

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19459

研究課題名(和文) AKIからの腎組織修復に慢性炎症が果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of chronic inflammation on renal recovery after AKI

研究代表者

早田 学 (Hayata, Manabu)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30646120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AKIからCKDへの移行過程に対して、生活習慣病の慢性炎症がどのような影響を与えるかは未だ分かっていない。B6マウスの片側腎に虚血再灌流障害を実施し慢性期の腎臓を観察すると、障害側腎は顕著に萎縮する。MetSモデルとしてDIOマウスおよびdb/dbマウスを用いて同様の実験を行ったが、多量の皮下脂肪が手技に影響し腎障害の評価が困難であった。現在AKI慢性期の腎組織を用いてPCR arrayによるパスウェイ解析を進行中である。

研究成果の概要(英文)：It is unclear how the underlying chronic inflammation in lifestyle-related diseases affects on the process of transition from AKI to CKD. In the chronic phase after IRI to the unilateral kidney of B6 mouse, the injured side kidney becomes atrophic. Although similar experiments were conducted using DIO and db/db mice as MetS models, a large amount of subcutaneous fats made it difficult to stabilize the IRI technical procedure enough to evaluate the chronic renal injury. Now, the pathway gene analysis by PCR array is in progress using chronic AKI tissues.

研究分野：腎臓内科

キーワード：急性腎障害 慢性腎臓病 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、プロスタシンが TLR4 ペプチドの K560/561 部位を切断しシグナルを軽減することによって、肝臓におけるインスリン抵抗性を改善することを報告した (Hayata M., *Nat Commun.* 2014)。TLR4 シグナルを介したインスリン抵抗性には、過剰な遊離脂肪酸やストレスを受けた細胞から分泌・放出される分子が内因性リガンドとして病態に重要な役割を果たすことが知られている (Donath MY. *Nat Rev Immunol* 2011)。この概念は自然炎症あるいは慢性炎症として生活習慣病、ガン、自己免疫疾患など多岐にわたる病態で重要であり、申請者らは CKD における慢性炎症をプロテアーゼ阻害剤 (フオイパン®) によって抑制することによる腎保護作用を報告している (Hayata M. *AJP renal* 2012)。

AKI は CKD 進展のリスク因子とされており (Wald R. *JAMA* 2009) その機序の一つとして AKI 後のリモデリング異常による組織修復不全が重要と考えられ、AKI からの修復過程において、腎組織局所で誘導される自然炎症が重要と考えられる (HJ. Anders *JASN* 2014)。一方、肥満やメタボリック症候群 (MetS) においても TLR4 に対する内因性リガンドが全身性に上昇 (O.H. Mortensen. *PLoS ONE* 2009) するのみならず、これに伴う腎障害時に腎組織局所で増加し腎症進展に重要な役割を果たす可能性が報告されている (Kuwabara T. *PLoS ONE* 2014)。しかし肥満が AKI 病態に与える影響については未だ明らかにならず、本研究は TLR4 シグナルあるいはその内因性リガンドの果たす役割を検討することで、AKI からの腎組織修復の機序解明さらには新規治療法の開発に繋げることを目的としている。

Myeloid-related protein 8 (MRP8; S100A8) は、敗血症性ショックの病態に重要な役割を果たす (Vogl T. *Nat Med.* 2007) が、AKI 慢性期における MRP8 の役割は不明である。STZ マウスに HFD を負荷すると糸球体の MRP8、TLR4 が相乗的に増加する。同様に *in vitro* では、マクロファージにおいて high glucose と fatty acid の同時刺激が TLR4 を介して MRP8 発現を相乗的に上昇させる (Kuwabara T. *CEN* 2014)。この二重刺激による MRP8 増加には TRIF dependent pathway, C/EBP beta, p-JNK を介する ER stress が関与していることが分かってきている。これらのことから、糖尿病・肥満患者が AKI を発症する場合に過剰な ER stress を介した同様の機序が病態に関わることが想定される。また *db/db* 肥満 2 型糖尿病モデルマウスに AII 投与を行うと、腎組織における MRP8、TLR4 発現が増加すると同時に腎症が進行することも確認しており、肥満における腎障害悪化の 1 つの要因として MRP8/TLR4 を介したシグナル増強が関わっていると予想される。

