

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09701

研究課題名(和文)急性腎障害におけるアルギナーゼ2の役割とその制御機構の解明

研究課題名(英文)The role and regulatory mechanism of arginase 2 for acute kidney injury

研究代表者

鳥巢 久美子 (TORISU, KUMIKO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20448434

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)：アルギナーゼ2(Arg2)はL-アルギニンを分解する酵素だが、発現が最も高い腎臓での重要性はわかっていない。Arg2は腎臓の尿細管に強く発現し虚血再灌流後に発現が増強した。尿細管細胞株での虚血再酸素化でArg2の発現が増加し細胞質内で斑状に局在していた。Arg2ノックダウン尿細管細胞では虚血再酸素化による活性酸素やニトロチロシンの産生が抑制された。これに一致してArg2ノックアウトマウスでは腎虚血再灌流後の腎障害や尿細管壊死が有意に抑制され、尿細管のニトロチロシンの蓄積やアポトーシスが抑制された。またアルギナーゼ阻害薬nor-NOHAを投与すると、腎虚血再灌流障害は軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓の虚血再灌流障害は急性腎障害の主たる原因である。腎臓が虚血に曝されると活性酸素種や活性窒素種が過剰に産生され腎障害を増悪させる。アルギナーゼ2は一酸化窒素合成酵素と競合してL-アルギニンを分解し、活性窒素種の産生を制御している。我々の研究結果から、アルギナーゼ2は腎臓で発現が高く、腎臓の虚血再灌流障害によって発現が亢進し、アルギナーゼ2を抑制することで虚血再灌流障害を軽減することができた。アルギナーゼ2は虚血再灌流障害による急性腎障害において活性窒素種の制御に中心的な役割を担っていることが示唆された。よってアルギナーゼ2に特異的な阻害剤があれば腎臓の虚血再灌流障害の治療として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Arginase 2 (Arg2) is an enzyme which degrades L-arginine. Arg2 is highly expressed in the kidney, but its importance is unknown. ARG2 was predominantly expressed in renal tubules of the cortex region, which was increased after ischemia-reperfusion injury. In HK-2 cells, ARG2 was expressed in punctate form in the cytoplasm and upregulated after hypoxia/reoxygenation. ARG2 knockdown reduced the level of reactive oxygen species and 3-nitrotyrosine after hypoxia/reoxygenation injury compared with control siRNA. Consistent with these results, in Arg2 knockout mice, abnormal kidney function and the increased acute tubular necrosis score induced by ischemia/reperfusion injury was significantly reduced. Additionally, an accumulation of 3-nitrotyrosine and apoptosis of renal tubule cells were attenuated in Arg2 knockout mice. Inhibition of arginase by N^ω-hydroxy-nor-L-arginine alleviated kidney ischemia/reperfusion injury like the results found in Arg2 knockout mice.

研究分野：活性酸素ストレスの制御

キーワード：アルギナーゼ アルギニン ニトロ化ストレス 急性腎障害 虚血再灌流障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (AKI) は、頻度の高い疾患であり、医療費の増大、および高い死亡率と関連する世界の主要な健康問題の一つである[1, 2]。さらに AKI は可逆性の疾患と見なされていたが、高頻度にその後慢性腎臓病 (CKD) に移行する。虚血再灌流障害は AKI の主要な原因の一つであり、腎移植、腎部分切除、ショック、心臓手術、血管手術を含む多くの臨床現場で遭遇する。しかし、I/R 傷害による AKI に対する特定の治療法は現時点ではない[3, 4]。

アルギナーゼは、L-アルギニンを尿素と L-オルニチンに加水分解する。哺乳類ではアルギナーゼ 1 (ARG1、細胞質型) とアルギナーゼ 2 (ARG2、ミトコンドリア型) の 2 つのアルギナーゼがあり、ARG1 は主に肝臓、ARG2 は腎臓、主に髄質外層に発現している[5]。ARG2 の機能の一つは一酸化窒素 (NO) の調節であり、これは、NO 合成酵素 (NOS) と共通の基質である L-アルギニンを競合することによって行われる[6]。アルギナーゼの発現と活性の亢進は、NOS が利用できる L-アルギニンの減少につながる。その結果、NO の代わりにスーパーオキシドが産生される NOS アンカップリングが起こり、NO とスーパーオキシドが反応してペルオキシ亜硝酸塩が形成される[7]。ペルオキシ亜硝酸塩は蛋白や DNA をニトロ化し、ネクローシスやアポトーシスを引き起こす[8]。しかし虚血再灌流障害による AKI における ARG2 と NOS アンカップリングの生理的役割についてはこれまで十分にわかっていない。

2. 研究の目的

腎臓の虚血再灌流においてアルギナーゼ阻害が腎障害を軽減させると仮説をたてた。腎臓で発現が高いアルギナーゼ 2 に着目し、その発現変化、虚血再灌流障害における役割、アルギナーゼ阻害薬による腎虚血再灌流障害の治療効果を調べ、アルギナーゼ阻害が腎虚血再灌流障害の治療戦略になる可能性を探る。

3. 研究の方法

(a) C57BL6/J マウスの腎虚血再灌流障害時の腎臓での ARG2 発現変化、局在の解析

8-10 週令のオスマウスを用い、両側の腎動脈をクリップで 28 分間クランプした後開放した。再灌流後 24 時間もしくは 2 週間で解剖を行った。腎臓の虚血再灌流障害時の Arg2 mRNA を realtime PCR、ARG2 タンパクの変化をウエスタンブロッティングで調べた。腎臓内の ARG2 の局在は免疫染色を行い共焦点顕微鏡で観察をした。

