

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09681

研究課題名(和文) インターフェロン誘導遺伝子群 (ISGs) に注目した慢性腎臓病の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of chronic renal diseases by Interferon-stimulated genes (ISGs)

研究代表者

今泉 忠淳 (Imaizumi, Tadaatsu)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：90232602

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)：慢性腎臓病の病態には、免疫系が活性化していることが知られているが、その詳細は未だ明らかではない。本研究では、培養ヒト糸球体血管内皮細胞に疑似的にウイルス感染状態にする試薬である poly IC を添加すると、血栓を作りやすくする PAI-1、炎症を促進する強力なサイトカイン IL-6、白血球の遊走を促し炎症を惹起するケモカインの CXCL1 や CX3CL1 の発現が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、慢性腎臓病の病態における免疫系の関与に関する新たな知見を見出しており、慢性腎臓病の新たな治療戦略の構築に向けた、基盤となるデータが得られたと考えている。慢性腎臓病は、慢性腎不全に進行することも少なくなく、慢性腎不全になると透析医療の適応となり、様々な心血管や運動器の合併症の発生や、QOL の低下が問題となる上、高額な医療費も必要となる。本研究の成果は、慢性腎臓病の新たな切り口による治療法の開発の基盤となる可能性があり、透析導入を少しでも遅らせ、慢性腎臓病患者の QOL 改善や、ひいては、医療費の削減につながる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：It is known that innate immunity is involved in the pathogenesis of chronic renal diseases. However, the molecular mechanisms by which induce chronic renal diseases have not been fully clarified. We found that treatment of cultured human glomerular endothelial cells with poly IC, which mimics viral infection via a receptor named Toll-like receptor 3 (TLR3), induces the expression of PAI-1 which induces thrombosis, a potent proinflammatory cytokine IL-6, and neutrophils chemoattractants CXCL1 and CX3CL1. These finding suggests that TLR3 signaling may be involved in innate immune and inflammatory reactions in chronic renal diseases.

研究分野：血管生物学

キーワード：糸球体血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) の基本病態には慢性炎症が重要な役割を果たしているが、臨床的には、感染症を契機とした悪化が知られている。微生物が宿主に感染すると、宿主細胞のパターン認識受容体が病原体の pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識し、innate immune 応答が開始され、それに引き続いて炎症反応が惹起される。この反応が、感染症を契機とした CKD の悪化の病態に関与していると考えられるが、その分子機構の詳細は明らかではない。一方、CKD では、しばしば、感染がないにもかかわらず innate immune 応答が活性化しており、sterile inflammation が発生している。この病態では、炎症によって傷害された組織から放出された内因性分子の danger-associated molecular patterns (DAMPs) がパターン認識受容体に認識され、細胞内シグナル系を活性化して再び炎症が起こるといった悪循環が存在すると考えられる。しかし、CKD における innate immune 応答や sterile inflammation の病態の分子機構の意義は未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養ヒト正常メサンギウム細胞および培養ヒト正常系球体血管内皮細胞を用いて、パターン認識受容体である Toll-like receptor (TLR) 3、TLR4 を起点として誘導される innate immune 応答やそれに引き続く炎症反応の分子機構とその制御を明らかにすることである。また、innate immune 応答は、そのマスターサイトカインとされる interferon (IFN)-beta に依存して IFN-beta が誘導する遺伝子群である IFN-stimulated genes (ISGs) の発現を誘導する経路と、IFN-beta に依存しない経路とがあるとされており、それらの経路の違いについても検討する。以上のことから、系球体の血管内皮細胞やメサンギウム細胞における innate immune 応答や sterile inflammation の分子機構の一端を明らかにし、CKD の新たな治療法・予防法開発への手立てとなる知見を積み重ねる。

3. 研究の方法

市販のヒト正常メサンギウム細胞およびヒト系球体血管内皮細胞を購入、培養し、実験に供した。培養したこれらの細胞を、人工的に合成された二本鎖 RNA で TLR3 のリガンドである polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC)、または、TLR4 のリガンドで大腸菌の菌体内毒素の成分である lipopolysaccharide (LPS) で処理した。細胞における様々な因子の mRNA およびタンパク質の発現について、quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法、western blotting 法、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法、免疫蛍光染色法などを用いて検討を行った。また、RNA 干渉法によりシグナル分子や転写因子などの介在分子のノックダウンを行い、シグナル経路の検討を行った。さらに、これらの innate immune 応答に対する、臨床現場で使用されているマクロライド系抗生物質の一つであるクラリスロマイシンや、腎炎治療に用いられている抗マラリア薬のクロロキンの作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 培養ヒト正常メサンギウムを LPS で処理すると、monocytes の遊走を引き起こす CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および neutrophils の遊走を引き起こす interleukin-8 (IL-8) の発現が誘導された。細胞をマクロライド系抗生物質の一つであるクラリスロマイシンで前処理すると、この CCL2/MCP-1 の発現は低下したが、IL-8 の発現は変化しなかった。また、クラリスロマイシンによる細胞の前処理は、LPS による p38 MAPK のリン酸化を減弱させた。以上から、クラリスロマイシンは、系球体メサンギウム細胞における TLR4-p38 MAPK-CCL2/MCP-1 pathway を抑制し、CCL2/MCP-1 が誘導する monocytes の遊走やその monocytes の遊走に基づく腎臓の炎症に対して、保護的に働くと考えられた。