以上より、慢性炎症の存在下で AKI を発

症した場合には MRP8 のような内因性リガンドの発現が増強・持続し、TLR4, RAGE などの自然免疫受容体を介して AKI からの組織修復に影響を与え、更には CKD へと移行する機序となる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、TLR4 シグナルあるいはその内因性リガンドの果たす役割を検討することで、AKI からの腎組織修復機序の解明さらには新規治療法の開発に繋げることを目的とする。急性期や慢性期に特化した研究は多いが、TLR4 の内因性リガンドを長期的に観察した研究は少ない。炎症や線維化に関するこれまでの短期的観察によれば腎保護作用 / 腎障害促進作用の両面の報告があり見解は定まっていない。本研究は急性期から慢性期への移行をみるという経時的な観察をすることによって、注目する分子 (MRP8) の一面的な特性だけでなく多面的な性質を見出すことができる点が独創的である。MRP8 欠損動物に腎障害を加えることで予想される結果として、MI マクロファージによる炎症が主体の急性期には腎内の炎症が鎮静化されると思われる。一方で慢性期には次第に M2 依存の線維化が病態の主体となり、線維化が促進される可能性が考えられる。臓器・時期特異的な遺伝子改変動物を用い経時的影響を検討することによって、適切な治療ストラテジーの確立に役立つ可能性が期待される。

3. 研究の方法

(1) AKI から CKD への移行に MetS がどのように関わるか、モデル動物を用いて検討する。「AKI から CKD への移行に対し、MetS の慢性炎症が腎障害促進的に働く」という仮説で実験を行う。モデルには *db/db* および Diet induced obesity (DIO) マウスを用い、腎虚血再灌流障害 (IRI) 後の腎障害を継時的に観察する。申請者は既に、マウス IRI から 24 時間後の血清クレアチニンが有意に上昇していることを確認し手技を確立している。さらに、5 週齢 *db/db* マウスの片腎摘出後に IRI を行い 8 週間観察すると、コントロール BKS マウスに比べて *db/db* マウスは約 10 倍の高アルブミン尿を呈する傾向を確認している。これは IRI を行わない *db/db* マウスの natural course のアルブミン尿を上回っており、AKI から CKD への移行において MetS の慢性炎症が腎障害を促進させる可能性を示唆するものである。本マウスの腎障害を、血清クレアチニンと腎組織 PAS 染色による糸球体・尿管組織とマッソントリクローム染色による間質線維化で評価する。また real-time PCR および Western blotting により炎症・線維化マーカーについての詳細な解析を行う。またバツ

クグランドやモデルの相違を超えた現象であることを確認するために、B6 background の DIO マウスを作製し IRI を行う。HFD 群 (45 kcal% fat; Research diet 社) とコントロール食 (同社) とに分けてから2カ月後には体重と血糖に有意差がつくことを確認しているの、同時期に IRI を実施する。体重・血圧・血糖値・アルブミン尿を経時的に計測し、2カ月後の血清クレアチニン・腎組織障害の程度を評価する。

