

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09691

研究課題名(和文)細胞骨格依存性シグナルの腎線維化にはたす意義

研究課題名(英文) Involvement of cytoskeleton-dependent signaling in renal fibrosis

研究代表者

坂井 宣彦 (Sakai, Norihiko)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：60377421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：線維化は臓器障害に対する過度の創傷治癒反応、すなわち細胞外基質沈着と細胞外基質産生能を有する細胞の集積を特徴とする。近年、末期腎不全の予備軍として慢性腎臓病(CKD)が注目されている。このCKDが進展し腎不全に至る過程において、各種腎疾患は腎間質線維化という共通のプロセスをとることを特徴とする。本研究では、細胞骨格依存性シグナルが、腎固有細胞の生物学的特性を調節することで腎間質線維化にはたす意義の解明を試みた。その結果、腎固有細胞でのTGF- β シグナルによる細胞骨格依存性シグナルが、筋線維芽細胞分化を誘導することで、腎間質線維化進展に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞骨格に関連するシグナルが、腎臓を構成する細胞の機能を調節することで腎不全の原因となる線維化に関与するかを試みた。その結果、腎構成細胞において、細胞骨格シグナルが、線維化に関与する細胞を活性化させ、腎線維化進展に寄与することを明らかにした。これは腎障害の原因に関わらない共通機序であり、現在増加の一途を辿っている末期腎不全患者数の抑制につながる新規治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is characterized by an excessive wound healing response to organ damage, causing extracellular matrix deposition and accumulation of fibroblasts/myofibroblasts. Recently, chronic kidney disease (CKD) has been thought as being at risk of developing end-stage renal disease. In the process of CKD progression to renal failure, various renal diseases are characterized by taking a common process which is renal interstitial fibrosis. In this study, we attempted to elucidate the significance of cytoskeleton-dependent signals for renal interstitial fibrosis by regulating the biological properties of renal resident cells. As a result, it was revealed that the cytoskeleton-dependent signal by TGF- β 1 in renal resident cells contributes to the progression of renal interstitial fibrosis by inducing myofibroblast differentiation.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎不全 線維化

1. 研究開始当初の背景

線維化は臓器障害に対する過度の創傷治癒反応、すなわち細胞外基質沈着と細胞外基質産生能を有する細胞の集積を特徴とする。しかし、これら過度の創傷治癒反応をもたらす分子生物学的基盤は完全には同定されていない。なかでも、本邦における末期腎不全による慢性透析患者は30万人を超え、増加の一途を辿っている。近年、末期腎不全の予備軍として慢性腎臓病(CKD)が注目されている。このCKDが進展し腎不全に至る過程において、各種腎疾患はその病因を問わず、糸球体硬化および間質線維化という共通のプロセスをとることを特徴とする。以上より腎間質線維化進展機序の解明は、CKD進展に対する新規治療法確立につながる治療の標的として重要である。

2. 研究の目的

これまで我々は、脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)が腹膜中皮細胞や腎尿細管上皮細胞におけるconnective tissue growth factor (CTGF)産生を制御する事で腹膜線維化、および腎間質線維化に関与することを明らかにしてきた(Sakai, et al., FASEB J 2013, Sakai, et al, Kidney Int 2017)。そのCTGF産生機序として、LPAは細胞骨格依存性シグナルであるmyocardin-related transcription factor (MRTF)-A/Bとserum response factor (SRF)を介するを見出した。そこで本研究では、細胞骨格依存性シグナルが、腎固有細胞の生物学的特性を調節することで腎間質線維化にはたす意義の解明を試みた。

