, Ohno S, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Saleem MA, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H: Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Sci Rep* 7: 46624, 2017; doi: 10.1038/srep46624.
2. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, Kuwabara T, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Kuwahara K, Endo T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K: Increase of total nephron albumin filtration and reabsorption in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 28: 278-289, 2017; doi: 10.1681/ASN.2015101168.
3. Toda N, Mori K, Kasahara M, Ishii A, Koga K,

- Ohno S, Mori KP, Kato Y, Osaki K, Kuwabara T, Kojima K, Taura D, Sone M, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H: Crucial role of mesangial cell-derived connective tissue growth factor in a mouse model anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Sci Rep* 7: 42114, 2017; doi: 10.1038/srep42114.
4. Kakizoe Y, Miyasato Y, Onoue T, Nakagawa T, Hayata M, Uchimura K, Morinaga J, Mizumoto T, Adachi M, Miyoshi T, Sakai Y, Tomita K, Mukoyama M, Kitamura K: A serine protease inhibitor attenuates aldosterone-induced kidney injuries via the suppression of plasmin activity. *J Pharmacol Sci* 132: 145-153, 2016; doi: 10.1016/j.jphs.2016.09.005.
5. Ohno S, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwahara K, Fujikura J, Naito M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Saleem MA, Numata T, Mori Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M: Ablation of the N-type calcium channel ameliorates diabetic nephropathy with improved glycemic control and reduced blood pressure. *Sci Rep* 6: 27192, 2016; doi: 10.1038/srep27192.
6. Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, Yoshimura Y, Ohmori T, Sakuma T, Mukoyama M, Yamamoto T, Kurihara H, Nishinakamura R: Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol* 27: 1778-1791, 2016; doi: 10.1681/ASN.2015010096.
7. Iwashita Y, Kuwabara T, Hayata M, Kakizoe Y, Izumi Y, Iiyama J, Kitamura K, Mukoyama M: Mild systemic thermal therapy ameliorates renal dysfunction in a rodent model of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F1206-F1215, 2016; doi: 10.1152/ajprenal.00519.2015.
8. DuMond JF, Ramkissoon K, Zhang X, Izumi Y, Wang X, Eguchi K, Gao S, Mukoyama M, Burg MB, Ferraris JD: Peptide affinity analysis of proteins that bind to an unstructured N-terminal region of the osmoprotective transcription factor NFAT5. *Physiol Genomics* 48: 290-305, 2016; doi: 10.1152/physiolgenomics.00110.2015.
9. Morinaga J, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Terada K, Tian Z, Sugizaki T, Tanigawa H, Zhao J, Zhu S, Sato M, Araki K, Iyama K, Tomita K, Mukoyama M, Tomita K, Kitamura K, Oike Y: Angiopoietin-like protein 2 increases renal fibrosis by accelerating transforming growth factor- β signaling in chronic kidney disease. *Kidney Int* 89: 327-341, 2016; doi: 10.1016/j.kint.2015.12.021.
10. Narita Y, Ueda M, Uchimura K, Kakizoe Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, Hayata M, Nakagawa T, Adachi M, Miyoshi T, Sakai Y, Kadowaki D, Hirata S, Mukoyama M, Kitamura K: Combination therapy with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor telmisartan and serine protease inhibitor camostat mesilate provides further renoprotection in a rat chronic kidney disease model. *J Pharmacol Sci* 130: 110-116, 2016; doi: 10.1016/j.jphs.2016.01.003.
11. Koga K, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Mori KP, Kato Y, Ohno S, Toda N, Saleem MA, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M: MicroRNA-26a inhibits TGF- β -induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting *CTGF* and is downregulated in diabetic nephropathy. *Diabetologia* 58: 2169-2180, 2015; doi: 10.1007/s00125-015-3642-4.
12. 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* 26: 3035-3044, 2015; doi: 10.1681/ASN.2014060577.
13. Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP, Kato Y, Kuwahara T, Satoh M, Nakatani K, Saito Y, Tomosugi N, Sugawara A, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Mori K: Low serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin level as a marker of malnutrition in maintenance hemodialysis patients. *PLoS One* 10: e0132539, 2015; doi: 10.1371/journal.pone.0132539.
14. Kondo E, Yasoda A, Fujii T, Nakao K,

Yamashita Y, Ueda-Sakane Y, Kanamoto N, Miura M, Arai H, Mukoyama M, Inagaki N, Nakao K: Increased bone turnover and possible accelerated fracture healing in a murine model with an increased circulating C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 156: 2518-2529, 2015; doi: 10.1210/en.2014-1801.

15. Ueda M, Uchimura K, Narita Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, Hayata M, Kakizoe Y, Adachi M, Miyoshi T, Shiraiishi N, Kadowaki D, Sakai Y, Mukoyama M, Kitamura K: The serine protease inhibitor camostat mesilate attenuates the progression of chronic kidney disease through its antioxidant effects. *Nephron* 129: 223-232, 2015; doi: 10.1159/000375308.