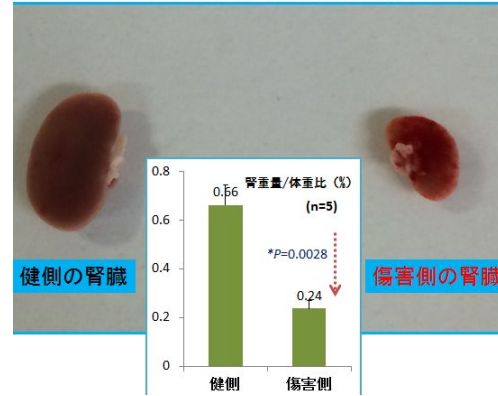
(2) AKI から CKD への移行過程における、TLR4 及びその内因性リガンドの変化を検討する。IRI 後の *db/db* マウスおよび DIO マウスを IRI から 8 週までのいくつかの phase でサクリファイスし、慢性炎症に関わる内因性リガンドおよび自然免疫受容体の発現を real-time PCR, Western blotting, 免疫染色によって確認する。また、細胞間シグナル伝達経路を明らかにするために MRP8・TLR4 の腎内局在を検討する。申請者らは免疫二重染色による検討で MRP8 の主な産生細胞はマクロファージであることを確認している。一方、MRP8 の受容体については TLR4, RAGE の両者が重要であることが知られており、STZ+HFD マウスの腎系球体で両分子の発現が増加することを確認しているが、局在が病態によって異なる可能性がある。

(3) 臓器および時期特異的な MRP8 KO マウスおよび TLR4 KO マウスを用いて、AKI から CKD への移行過程で、慢性炎症が腎障害に対して果たす役割を明らかにする。さらに *in vitro* の系を用いて MRP8 が腎組織局所の慢性炎症に与える機序を詳細に検討する。申請者らはマクロファージにおける MRP8 の欠損により、LPS 刺激で認められる M1 dominancy が明らかに抑制されることを確認している。肥満・糖尿病に AKI を合併した病態における MRP8 や TLR4 の役割を検討するために、*in vitro* で高糖濃度・遊離脂肪酸・低酸素・酸化ストレスによる刺激を行い解析する。全身性 MRP8 欠損マウスは胎生致死 (Passay, *J Immunol* 1999) であるため、臓器特異的あるいは薬剤誘導性 MRP8 欠損マウスを作製することで成体における意義を検討する。申請者らは既に floxed-MRP8 マウスと骨髄細胞特異的 Cre マウス (Lysozyme M-Cre マウス) の交配により作成した骨髄特異的 MRP8 欠損マウスにおいて、遺伝子組み換えとそれに伴う mRNA・蛋白の減少を確認している。このような臓器特異的あるいは薬剤誘導性の MRP8 / TLR4 欠損マウスで糖尿病など病態モデルを作製し、IRI による AKI 後の長期的観察を行う。

4. 研究成果

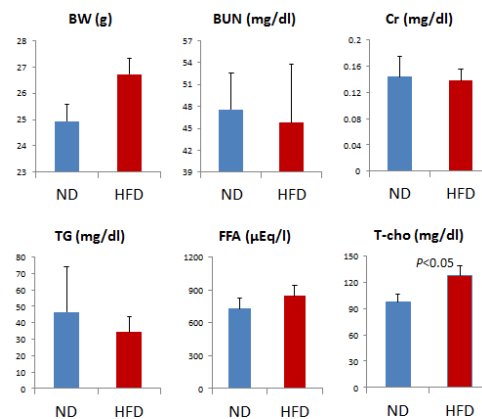
(1) B6 マウスの両腎を残した状態で、片側腎に IRI を 45 分実施し 7 週後に腎臓を観察すると、IRI を行った側の腎臓は障害を与えていない対側の腎臓と比較して著明に委縮を認める (図 1)。IRI 7 週後の委縮は、組織採取ができないほど高度であるため、より早期における検討 (4 週) を行った。IRI 前からの

図1 IRI後、傷害側の腎臓は委縮する



HFD 負荷による DIO マウス、または *db/db* マウスを用いた実験では、IRI そのものの障害がコントロールマウスと異なる可能性が高いため、IRI 後一般的に *sCre* が peak out するとされる3日後から HFD と ND の2群に分けて検討した。IRI 慢性期の腎萎縮変化は *db/db* マウスや DIO マウスといった MetS モデルにおいても観察されたが、腎周囲を含めて著明な皮下脂肪が手技に影響するためにコント