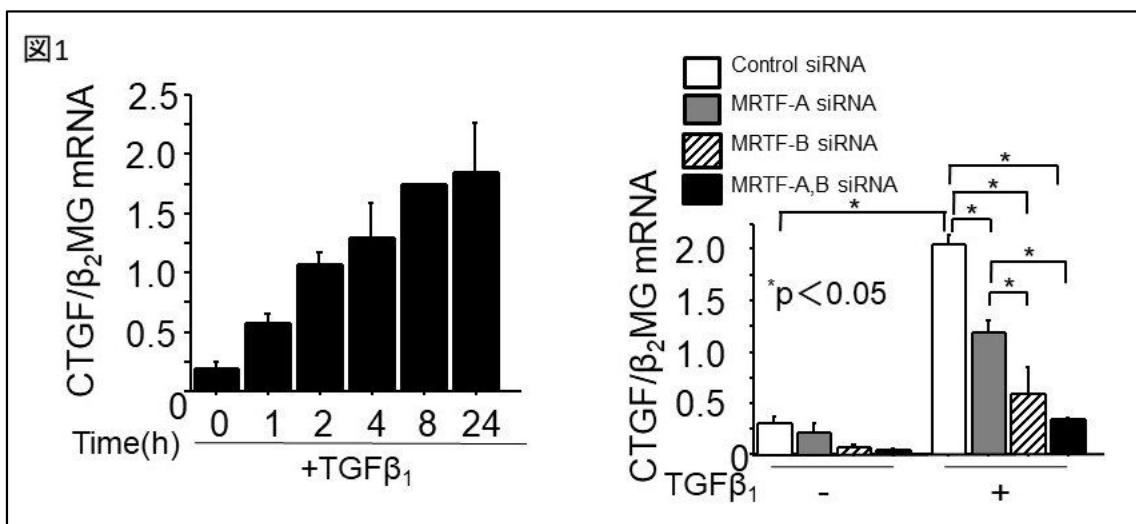
3. 研究の方法

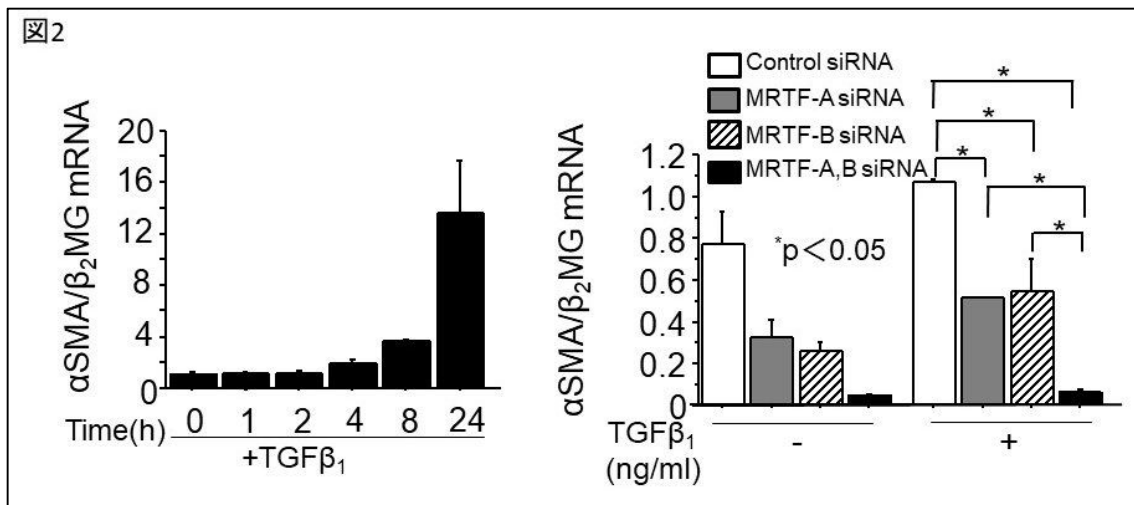
細胞骨格依存性シグナルであるMRTFの腎固有細胞にはたす意義を同定するため、腎線維芽細胞や尿細管上皮細胞を用いた。線維化惹起分子の一つであるtransforming growth factor (TGF)- β 1で刺激し、CTGFや筋線維芽細胞への分化マーカーであるsmooth muscle actin (α SMA)発現を検討した。さらに細胞骨格関連因子であるインテグリン発現を検討した。くわえて、MRTF-A欠損マウス(MRTF-A^{-/-})および対照マウス(MRTF-A^{+/+})を用いて、一側尿管結紮モデルを作成し、腎組織を採取、線維化に与える意義を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎線維芽細胞

