

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460329

研究課題名(和文) PPAR 活性化による腎実質細胞保護を目的とした新たな慢性腎臓病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new CKD therapy aimed for renoprotection by renal PPARalpha activation

研究代表者

上條 祐司 (KAMIJO, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授

研究者番号：50377636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は慢性腎臓病時にも使用可能なペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 型 (PPAR) アゴニストを見出し、腎の PPAR 活性化を介した慢性腎臓病治療法を開発することを目的とした。本研究では、アンジオテンシンIIレセプター拮抗薬であるイルベサルタンが腎実質細胞の PPAR 活性化作用を持つこと、またマウスを用いた protein overload nephropathy モデルにおいてイルベサルタンの投与は PPAR 活性化依存性の腎保護効果を発揮することを確認した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish the safe PPAR agonist which is usable in chronic kidney disease situation. This study demonstrated that an angiotensin II receptor antagonist Irbesartan activates renal PPAR, and exerts renoprotective effects in murine protein overload nephropathy model. These findings would be useful to develop novel therapeutic strategy against chronic kidney disease.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎保護 脂肪酸 ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 炎症 酸化ストレス アンジオテンシン レセプター拮抗薬

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は成人人口の約 13% が罹患している common disease である。続発する末期慢性腎不全や心血管病の著増は世界的にも大きな問題であり、より効果的な CKD 治療薬の開発が必要である。

CKD の原疾患は多種多様であるが、「糸球体障害 蛋白尿 尿細管間質障害 ネフロン機能の喪失」といった腎病変進展カスケードは多くの腎疾患に共通しており、糸球体障害抑制と蛋白尿毒性対策が CKD 治療に大変重要と考えられる。

様々な研究結果から、蛋白尿と共に尿細管に負荷される脂肪酸が尿細管毒性を発揮する重要な尿細管障害因子であることが報告されている。

我々は、蛋白尿に伴う脂肪酸毒性に対する腎実質細胞内 PPAR の重要性について PPAR 遺伝子欠損マウスの腎病変を用いた研究を継続的に行ってきた。その結果、

(1) PPAR は尿細管細胞の脂肪酸代謝の恒常性維持と正常な尿細管機能の発現に必要である (Kamijo Y, J Am Soc Nephrol 13: 1691-1702, 2002)

(2) PPAR 欠損は、脂肪酸代謝異常をもたらし、蛋白尿に付随する脂肪酸尿細管毒性を助長させ、そして脂肪酸毒性機序において酸化ストレス、アポトーシス、炎症が増強され、蛋白尿による尿細管障害が悪化する (Kamijo Y, J Am Soc Nephrol 18: 3089-3100, 2007)

(3) フィブラートなどの PPAR アゴニストは、蛋白尿に付随する脂肪酸尿細管毒性を軽減し腎保護効果を発揮する

(Takahashi K, Kamijo Y et al. Toxicol Appl Pharmacol 252:237-249, 2011)

などの研究結果を報告してきた。

これらの結果は CKD 進展過程において、PPAR アゴニストによる PPAR の活性化が、蛋白尿に伴う脂肪酸毒性に対し脂肪酸代謝恒常性維持・抗酸化ストレス作用・抗アポトーシス作用・抗炎症作用を発揮して、腎保護的に機能する可能性を示唆するものである。しかしながら、代表的な PPAR 作動薬であるフィブラート薬は、腎不全時には血中濃度が上昇しやすく腎毒性を発揮する可能性があること (Takahashi K, Kamijo Y et al. Toxicol Appl Pharmacol 252:237-249, 2011)、また、実臨床でも腎不全時の使用が禁忌であることから、実際の CKD 治療に応用するためには、腎不全時にも使用可能な PPAR アゴニストを確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は慢性腎臓病時にも使用可能なペルオキシソーム増殖剤活性化受容体型 (PPAR) アゴニストを見出し、腎の PPAR 活性化を介した慢性腎臓病治療法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

我々は、腎不全時にも使用可能で PPAR 活性化作用を有す可能性のある薬剤としてアンジオテンシン II レセプター拮抗薬 (ARB) であるイルベサルタンやテルミサルタン、そして肝排泄性フィブラート薬であるクリノフィブラートに注目した。

