

令和元年6月20日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09620

研究課題名(和文) DNA損傷応答制御による慢性腎臓病の治療法開発

研究課題名(英文) A novel treatment method focusing on DNA damage response

研究代表者

岸 誠司 (KISHI, Seiji)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10519507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷に対する修復機構(DDR)は細胞の癌化抑制に重要であるが、非悪性疾患における役割は不明である。今回DDRが腎臓病の転帰に及ぼす影響をDDRのマスター遺伝子であるAtaxia telangiectasia and Rad3-related (ATR)に着目して検討した。ヒト多能性幹細胞由来のオルガノイド、ヒトCKDの腎組織で近位尿管上皮細胞でのDDR亢進が認められた。ATRを近位尿管特異的にノックアウトしたマウスでは、虚血再灌流、シスプラチンおよび片側尿管結紮による腎障害が増悪した。ATRは腎障害に対して保護的に作用していると考えられ、DDR調節は腎臓病の治療標的となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これから我々人類は超高齢化社会を迎えるが、慢性腎臓病が糖尿病よりも患者数が多いことが明らかになっただけでなく、急性腎障害も高齢化に加えて医療の高度化を背景に増加している。これまでDNA損傷の修復機構は主としてがん治療の標的として考えられてきたが、我々の得られた結果により、DNA損傷応答機構の調節は、腎臓病の進展に影響することが明らかとなった。今後、DNA損傷応答機構に着目した腎臓病治療法開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs) are the primary target of insults to the kidney. Maladaptive repair of RPTECs has been implicated in kidney fibrosis through induction of cell cycle arrest at G2/M. The role of DNA damage response (DDR) in the progression of kidney disease remains unknown.

We found that humans with CKD have activation of Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR), a master regulator of DDR and DNA damage in RPTECs. Following injury by cisplatin, ATR was expressed in 70% of PTECs in kidney organoids. RPTECs specific ATR knockout mice <ATRRPTC-/-mice> exhibited greater kidney functional impairment, DNA damage, and fibrosis in response to kidney injury by either bilateral ischemia reperfusion, cisplatin or unilateral ureteral obstruction. ATRRPTC-/-mice had increased G2/M arrested cells after injuries. ATR plays a protective role against tubular cell injury and fibrosis. Regulation of ATR may be a therapeutic target against human kidney disease.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：DNA損傷応答 急性腎障害 慢性腎臓病 線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷は様々な外的、内的要因によって日々生じており変異蛋白産生の原因となるのみならず、損傷の蓄積が細胞の癌化や機能不全を引き起こすことが分かっている。さらには細胞レベルでの老化を引き起こすことも明らかとなってきた。関連することが分かっている。そこで生体はその脅威に対抗するためのチェックポイント機構(DDR)を有している。DDR 調節は抗がん治療の標的としてこれまで研究が進んできたが、臓器機能低下につながる不可逆的な線維化との関係は明らかになっていない。

一般国民にも広く認知されることとなった慢性腎臓病 (CKD) は末期腎不全、さらには心血管病の重要な要因であるが、その中でも不可逆的に慢性進行性の経過を辿るものは病理学的に尿細管間質の線維化で特徴づけられる。さらには、完全に回復すると考えられていた尿細管壊死が原因の大半を占める急性腎障害(AKI)が CKD へ移行することも明らかとなり、従来は糸球体病変に続発すると考えられていた尿細管病変が線維化進展にはもちろんのこと CKD 発症にも重要であることが臨床的に明らかになってきている。(Am J Kidney Dis 2009; 53: 961-973, American journal of physiology, 2010; 98: F1078-F1094.)この現象は持続する尿細管の炎症が CKD 発症や糸球体硬化を引き起こし(Kidney Int. 2012 ;82:172-83)、さらには不全修復状態にある近位尿細管細胞は細胞周期が停止した状態(G2/M arrest)にあり、pericyte (微小血管に存在する周皮細胞)を活性化して腎線維化を進行させる(Nat Med. 2010;16:535-43)ことによると考えられている。

細胞老化は DNA 損傷に引き続いて起こる細胞周期の停止状態を指すが、DNA 損傷は紫外線や自然放射線等の外的要因および細胞内活性酸素、DNA 複製、DNA recombination 等の内的な要因によってもたらされる。これらに対する防御機構として細胞には DNA 損傷チェックポイント機構(DDR)が存在するが、その機構の過剰な活性化や破綻は DNA 障害を蓄積し、細胞老化をもたらすことが知られている。腎臓の尿細管では、虚血再灌流傷害や腎毒性物質への曝露などの後に、健康な腎では検出されない膜貫通タンパクである Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)が終末糖化産物(AGE)や酸化 LDL のエンドサイトーシスを媒介して DNA 障害を引き起こす酸化ストレスをもたらす(J Clin Invest. 2008 ;118:1657-68.)腎臓においては、その大部分を占める近位尿細管が、虚血、薬剤などの種々の因子により障害され急性腎障害を引き起こすのみならず、慢性腎臓病の予後を規定する間質の線維化に大きな役割を果たすことが分かっているが、その詳細なメカニズムは依然として不明である。