図2 IRIから4W後の体重と血液データの結果



ロールマウスとの比較が困難であった (図 2)。データ解析のためのサンプル量を確保するために、虚血時間を 45 分から 25 分へ短縮し 4 週から 3 週間後の短期観察とすることによって約 60% と適度な萎縮と確実な線維化が得られており (図 3) 現在これらのサンプルを用いて AKI から CKD へ移行する過程における慢性炎症の関わりを検証中である。

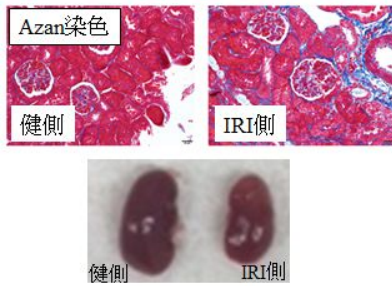


図3 B6マウスにIRIを25分実施し3週後の腎サイズ変化と線維化

(2) IRI から 4 週後、TLR4 の内因性リガンドである MRP8 の変化を免疫染色によって検討した結果、腎臓内 MRP8 の発現は非 IRI 群マウスと比較して有意差はなく、現在 IRI 急性期を含めて MRP8 の時系列変化を検証中である。また IRI マウスの慢性期萎縮腎サンプルを、real-time PCR アレイを用いたパスウェイ遺伝子発現の定量解析へかけて、炎症性サイトカインや WNT などのシグナル伝達経路の変化を検討している。

(3) マウス足細胞やラットメサングウム細胞を、低酸素や高酸化ストレスの環境下に置き、シグナル伝達の時系列変化を解析する。また、マウス系球体上皮細胞を用いてツニカマイシン刺激による小胞体ストレス関連マーカー上昇を確認しており(図4)、現在この系で MRP8 の関わりを検討中である。臓器および

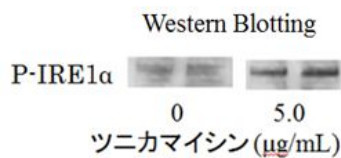


図4 マウス足細胞をツニカマイシンによって刺激し酸化ストレスマーカーの上昇を認める

時期特異的な MRP8 KO マウスおよび TLR4 KO マウスは交配継続中である。

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 5 件)

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 (2): 145-153, 2016.

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 (11): F1206-F1215, 2016.

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.

Shiraishi N, Kitamura K, Hayata M, Ogata T, Tajiri-Okamura K, Nakayama Y, Kohda Y, Tomita K, Mukoyama M. Low-density lipoprotein apheresis for proteinuria in lupus nephritis with intraglomerular foam cells containing cholesterol crystals. *Am J Kidney Dis* 65: 490-493, 2015.

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* 129: 223-232, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

Shuro Umemoto, Takashige Kuwabara, Manabu Hayata, Daisuke Fujimoto, Tomoko Kanki, Yuichiro Izumi, Yutaka Kakizoe, Masashi Mukoyama. Intraglomerular crosstalk between mesangial cells and macrophages in glomerular injury. American Society of Nephrology Kidney Week, 2016 年 11 月 15 日~20 日、シカゴ、アメリカ

早田 学, 水本 輝彦, 宮里 賢和, 内村 幸平, 森永 潤, 柿添 豊, 安達 政隆, 實吉 拓, 酒井 芳紀, 向山 政志, 北村 健一郎
メタボリックシンドロームモデルラットのポドサイト傷害とアポトーシスにおけるセリンプロテアーゼの役割

日本腎臓学会学術総会、2015 年 6 月 5 日~7 日、名古屋国際会議場、名古屋

〔図書〕(計 2 件)

早田 学, 桑原孝成, 向山政志: CKD と脂質異常症—脂肪毒性の役割—
最新医学 71(12): 2398-2404, 2016

早田 学, 桑原孝成, 向山政志: アディポサイトカインと腎障害. 腎と透析 78 (4): 541-547, 2015.

〔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

<http://www.kumadai-nephrology.com/>

6．研究組織

(1)研究代表者

早田 学（HAYATA, Manabu）
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30646120

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし