

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860639

研究課題名(和文)新規腎線維化促進因子Angptl2の機能解明と臨床応用

研究課題名(英文)The role of Angiopoietin-like protein 2 in renal fibrosis

研究代表者

森永 潤 (Morinaga, Jun)

熊本大学・その他の研究科・その他

研究者番号：50459210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎線維化は、慢性腎臓病進展における最終共通経路であり、慢性炎症と密接に関連することが知られているものの、その分子基盤はいまだ未知な点も多い。申請者は、慢性炎症誘導蛋白Angiopoietin-like protein (ANGPTL) 2が腎線維化の病態進展に関与するかを明らかにする目的で研究を行った。その結果、腎線維化病態では尿細管においてANGPTL2とTGF- $\beta$ 1が相互誘導により増幅しあい、TGF- $\beta$ 1発現増幅が腎線維化を促進することに加え、ANGPTL2発現増幅が線維化腎へのマクロファージ浸潤を増加させ、更なる腎線維化を促進する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Here, we demonstrate a molecular link between chronic inflammation and tissue fibrosis in chronic kidney disease (CKD) progression. Specifically, we report histological analysis indicating abundant expression of angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) in renal tubule epithelial cells during progression of renal fibrosis. Analysis of collecting duct cells revealed that TGF- $\beta$ 1 increases ANGPTL2 expression by attenuating its repression by the microRNA-221. Conversely, ANGPTL2 increased TGF- $\beta$ 1 expression through  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase. Furthermore, ANGPTL2 deficiency in a mouse unilateral ureteral obstruction model significantly reduced renal fibrosis by decreasing TGF- $\beta$ 1 signal amplification in kidney. Our study provides insight into molecular mechanisms underlying chronic inflammation and tissue fibrosis and identifies targets potentially useful for CKD treatment.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎線維化 ANGPTL2 TGF- $\beta$ 1 尿細管細胞 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

腎線維化は、慢性腎臓病 (CKD) 進展における最終共通経路であり、予後不良を示唆する病変である。また、臓器線維化は慢性炎症と密接に関連することが知られているものの、その関連における分子基盤はいまだ未知な点も多い。

申請者の所属する研究室では、これまで恒常性維持機構の破綻により起こる様々な疾患 (例えば糖尿病、動脈硬化、がんの発症及び進展など) において疾患臓器より多量に産生・分泌される Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) が局所における慢性炎症を惹起し、病態進展に関与することを明らかにしてきた。腎臓領域においては、九州大学と共同で行った横断研究から、血中 ANGPTL2 濃度が CKD の有病率、微量アルブミン尿排泄量などと関連することが明らかとなったものの、その分子基盤は全く分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

これらの背景から申請者は、ANGPTL2 が慢性腎臓病及び腎線維化の病態進展に関与するか、もし関与するのであればそのメカニズムは何か、という点を明らかにする目的で研究を行った。

### 3. 研究の方法

ヒト線維化腎における ANGPTL2 発現の評価尿管がんにより摘出された腎臓 (がん病変を含まない) に対して、免疫染色、in situ hybridization 法を用いて ANGPTL2 の発現評価を行った。また、レーザーマイクロダイセクション法により得られた腎尿管・間質組織における ANGPTL2 と COL1, TGF $\beta$  の転写レベルを解析した。

#### 尿管における ANGPTL2 発現制御解析

TGF- $\beta$  刺激に対する尿管細胞 (M-1) の尿管における ANGPTL2 の発現変化を解析した。また、その ANGPTL2 の発現変化に関連する micro RNA (miR) を検索した。

#### 尿管に対する ANGPTL2 の作用解析

の逆方向の応答として、ANGPTL2 刺激に対する TGF- $\beta$  の発現変化を解析し、その発現変化に関与する細胞内シグナルを探索した。

腎線維化モデルにおける *Angpt12* ノックアウトマウス (KO) の表現型解析

Wild-type (WT) をコントロールとして腎線維化モデルにおける *Angpt12* KO 腎の TGF- $\beta$  シグナル、線維化を解析した。

また、*Angpt12* KO マウス腎線維化モデルにおいて、マクロファージの腎臓内浸潤を面積染色、フローサイトメトリーを用いて評価した。

### 4. 研究成果

#### ヒト線維化腎における ANGPTL2 発現

線維化腎の尿管細胞において、ANGPTL2 は強く発現し、分泌されることが明らかになった。また、腎尿管間質領域における

ANGPTL2 と COL1 の遺伝子発現は正に相関していた。

さらに、尿管免疫染色において、ANGPTL2 と TGF- $\beta$  の発現パターンは類似していた。また尿管間質領域の ANGPTL2 と TGF $\beta$  遺伝子発現も正に相関しており、腎線維化病態にある尿管で ANGPTL2 と TGF- $\beta$  が互いに関連しあっている可能性が示唆された。