そこで、本研究では、DDR の破綻による DNA ホメオスターシスの異常が腎臓病の運命決定機構に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、DDR が腎臓病の運命決定機行におよぼす影響を明らかにするため、DDR の最上流に位置するマスター遺伝子である ATM and Rad 3-related (ATR) に注目し、DDR が腎臓病の転帰に及ぼす影響を、ヒト検体、培養細胞、ヒト多能性幹細胞由来の腎臓オルガノイド、遺伝子改変動物を用いた種々の実験により明らかにする。

### 3. 研究の方法

上記のメカニズム解明のために(1)徳島大学腎臓内科にて施行された腎生検組織を用いて、ヒト慢性腎臓病において DDR の発現に関する評価を行った。(2)培養近位尿細管上皮細胞および申請者もそのプロトコル開発に関する研究に関与した(Nat Biotechnol. 2015;33(11):1193-200.)、ヒト多能性幹細胞由来の腎臓オルガノイドを用いて、シスプラチン投与ならびに ATR inhibitor 存在下における DDR の発現評価に関する解析を行った。(3)尿細管特異的 ATR コンディショナルノックアウトマウス(ATR<sup>RPTC-/-</sup>)を作成したのち、ヒト腎臓病を模した3種類の腎障害モデルを作成し、その表現形を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト検体の解析

徳島大学病院にて倫理委員会の承認を得た、徳島大学病院腎臓内科で施行された腎生検検体を免疫染色し、ヒト腎臓病における DDR 発現解析を行った。腎機能低下を認める群においては、腎機能低下のないコントロール群(尿タンパク量に関しては2群間での有意差なし)の組織と比較して優位に近位尿細管上皮細胞において ATR 発現が増加していた。さらに phosphorylation of the core histone protein H2AX ( $\gamma$ H2AX)で標識される DNA 障害を認める近位尿細管も有意に増加していた。これに加えて、さらに近位尿細管障害のマーカーである KIM-1 と  $\gamma$ H2AX の二重染色を行ったところ、これらの共存する近位尿細管数は eGFR と逆相関していることが明らかとなった。つまり、ヒト腎臓病における DDR は慢性腎臓病の進展との関係が示唆された。

#### (2) 培養近位尿細管上皮細胞およびヒト多能性幹細胞由来オルガノイドの解析

培養近位尿細管上皮細胞ならびにヒト多能性幹細胞由来のオルガノイドに DNA 鎖を切断することによって尿細管毒性を発揮する抗がん剤であるシスプラチンを投与した。近位尿細管上皮

細胞では、ATR inhibitor の存在下ではシスプラチンによる細胞毒性が増加し、細胞死が増加した。さらにオルガノイドでは Lotus tetragonolobus lectin (LTL) で標識される近位尿細管細胞核での ATR 発現がシスプラチン投与にて増加しており、 $\gamma$ H2AX で標識される DNA 障害も認められた。ATR inhibitor の存在下では、LTL 陽性の尿細管数が減少しており、近位尿細管上皮細胞同様、シスプラチンによる細胞毒性が増大した。さらに尿細管上皮細胞において G2/M 細胞周期の尿細管が増加していた。すなわち、この現象は ATR が尿細管障害に対しては保護的に働くこと、そしてその結果生じる DDR 破綻によって生じる過剰な DNA 障害は近位尿細管上皮細胞に G2/M アレストを引き起こすことを示唆した。

(3) 尿細管特異的 ATR コンディショナルノックアウトマウス(ATR<sup>RPTC-/-</sup>)を用いた DDR 破綻による尿細管ゲノムホメオスタシス維持機構の障害が腎臓病の転機に及ぼす影響の評価

まず、近位尿細管の DNA を直接障害する抗癌剤であるシスプラチン投与による急性腎障害モデルの解析をさらに進めた。ATR<sup>RPTC-/-</sup>マウスではシスプラチン投与後の腎障害が増悪しており、死亡するマウスも認められた。シスプラチン投与後の腎組織は急性尿細管壊死が ATR<sup>RPTC-/-</sup>で増悪していた。これは、ATR をノックアウトすることにより、尿細管上皮細胞の DNA 障害が増幅され、DNA 修復が機能不全となることで、より多くのアポトーシスが誘導されること由来していると考えられた。さらに p53-p21 シグナルの活性化も増強しており、生存細胞においては G2/M 期での細胞周期の停止が増悪することが明らかとなった。これらの結果はオルガノイドで得られて結果に合致した。

次に AKI to CKD transition モデルとしてマウス腎動脈両側虚血再灌流モデルを解析した。虚血再灌流直後から 72 時間の急性期の腎障害の程度にノックアウトマウスとコントロールマウスでは差が認められなかったが、day7 以降で腎機能の回復過程に差が生じ、ATR<sup>RPTC-/-</sup>マウスで腎障害が遷延した。最終的に ATR<sup>RPTC-/-</sup>マウス群ではコントロール群に比較して、虚血再灌流 4 週間後の腎臓の線維化が増悪していた。さらに細胞老化の指標である SA- $\beta$  gal 染色により腎組織の老化の評価を行ったところ、ATR<sup>RPTC-/-</sup>マウス群ではコントロール群に比較して SA- $\beta$  gal 発言が増加していた。