16. 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: 99-106, 2015; doi: 10.1007/s10157-014-0952-7.

17. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K: Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 18: 584-592, 2014; doi: 10.1007/s10157-013-0922-5.

18. Itoh K, Izumi Y, Inoue T, Inoue H, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Yasuoka Y, Makino T, Nagaba Y, Tomita K, Kobayashi N, Kawahara K, Mukoyama M, Nonoguchi H: Expression of three isoforms of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) in the kidney and regulation by dehydration. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 356-361, 2014; doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.089.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 向山政志: 降圧治療から臓器保護を目指した治療へ: 新たな降圧薬としての ARNi の可能性. 第 39 回日本高血圧学会(シンポジウム) 2016 年 9 月 30 日~10 月 2 日、仙台

2. 向山政志: 新たな降圧薬としての angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNi). 第 5 回臨床高血圧フォーラム(シンポジウム) 2016 年 5 月 14 日~5 月 15 日、東京

3. 向山政志: Na 調節の考え方と循環調節ホルモン. 第 45 回日本腎臓学会西部学術大会(招待講演) 2015 年 10 月 23 日~10 月 24 日、金沢

4. 向山政志: 心腎代謝連関と心臓血管ホルモン. 第 88 回日本内分泌学会(シンポジウム) 2015 年 4 月 23 日~4 月 25 日、東京

5. 向山政志: 循環調節ホルモンと臓器連関. 第 38 回日本高血圧学会(シンポジウム) 2015 年 10 月 9 日~10 月 11 日、松山

6. 向山政志: 高血圧・腎臓病における Na 利尿ペプチド系と臓器連関. 第 37 回日本高血圧学会(シンポジウム) 2014 年 10 月 17 日~10 月 19 日、横浜

7. Osaki K, Mukoyama M, et al.: Matrix metalloproteinase-10 in glomeruli of aldosterone-infused systemic and podocyte-specific guanylyl cyclase-A knockout mice. 第 49 回米国腎臓学会、2016 年 11 月 17 日~11 月 20 日、シカゴ、アメリカ

8. Umemoto S, Mukoyama M, et al.: Intraglomerular crosstalk between mesangial cells and macrophages in glomerular injury. 第 49 回米国腎臓学会、2016 年 11 月 17 日~11 月 20 日、シカゴ、アメリカ

9. Kuwabara T, Mukoyama M, et al.: Myeloid-specific deletion of MRP8 ameliorates glomerulonephritis through affecting macrophage characterization. 第 49 回米国腎臓学会、2016 年 11 月 17 日~11 月 20 日、シカゴ、アメリカ

10. Ohno S, Mukoyama M, et al.: Role of N-type calcium channel in a mouse model of diabetic nephropathy. 第 48 回米国腎臓学会、2015 年 11 月 5 日~11 月 8 日、サンディエゴ、アメリカ

11. Kuwabara T, Mukoyama M, et al.: Kidney myeloid-related protein 8 expression predicts renal prognosis in obese or type 2 diabetic patients. 2015 年国際腎臓学会、2015 年 3 月 13 日~3 月 17 日、ケープタウン、南アフリカ

12. Koga K, Mukoyama M, et al.: Glomerular microRNA-26a expression correlates with eGFR in diabetic nephropathy and its regulation in podocytes. 第 47 回米国腎臓学会、2014 年 11 月 13 日～11 月 16 日、フィラデルフィア、アメリカ

13. Kato Y, Mukoyama M, et al.: Role of the natriuretic peptide GC-A receptor on podocytes in aldosterone-induced glomerular injury. 第 47 回米国腎臓学会、2014 年 11 月 13 日～11 月 16 日、フィラデルフィア、アメリカ

14. Mukoyama M, et al.: Role of N-type calcium channel in diabetic nephropathy. 2014 年国際高血圧学会、2014 年 6 月 13 日～6 月 16 日、アテネ、ギリシア

15. Kato Y, Mukoyama M, et al.: Inhibition of p38 MAP kinase ameliorates aldosterone-induced podocyte injury in natriuretic peptide receptor (GC-A)-deficient mice. 第 18 回国際血管生物学会、2014 年 4 月 14 日～4 月 17 日、京都

〔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：兼原孝成、森 潔、向山政志、今牧博貴

権利者：国立大学法人京都大学、国立大学法人熊本大学

種類：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

取得状況（計 0 件）

〔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

向山 政志 (MUKOYAMA, Masashi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：4 0 2 7 0 5 5 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森 潔 (MORI, Kiyoshi)

静岡県立大学・薬学部・特任教授

研究者番号：6 0 3 4 3 2 3 2

(4)研究協力者

兼原 孝成 (KUWABARA, Takashige)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：0 0 3 9 3 3 5 6