#### TGF- $\beta$ による ANGPTL2 の誘導メカニズム

ANGPTL2 発現に対し抑制的に作用する miR-221 発現が TGF- $\beta$  刺激によりダウンレギュレーションされることから、TGF- $\beta$  が脱抑制的に ANGPTL2 を誘導する可能性を明らかにした。

#### ANGPTL2 による TGF- $\beta$ 誘導メカニズム

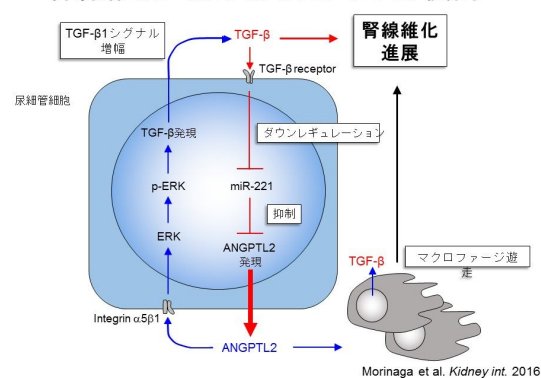
申請者らは、ANGPTL2 が  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン/ERK 活性化を介し TGF- $\beta$  を誘導する可能性を明らかにした。

#### *Angpt12* KO マウスの腎線維化

腎線維化モデル (UUO) により、腎臓内 ANGPTL2 発現、ERK 活性化、TGF- $\beta$  発現、smad3 活性化、CTGF 発現は著明に亢進したが、*Angpt12* KO マウスではこれらの変化が軽度にとどまった。また、腎線維化モデルではマウス腎臓に著明な臓器線維化や細胞外マトリクス成分の発現増加が認められたが、*Angpt12* KO マウスでは腎線維化が軽度であった。

また、面積染色及びフローサイトメトリーを用いて評価した線維化腎臓内のマクロファージ浸潤は、*Angpt12* KO 腎で優位に低下していた。

腎線維化における ANGPTL2 の役割



上記に示す図のように成果 ~ をまとめた。以下図の説明を記載する。

慢性腎臓病及び腎線維化の病態進展において ANGPTL2 は尿管細胞に多量に発現し、分泌されるが、この多量発現には TGF- $\beta$  による miR-221 発現減少が関与している。逆に、尿管から分泌された ANGPTL2 はインテグリン/ERK シグナルを介し TGF- $\beta$  発現を誘導する。

腎線維化病態において、これら ANGPTL2 と TGF- $\beta$  相互誘導により腎臓内における両分子の発現増幅が起こるが、TGF- $\beta$  発現増幅が

腎線維化を促進することに加え、ANGPTL2 発現増幅が線維化腎へのマクロファージ浸潤を増加させ、それに伴う炎症増悪、マクロファージ由来 TGF- 発現の更なる増加を介して腎線維化を促進する(下図)。

#### 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4)

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. Angiotensin-like protein 2 increases renal fibrosis by accelerating transforming growth factor- signaling in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016 Feb;89(2):327-41. doi: 10.1016/j.kint.2015.12.021. Epub 2016 Jan 1. (査読あり)

Masuda T, Endo M, Yamamoto Y, Odagiri H, Kadomatsu T, Nakamura T, Tanoue H, Ito H, Yugami M, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Iwase H, Mizuta H, Oike Y. ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. *Sci Rep.* 2015 Mar 16;5:9170. doi:10.1038/srep09170. Erratum in: *Sci Rep.* 2015;5:9789. (査読あり)

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.* 2016 Feb;130(2):110-6. doi: 10.1016/j.jphs.2016.01.003. Epub 2016 Jan 20. (査読あり)

Ueda M, Uchimura K, Narita Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, Hayata M, Kakizoe Y, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi 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.* 2015;129(3):223-32. doi:10.1159/000375308. Epub 2015 Mar 3(査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

森永 潤, 富田 公夫, 北村 健一郎, 尾池 雄一, 向山 政志, 腎線維化における TGF-シグナル増幅機構の解明, 第 57 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 6 月, 名古屋市

Jun Morinaga, Rika Yamazoe, Terumasa Nakagawa, Yasuhiro Yoshimura, Yoshikazu Miyasato, Yuki Narita, Yoshihiro Iwashita, Miki Ueda, Teruhiko Mizumoto, Tomoaki Onoue, Kohei Uchimura, Manabu Hayata, Yutaka Kakizoe, Taku Miyoshi, Masataka Adachi, Yuichi Oike, Masashi Mukoyama, Kenichiro Kitamura. The role of Angiotensin-like protein 2 in renal fibrosis: Kidney week 2014 (Annual meeting of American Society of Nephrology), フィラデルフィア、ペンシルバニア州、米国

森永 潤, 北村 健一郎, 富田 公夫, 尾池 雄一. ANGPTL2 は腎線維化を促進する: 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2014 年 7 月, 横浜市

〔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 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

森永 潤 (MORINAGA Jun)

熊本大学生命科学研究部臨床研究支援センター・特任助教、研究者番号：50459210