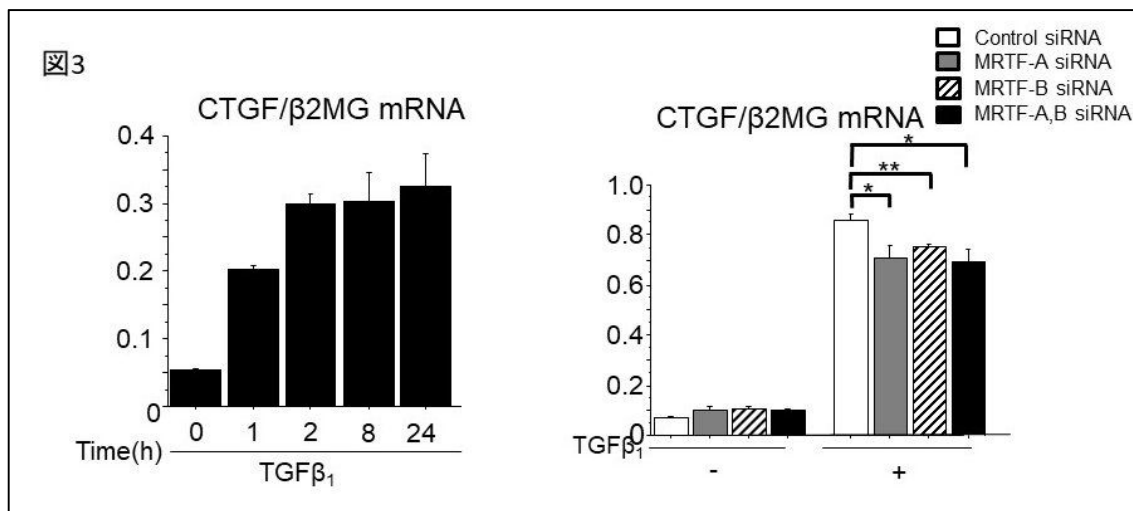
TGF- β 1刺激により、CTGFおよび α SMA発現は時間依存性に増強した。さらに、MRTFsiRNAトランスフェクションにより、各々の発現は低下した(図1-2)。また各種インテグリン発現もTGF- β 1刺激により増加し、一方、MRTFsiRNAトランスフェクションにより低下した。





(2) 近位尿管上皮細胞

TGF- β_1 刺激により、CTGF 発現は時間依存性に増強した。さらに、MRTFsiRNA トランスフェクションにより、その発現は低下した(図3)。また各種インテグリン発現も TGF- β_1 刺激により増加し、一方、MRTFsiRNA トランスフェクションにより低下した。



(3) マウスモデル：一側尿管結紮および虚血再灌流による腎ハイドロキシプロリン量および I 型プロコラーゲン発現量は MRTF-A^{-/-}群で MRTF-A^{+/+}群に比し低値となった。さらに、筋線維芽細胞を検討するため SMA 染色を行った。一側尿管結紮および虚血再灌流により腎内 SMA 陽性細胞数は増加した。しかし、腎内 SMA 陽性細胞数は MRTF-A^{-/-}群で MRTF-A^{+/+}群に比し低値となった。また腎内 CTGF および各種インテグリン発現に関しても、MRTF-A^{-/-}群で MRTF-A^{+/+}群に比し低値となった。

以上より、腎固有細胞での MRTF を介する TGF- β_1 シグナルが、CTGF やインテグリン産生、さらには筋線維芽細胞分化を誘導することで、腎間質線維化進展に寄与することを明らかにした。現在この知見を論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kamikawa Yasutaka, Sakai Norihiko, Miyake Taito, Sagara Akihiro, Shinozaki Yasuyuki, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Hara Akinori, Iwata Yasunori, Shimizu Miho, Furuichi Kengo, Imamura Ryu, Suda Takashi, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Involvement of p38MAPK in Impaired Neutrophil Bactericidal Activity of Hemodialysis Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 345 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12651	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 Hara Akinori, Furuichi Kengo, Koshino Akihiko, Yasuda Haruka, Tran Trang Thi Thu, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Shimizu Miho, Kaneko Shuichi, Nakamura Hiroyuki, Wada Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Clinical and Pathological Significance of Autoantibodies to Erythropoietin Receptor in Type 2 Diabetic Patients With CKD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 133 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2017.08.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakade Yusuke, Iwata Yasunori, Furuichi Kengo, Mita Masashi, Hamase Kenji, Konno Ryuichi, Miyake Taito, Sakai Norihiko, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Shinozaki Yasuyuki, Kaneko Shuichi, Miyamoto Tetsuya, Katane Masumi, Homma Hiroshi, Morita Hidetoshi, Suda Wataru, Hattori Masahira, Wada Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Gut microbiota-derived D-serine protects against acute kidney injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e97957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.97957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yasuda Haruka, Iwata Yasunori, Nakajima Satoshi, Furuichi Kengo, Miyake Taito, Sakai Norihiko, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Shinozaki Yasuyuki, Sagara Akihiro, Miyagawa Taro, Hara Akinori, Shimizu Miho, Kamikawa Yasutaka, Sato Kouichi, Oshima Megumi, Yoneda Nakagawa Shiori, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Erythropoietin signal protected human umbilical vein endothelial cells from high glucose induced injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 767 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13518	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 Okumura Kenichiro, Matsumoto Junichi, Iwata Yasunori, Yoshida Kotaro, Yoneda Norihide, Ogi Takahiro, Kitao Azusa, Kozaka Kazuto, Koda Wataru, Kobayashi Satoshi, Inoue Dai, Sakai Norihiko, Furuichi Kengo, Wada Takashi, Gabata Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of renal oxygen saturation using photoacoustic imaging for the early prediction of chronic renal function in a model of ischemia-induced acute kidney injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0206461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0206461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Norihiko, Nakamura Miki, Lipson Kenneth E., Miyake Taito, Kamikawa Yasutaka, Sagara Akihiro, Shinozaki Yasuyuki, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Hara Akinori, Iwata Yasunori, Shimizu Miho, Furuichi Kengo, Kaneko Shuichi, Tager Andrew M., Wada Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05624-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakai Norihiko, Bain Gretchen, Furuichi Kengo, Iwata Yasunori, Nakamura Miki, Hara Akinori, Kitajima Shinji, Sagara Akihiro, Miyake Taito, Toyama Tadashi, Sato Koichi, Nakagawa Shiori, Shimizu Miho, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 The involvement of autotaxin in renal interstitial fibrosis through regulation of fibroblast functions and induction of vascular leakage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43576-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lagares David, Santos Alba, Grasberger Paula E., Liu Fei, Probst Clemens K., Rahimi Rod A., Sakai Norihiko, Kuehl Tobias, Ryan Jeremy, Bholra Patrick, Montero Joan, Kapoor Mohit, Baron Murray, Varelas Xaralabos, Tschumperlin Daniel J., Letai Anthony, Tager Andrew M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 3765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aal3765	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 該当する