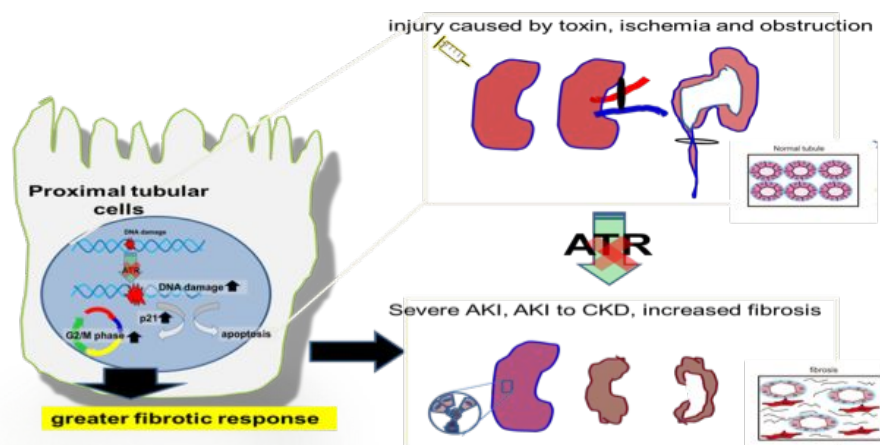
さらに、慢性腎臓病における DDR シグナルの異常とその病理学的指標である尿細管間質の線維化の直接の関係を作成するため、タモキシフェン投与後にマウスの一側の尿細管を結紮し (UUO モデル) 腎臓線維化を評価した。ATR<sup>RPTC-/-</sup>マウスではワイルドタイプと比較して、尿細管の障害が増悪し、TGF- $\beta$  および CTGF の発現も増加を認め、より高度の腎線維化が認められた。

ヒト腎臓検体、培養細胞およびオルガノイド、さらには遺伝子改変マウスモデルを用いた全ての結果から、DDR は腎臓病に対して、初期段階での DNA 障害を感知して、より重度の DNA 障害を防ぐべく機能していると考えられた。さらにこの役割は AKI のみならず CKD への以降や線維化の進行においても重要と考えられた。

DDR 調節は腎臓病の治療標的となる可能性のみならず、現在進行中のセルサイクルチェックポイント阻害薬を併用する抗癌治療は腎臓に予想外の副作用をもたらす可能性も示唆される。

さらには、難治性の悪性腫瘍に対して、既存治療の効果を高めることを目的として既存治療にセルサイクルチェックポイント阻害薬を上乗せする臨床試験が米国で行われており、近い将来の本格的な臨床応用が現実的になってきている (Medchemcomm 8:295-319.

Science 352:1178-1179, Cancers (Basel) 9.)が、我々が得た知見は臨床応用にあたり非常に重要な知見となると考えられた (下図)。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

現在、米国の科学雑誌にこの研究成果は投稿中で追加実験を終えて再投稿したところである。

〔学会発表〕(計4件)

1. Proximal Tubule ATR in Humans and Mice Is a Key Regulator of the DNA Repair Response Protecting the Kidney Against Maladaptive Repair and Fibrosis After Tubular Injury  
Seiji Kishi, Craig Brooks, Takaharu Ichimura, Kenji Nishimura, Ryuji Morizane, Joseph Bonventre the ASN Kidney Week 2018 Annual Meeting, 2018年10月25日
2. Disruption of genome maintenance mechanisms in renal proximal tubular epithelial cells exacerbates kidney fibrosis  
岸 誠司, 市村 隆治, 森實 隆司, 西村 賢二, 土井 俊夫, Joseph Bonventre The 61th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology 2018年6月8日
3. Disruption of genome maintenance mechanisms in renal proximal tubular epithelial cells exacerbates human kidney fibrosis  
Seiji Kishi, Kenji Nishimura, Takaharu Ichimura, Ryuji Morizane, Takaharu Ichimura, Joseph Bonventre, Toshio Doi the ASN Kidney Week 2017 Annual Meeting 2017年11月3日
4. Genome homeostasis of renal proximal tubule cell determines the outcome of kidney disease  
Seiji Kishi, Craig Brooks, Takaharu Ichimura, Ryuji Morizane, Tomohisa Suzuki, Joseph Bonventre 2016 Asian Pacific Congress of Nephrology (APCN) 2016年9月19日
5. 近位尿細管のDNA損傷応答と腎臓病進展の関連  
岸 誠司, 市村 隆治, 森實 隆司, Joseph Bonventre 第59回日本腎臓学学会 2016年6月19日

〔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

第61回日本腎臓学会学会総会 会長賞および Best English Presentation Award 受賞

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長井 幸二郎

ローマ字氏名：(NAGAI, Kojiro)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：40542048

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。