(2) 培養ヒト系球体血管内皮細胞を poly IC で処理すると、好中球の遊走を引き起こすケモカインである CXCL1/Gro-alpha および、好中球の血管内皮細胞への接着を引き起こす E-selectin の発現が誘導されることを見出した。この CXCL1/Gro-alpha の発現誘導は、RNA 干渉法により TLR3、nuclear factor (NF)-kappaB p65、IFN regulatory factor (IRF) 3、IFN-beta をノックダウンすると抑制された。また、紫斑性腎炎の生検組織において、血管内皮細胞における CXCL1/Gro-alpha の発現が確認された。系球体血管内皮細胞における TLR3-NF-kappaB/IFN regulatory factor (IRF) 3-IFN-beta-CXCL1/Gro-alpha 経路の誘導は、紫斑性腎炎などの炎症に関与していることが考えられた。

(3) 培養ヒト系球体血管内皮細胞を poly IC で処理すると、血栓形成に促進的に働く分子である plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現が誘導されることを見出した。一方、血栓形成を抑制する tissue plasminogen activator の発現は変化しなかった。RNA 干渉法で TLR3 をノックダウンすることにより、この反応は TLR3 に依存していることが確かめられた。さらに、この poly IC による PAI-1 の発現誘導は、細胞をクロロキシンやヒドロキシクロロキシンで前処理することにより抑制された。TLR3 シグナリングによる PAI-1 の発現誘導は、系球体における微小血栓の形成に促進的に働き、ループス腎炎などの系球体腎炎の病態に関与しており、クロロキシンやヒドロキシクロロキシンによる腎保護作用の一部は PAI-1 の発現抑制によるものと考えられ

た。

(4) 培養ヒト糸球体血管内皮細胞を poly IC で処理すると、強力な炎症性サイトカインの一つである interleukin-6 (IL-6)、細胞質内の RNA helicase をコードする retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)/DEXD/H-box helicase 58 (DDX58) および melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)/IFN induced with helicase C domain 1 (IFIH1) の発現が誘導されることを見出した。RNA 干渉法による検討で、IFN-beta、RIG-I/DDX58 および MDA5/IFIH1 をノックダウンすると、poly IC による IL-6 の発現誘導は抑制された。また、MDA5/IFIH1 のノックダウンは RIG-I/DDX58 の発現を抑制した。この結果から、糸球体血管内皮細胞における炎症応答や、糸球体腎炎の病態に糸球体血管内皮細胞における TLR3/IFN-beta/MDA5/RIG-I/IL-6 axis が関与していると考えられた。

(5) 培養ヒト糸球体血管内皮細胞を poly IC で処理すると、単核球の接着や遊走を引き起こすケモカインの一つである CX3CL1/fractalkine の発現が誘導されることを見出した。RNA 干渉法により TLR3、NF-kappaB p65、IRF3、IFN-beta をノックダウンすると、この poly IC による CX3CL1/fractalkine の発現誘導は抑制された。また、この poly IC による CX3CL1/fractalkine の誘導は、細胞をクロロキンで前処理することにより抑制された。これらの結果は、ヒト糸球体血管内皮細胞において、TLR3 経路の活性化は NF-kappaB、IRF3、IFN-beta を経由して CX3CL1/fractalkine の発現を誘導すると考えられた。この経路による CX3CL1/fractalkine の発現は、糸球体血管内皮細胞への単核球の接着・遊走を引き起こし、ループス腎炎を含む慢性糸球体腎炎における炎症に関与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Q, Imaizumi T, Kawaguchi S, Aizawa T, Matsumiya T, Watanabe S, Tsugawa K, Yoshida H, Tsuruga K, Joh K, Kijima H, Tanaka H	4. 巻 139
2. 論文標題 Toll-like receptor 3 signaling contributes to regional neutrophil recruitment in cultured human glomerular endothelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nephron	6. 最初と最後の頁 349-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000489507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Q, Imaizumi T, Aizawa T, Hirono K, Kawaguchi S, Watanabe S, Tsugawa K, Matsumiya T, Seya K, Yoshida H, Tanaka H	4. 巻 44
2. 論文標題 Cytosolic sensors of viral RNA are involved in the production of interleukin-6 via Toll-like receptor 3 signaling in human glomerular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney Blood Pressure Res	6. 最初と最後の頁 62-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000498837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsugawa K, Imaizumi T, Watanabe S, Tsuruga K, Yoshida H, Tanaka H	4. 巻 21
2. 論文標題 Clarithromycin attenuates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 by activating Toll-like receptor 4 in human mesangial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 573-578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-016-1333-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Q, Imaizumi T, Murakami K, Tanaka H, Wu Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kijima H	4. 巻 38
2. 論文標題 DEC1 negatively regulates the expression of CXCL10 and CCL5 induced by poly IC in normal human mesangial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res	6. 最初と最後の頁 249-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.38.249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imaizumi T, Hayakari Y, Watanabe S, Aizawa T, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Kawaguchi S, Tanaka H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Cylindromatosis (CYLD), a deubiquitinase, attenuates inflammatory signaling pathway by activating Toll-like receptor 3 in human mesangial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney Blood Press Res	6. 最初と最後の頁 942-950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000485084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島田 美智子 (Shimada Michiko) (40463765)	弘前大学・医学研究科・講師 (11101)	
研究分担者	田中 完 (Tanaka Hiroshi) (50271820)	弘前大学・教育学部・教授 (11101)	