本研究では候補薬物の腎実質細胞における PPARs (PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ ) 活性化能力の有無について明らかにするために野生型マウスに候補薬物を投与し、腎 PPAR の活性化とその標的遺伝子の発現について検討した。

候補薬物が確定された後に、尿細管障害動物モデルにおける候補薬物の PPAR 活性化を介した腎保護作用の有無について検討した。腎障害モデルは、protein overload nephropathy を用いた。腎保護作用が確認できた後に、それが PPAR 依存性の作用であるかを確定するために PPAR ノックアウトマウスと PPAR 特異的アンタゴニストを用いた実験を行い、腎保護効果の変化について検討した。

#### 【本研究で用いた分子生化学的解析項目】

- ・ PPAR 存在量の変化 (蛋白・mRNA の発現変化) および、PPAR 転写活性変化 (PPAR の PPRE 結合能力の変化、代表的な既知の PPAR 標的遺伝子の蛋白・mRNA の発現変化)
- ・ PPAR 活性による炎症伝達経路の活性化 (主に NF- $\kappa$ B 経路: NF- $\kappa$ B 転写活性の変化、I $\kappa$ B 及び NF- $\kappa$ B 標的遺伝子群の発現変化)
- ・ 脂質代謝変化 (腎組織内脂肪酸含有量、脂肪酸代謝酵素群の発現及び機能変化)
- ・ 酸化ストレス変化 (脂質過酸化マーカー・DNA 酸化マーカーの変化、NADPH oxidase・酸化ストレス消去酵素群の蛋白・mRNA 発現変化)
- ・ アポトーシス変化 (TUNEL 法によるアポトーシス細胞変化、Bcl-2 family 蛋白群の発現変化)

#### 【分子生化学的解析手法】

- ・ 蛋白分子の発現、機能、局在変化 比色定量法、ELISA 法、immuno blot 法、免疫染色法
- ・ mRNA の発現変化 real-time PCR 法
- ・ PPAR 転写活性変化 核蛋白を用いた PPRE DNA 結合能測定 (ELISA 法)

### 4. 研究成果

候補薬物の中で、他の候補薬物よりアンジオテンシン II レセプター拮抗薬 (ARB) の 1 種であるイルベサルタン (Irbe) が PPAR の発現量を増加させ、強い腎実質細胞の PPAR 活性化作用を持つことを見出した (図 1)。そのため、PPAR 活性化作用による腎保護効果の検証は Irbe を用いて検討することとした。

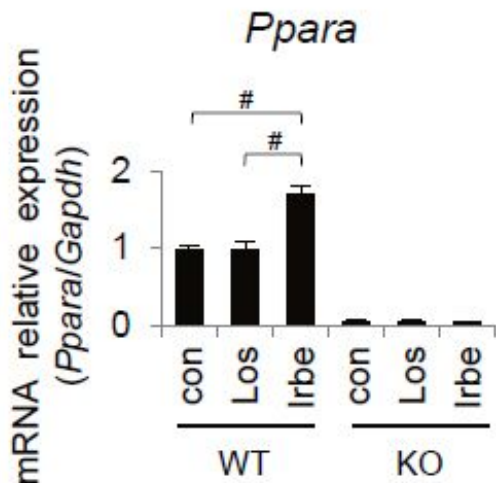


図1 .イルベサルタンによる腎組織中の PPAR mRNA の変化。mRNA は real-time PCR 法にて測定した。イルベサルタン(Irbe)を投与した野生型 (WT) マウスでは PPAR の mRNA 発現が有意に上昇した。一方、ロサルタン(Los)を投与した野生型マウスやイルベサルタンを投与した PPAR 遺伝子欠損マウスでは (KO) そのような変化は起きなかった。# P<0.05.

