

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10991

研究課題名(和文) 外傷後AKI(急性腎障害)に対する尿細管細胞死制御による遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy by tubule cell death regulation for post-traumatic AKI (acute kidney injury)

研究代表者

上田 健太郎 (Ueda, Kentaro)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20438279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：まず、Bcl-2 expression HVJ Envelope vectorとHGF expression HVJ Envelope vectorを作製した。これらを腎皮質集合管細胞由来のM1細胞にtransfectionし、Bcl-2あるいはHGFの発現増強効果を確認した。腎虚血再灌流モデルによるin vivo実験を行った。Bcl-2遺伝子を投与した群ではコントロール群と比較して明らかにアポトーシスとオートファジーを共に抑制して腎機能悪化は軽度であった。さらに、これにHGF遺伝子投与を併用することでAKIは重症モデルにおいてもほぼ制御することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：First, Bcl-2 expression HVJ Envelope vector and HGF expression HVJ Envelope vector were prepared. These were transfected into M1 cells derived from renal cortical collecting duct cells and the effect of enhancing the expression of Bcl-2 or HGF was confirmed. We performed an in vivo experiment using the renal ischemia reperfusion model. In the group to which the Bcl-2 gene was administered, apoptosis and autophagy were clearly inhibited compared with the control group, and the deterioration of renal function was mild. Furthermore, by using HGF gene administration in combination therewith, it was possible to control almost even the AKI critically ill model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：AKI アポトーシス オートファジー Bcl-2遺伝子 HGF遺伝子 HVJ Envelope vector

1. 研究開始当初の背景

高エネルギー体幹部外傷や出血性ショックに対する緊急手術の術後、圧挫症候群解除後あるいは腹部コンパートメント症候群の ICU 管理中に発症する合併症として急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) がある。これらに合併してくる AKI は虚血性変化によるものであり腎灌流減少が高度かつ持続的であることで尿細管器質的障害に至った状態であり急性尿管壊死 (acute tubular necrosis: ATN) を呈することが多く、一度発症すると非常に高い治療抵抗性を示し、救命率低下の大きな一因となっており、AKI の早期診断と適切な予防と治療が必須である。しかし、現時点で AKI に対する明確な予防法や絶対的な治療法はまだ確立されておらず、新規 AKI 療法の開発が待たれている。

細胞死に対する研究は癌細胞に対する治療効果のメカニズムとして最も多く行われており、アポトーシス (タイプ 1 細胞死) が大部分だと考えられてきたが実際臨床データでは DNA 損傷作用剤で誘導される癌細胞死におけるアポトーシスの比率は高くないことが判明した (Cancer Biology & Therapy 2003;2:477)。そしてオートファジー (タイプ 2 細胞死) の癌細胞死に対する働きが注目を集めこの細胞死の概略が明らかにされつつある (Nature Review Cancer 2005;5:726)。

一方、AKI での尿細管細胞死は癌細胞同様まずアポトーシスの報告が散見され、P21 誘導による cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) の抑制によるアポトーシス制御 (J Am Soc Nephrol 17: 2434, 2006)、Fas 誘導アポトーシスの抑制 (Kidney Int 79: 169, 2011) により AKI を軽減できると報告されている。最近、オートファジーの関与に関しては様々な機序が発表されたので下記に書す。細胞死の主な形態はアポトーシス、オートファジー、ネクローシスの 3 つであり、細胞への侵襲が軽度であればオートファジーが、中等度であればアポト

シスが、重度ならばネクローシスが発生するという機序が発表され (Immunol Rev 227: 189, 2009, N Engl J Med 361: 1570, 2009)、この機序に従えば、アポトーシスやネクローシスが発生しない程度の弱い侵襲でも細胞はオートファジーを発生してそれが臓器障害 (AKI) に繋がる可能性がある。一方、動物の虚血再灌流モデル、シスプラチン腎症モデルにおいてオートファジー阻害は細胞死 (AKI) を進行させるという逆の機序が報告された (J Am Soc Nephrol 21: 1702, 2010, J Am Soc Nephrol 22: 902, 2011)。いずれにしろ、オートファジーが癌細胞死のメカニズムと同様、AKI 発症・進行に関与している可能性は高く、今後細胞障害・細胞死に対する治療を考える場合はネクローシスやアポトーシスのみならず、オートファジーの評価法、発生機序、その制御法の解明に重要性が高まっている。