1. 著者名 Knipe Rachel S., Probst Clemens K., Lagares David, Franklin Alicia, Spinney Jillian J., Brazee Patricia L., Grasberger Paula, Zhang Linlin, Black Katharine E., Sakai Norihiko, Shea Barry S., Liao James K., Medoff Benjamin D., Tager Andrew M.	4. 巻 58
2. 論文標題 The Rho Kinase Isoforms ROCK1 and ROCK2 Each Contribute to the Development of Experimental Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 471 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2017-00750C	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 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 坂井宣彦・佐藤晃一・三宅泰人・北島信治・遠山直志・原章規・岩田恭宜・清水美保・古市賢吾・和田隆志
2. 発表標題 リゾフォスファチジン酸シグナルの腹膜中皮細胞遊走能および筋線維芽細胞分化にはたす意義
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norihiko Sakai, Koichi Sato, Taito Miyake, Akihiro Sagara, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada.
2. 発表標題 Regulation of renal fibroblast migration, proliferation and myofibroblast differentiation by LPA-LPA1 signaling via specific G proteins
3. 学会等名 米国腎臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norihiko Sakai, Taito Miyake, Koichi Sato, Akihiro Sagara, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada
2. 発表標題 Peritoneal mesothelial cell migration and myofibroblast differentiation are dependent on LPA-LPA1
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂井宣彦, 上川康貴, 三宅泰人, 相良明宏, 北島信治, 遠山忠志原章規, 岩田恭宜, 清水美保, 古市賢吾, 和田隆志
2. 発表標題 マウス腎線維化モデルにおけるリゾフォスファチジン酸シグナルの意義
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂井宣彦, 古市賢吾, 和田隆志
2. 発表標題 コレステロール塞栓症の病態からみたLDLアフェレシス療法の可能性
3. 学会等名 日本アフェレシス学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂井宣彦, 和田隆志
2. 発表標題 がん治療による薬剤性腎障害
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihiko Sakai, Takashi Wada
2. 発表標題 The involvement of cytoskeleton-dependent signaling pathway mediated by biological substances in the pathogenesis of organ fibrosis.
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihiro Sakai, Takashi Wada
2. 発表標題 Lipoprotein apheresis for kidney disease in adult in Japan.
3. 学会等名 国際アフエレンス学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihiro Sakai, Koichi Sato, Hisayuki Ogura, Taro Miyagawa, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada
2. 発表標題 Regulation of renal fibroblast function by MRTF-focal adhesion in response to TGF- β 1
3. 学会等名 米国腎臓学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腎障害の予防又は治療用の医薬組成物	発明者 和田隆志、古市賢吾、坂井宣彦ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-109731	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
連携研究者	和田 隆志 (Wada Takashi) (40334784)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	