次に、protein overload nephropathy モデル (PON)における Irbe の腎保護効果について検討した。Irbe は ARB 製剤であるため、レニン・アンジオテンシン系 (RAS 系) の強い抑制作用を持つ。Irbe の RAS 抑制作用による腎保護効果を考慮するために対照薬としては、PPAR 活性化作用のない ARB であるロサルタン (Los) を用いた。その結果、PON マウスにおいて Irbe を投与した群では Los 群に比較し有意に尿蛋白排泄量が抑制され、腎障害に伴う腎腫大が軽減することが見いだされた。腎病理学的解析では、Irbe 群では有意に尿細管障害が軽減していることが判明した(図2)。

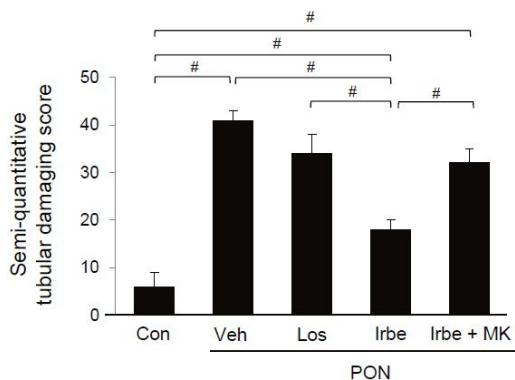


図2 . Protein overload nephropathy に対するイルベサルタンの組織的改善。尿細管障害の程度を尿細管障害スコアを用いて判定量した。Vehicle (Veh) やロサルタン(Los)を投与した Protein overload nephropathy マウスや、イルベサルタン (Irbe) +PPAR

antagonist を投与した群では、尿細管障害スコアは有意に高かったが、イルベサルタン投与群では尿細管障害が有意に軽減した。# P<0.05.

また分子機序の解析により、Irbe 群では蛋白尿に付随する脂肪酸毒性による様々なイベント (PPAR の機能低下、脂肪酸代謝能力の低下、炎症反応亢進、酸化ストレス増加、アポトーシスの亢進) が軽減していることが判明した。

これらの効果は Los 群、PPAR ノックアウト群、PPAR antagonist 投与群で消失することから PPAR 依存性の腎保護効果であると結論した。

これらの結果は、腎 PPAR 活性化による CKD 治療に重要な情報を与える成果であると考える。

## 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 6 件)

1.PPAR -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. Harada Y, Tanaka N, Ichikawa M, Kamijo Y, Sugiyama E, Gonzalez FJ, Aoyama T. Arch Toxicol. 2016 Feb 2. [Epub ahead of print] (査読有)

2. Outcomes of blood flow suppression methods of treating high flow access in hemodialysis patients with arteriovenous fistula. Kanno T, Kamijo Y, Hashimoto K, Kanno Y. J Vasc Access. 2015 Suppl 10:S28-33. (査読有)

3. Serum sulfatide abnormality is associated with increased oxidative stress in hemodialysis patients. Yuzhe H, Kamijo Y, Hashimoto K, Harada M, Kanno T, Sugiyama E, Kyogashima M, Oguchi T, Nakajima T, Kanno Y, Aoyama T. Hemodial Int. 2015;19:429-38. (査読有)

4. A case of podocytic infolding glomerulopathy with multiple myeloma. Harada M, Kamijo Y, Ehara T, Shimojo H, Shigematsu H, Higuchi M. BMC Nephrol. 2014;15:32. (査読有)

5. Chronic ethanol consumption decreases serum sulfatide levels by suppressing hepatic cerebroside sulfotransferase expression in mice.

Kanbe H, Kamijo Y, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Wang L, Fang ZZ, Hara A, Gonzalez FJ, Aoyama T.  
Arch Toxicol. 2014;88:367-79. (査読有)

6. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates enhancement of gene expression of cerebroside sulfotransferase in several murine organs.

Nakajima T, Kamijo Y, Yuzhe H, Kimura T, Tanaka N, Sugiyama E, Nakamura K, Kyogashima M, Hara A, Aoyama T.  
Glycoconj J. 2013, 30:553-60. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 第 59 回日本腎臓学会学術総会 (2016 年 6 月 19 日 横浜) イルベサルタンはマウス腎においてペルオキシソーム増殖剤活性化受容体を介した腎保護作用を有する  
原田真、橋本幸始、山田洋輔、中島岳郎、青山俊文、上條祐司

〔図書〕(計 1 件)

1. 疾患モデルの作成と利用 脂質代謝異常と関連疾患 (上巻) 2015、477 (72-79)  
中島岳郎、上條祐司、田中直樹、青山俊文ほか

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上條 祐司 (KAMIJO, Yuji)  
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・准教授  
研究者番号： 50377636

### (2) 研究分担者

青山 俊文 (AOYAMA, Toshifumi)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号： 50231105

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：