2. 研究の目的

重症外傷術後などに発症する急性腎障害 (AKI) は尿細管細胞死が主な病態であるが、アポトーシス以外の機序はまだはっきりしていない。そのため一度発症すると非常に高い治療抵抗性を示し、AKI 発症・進行の機序解明と新規 AKI 治療の開発が必要である。そこで今回我々は、虚血再灌流モデルを用いて AKI 重症度・AKI 発症からの時期に応じてどのようなタイプの細胞死 (アポトーシス、オートファジー、あるいはネクローシス) が関連しているのかを明確にする。次にすべてのタイプの細胞死を制御する Bcl-2 遺伝子治療の効果を検討し、さらに腎細胞を増殖・再生する HGF 遺伝子併用投与の相乗効果を検討する。また、今回の遺伝子治療中にオートファジー阻害剤を投与することで、オートファジーの AKI に対する機序は病態改善か悪化かを鮮明にする。

3. 研究の方法

研究代表者が留学していた MD Anderson C

ancer Centerから寄与されたBcl-2 cDNA plasmidと、HVJ Envelope vector KITを用いてBcl-2 expression HVJ Envelope vectorを作製した。同様に過去に当大学で作製したHGF cDNA plasmid (Surgery 139:563, 2006)を用いてHGF expression HVJ Envelope vectorを作製した。作製したそれぞれのHVJ Envelope vectorを腎皮質集合管細胞由来のM1細胞にtransfectionし、2日後に細胞・蛋白を回収し、Bcl-2あるいはHGFの発現増強効果を、リアルタイムPCR法ならびにWestern blot法で確認した。次に腎虚血再灌流モデルはWistarラットを用いてPentobarbitalを50mg/kg腹腔内投与による麻酔下で、両側腎門部の腎動静脈を露出し、クランプすることで作製した。50分クランプを軽症モデル、100分クランプを重症モデルとして安定した実験モデルを得た。

4. 研究成果

AKIに対する尿細管細胞死抑制を目的としたBcl-2 遺伝子治療に、腎再生を促進する HGF 遺伝子併用の効果検討 (モデル作製 3 日後、10 日後): 1)control (PBS) 群、2)HGF 群、3)Bcl-2 群、4)Bcl-2+HGF 群の 4 群を設定した (各群: n=8)。Day1:中等症あるいは重症腎虚血再灌流モデルを作製し、再灌流後両側腎動脈から Bcl-2 expression HVJ Envelope vector と HGF expression HVJ Envelope vector 投与。その後、独立した実験系で経時的 (3 日後、10 日後) に、下記に示す AKI、オートファジー、アポトーシスの評価項目を検討した。

- 1) AKI の評価項目---採血による Cr 値、BUN 値。採尿による L-FABP (L 型脂肪酸結合蛋白) 値。H-E 染色標本による近位尿細管上皮細胞の変性・壊死と再生の評価。
- 2) オートファジーの評価項目---Western blotting による LC3-I・LC3-II・BNIP3 の蛋白発現量の評価、Bcl-2 と Beclin 1 の Immunoprecipitation による Beclin 1 の活性化評価。Immunocytochemistry による

LC3-II の集積状態、Immunohistochemistry による p62 の発現状態。

- 3) アポトーシスの評価項目---RT-PCR あるいは Western blotting による Bcl-2、Caspase-3,-9、PARP の発現量。Immunocytochemistry による TUNEL 染色でアポトーシス細胞を評価。

その結果、Bcl-2 遺伝子を投与した群ではコントロール群と比較して明らかにアポトーシスとオートファジーを共に抑制して、腎機能悪化は軽症モデル・重症モデルいずれにおいても軽度であった。さらに、これに HGF 遺伝子投与を併用することで AKI は重症モデルにおいてもほぼ制御することが可能であった。しかしながら HGF 遺伝子単独投与群ではアポトーシスの抑制は見られたがオートファジーに関しては抑制効果が無く、有意な治療効果は得られなかった。

現在、オートファジー阻害剤を投与することでさらなるオートファジーの AKI に対する作用機序の解明を進めている。その結果が得られ次第、論文投稿する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 健太郎 (UEDA, Kentaro)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20438279

(2) 研究分担者

木田 真紀 (KIDA, Maki)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00326381

研究分担者

米満 尚史 (YONEMITSU, Takafumi)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80382331

(3) 研究協力者

()