(b) ヒト尿細管細胞株 (HK-2) での ARG2 の発現変化、局在の解析

HK-2 細胞を用いて低酸素再酸素化に暴露した。24 時間の血清飢餓の後、細胞を 1%酸素、94%窒素、5%二酸化炭素の低酸素条件で HBSS 培地にして 6 時間培養した。その後、21%酸素、完全培地に戻し再酸素化とした。ミトコンドリア傷害を Mitotracker 染色、ニトロ化ストレスについては 3-ニトロチロシンの免疫染色、ウエスタンブロッティングを行った。低酸素再酸素化における ARG2 タンパクの変化はウエスタンブロットと免疫染色を行った。ARG2 のミトコンドリア局在を調べるため ARG と Mitotracker 染色を行った。再酸素化における独特の ARG2 の局在形態を調べるため Bax との 2 重染色も行った。

(c) ARG2 ノックダウンの低酸素再酸素化への影響

Arg2 siRNA を用いて HK-2 細胞において Arg2 をノックダウンし、ミトコンドリア膜電位、3-ニトロチロシン染色、スーパーオキシドの定量を行った。

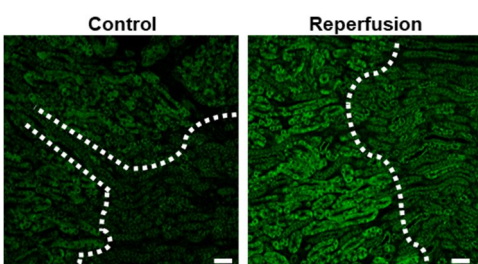
(d) Arg2 ノックアウトマウスの腎虚血再灌流障害

Arg2 ノックアウトマウスとコントロールとなる野生型マウスに腎虚血再灌流障害を起こし、血清 BUN/Cr、腎組織障害スコア、血圧、3-ニトロチロシン、アポトーシスを調べた。偽手術群はクリップをかける以外は同じ手順を行った。

(e) Nor-NOHA の腎虚血再灌流障害に対する保護効果の証明

マウスの腎虚血再灌流実験において、クランプを解放した直後にアルギナーゼ阻害薬である nor-NOHA (50 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。血清 BUN/Cr、腎組織障害スコア、血圧を調べた。

4. 研究成果



1. アルギナーゼ 2 はマウス腎臓の虚血再灌流障害後に発現が増加する

マウスに両側の腎臓に虚血再灌流障害を起こした 24 時間後に非手術マウスと比較して Arg2 mRNA が 2.5 倍に増加した。ARG2 蛋白量も虚血によって非手術マウスの半分程度に減少した後、再灌流後に非手術マウスの 2 倍の量に有意に増加した。ARG2 免疫染色を行うと、ARG2 は腎臓の皮質の近位尿細管に発現しており、虚血再灌流により尿細管の発現が増加し(図 1) 血管や系

球体、マクロファージでの ARG2 発現が増加することはなかった。

図 1 虚血再灌流後の腎臓の ARG2 染色

左、非手術マウス、右、虚血再灌流マウス、破線は皮髄境界を示す。スケールバー 50 μm

2. HK-2 細胞における低酸素再酸素化障害はアルギナーゼ 2 を誘導する

HK-2 細胞を低酸素再酸素化に曝すと HK-2 細胞でも再酸素化 48 時間後で ARG2 の発現が亢進した。血管内皮細胞ではアルギナーゼ活性が増強すると eNOS アンカップリングが起きると報告されている [5]。尿細管細胞の主要な NOS は iNOS であったため、iNOS アンカップリングの代表的な現象である iNOS 二量体の崩壊をウエスタンブロットで調べた。再酸素化により iNOS 二量体が減少し単量体が増加することはなかった。よって低酸素再酸素化の条件での iNOS アンカップリングの原因はアルギナーゼ発現増加によるアルギニンの枯渇と考えた。免疫染色では ARG2 は細胞質で斑状に存在し、再酸素化で増加した。一部の ARG2 はミトコンドリアに局在するが、再酸素化で共同在が増強した (図 2)。ARG2 の斑状の発現パターンを超解像度顕微鏡で観察すると環状の構造をとることがわかった。ミトコンドリアが障害を受けたときに環状構造をとる蛋白として Bax があるため、ARG2 と Bax の 2 重染色を行うと、両者は一部共同在を示した。

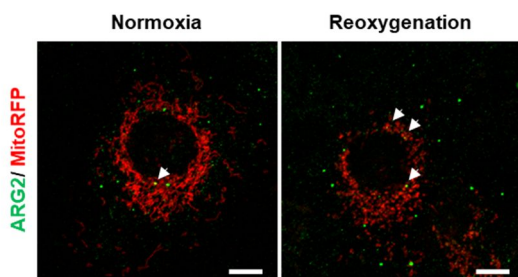


図 2 ARG2 とミトコンドリアの蛍光免疫染色

左 通常酸素、右 低酸素再酸素化、緑:ARG2、赤:MitoRFP、矢印はミトコンドリアに局在し斑状の ARG2、スケールバー 10 μm

3. アルギナーゼ 2 の阻害は低酸素・再酸素化障害によるニトロ化ストレスを軽減する

Arg2 ノックダウン細胞では低酸素再酸素化障害によるミトコンドリア膜電位低下が軽減する傾向を認め、ニトロチロシンは有意に減少した (図 3)。尿細管細胞における iNOS とアルギナーゼのバランスをより明確に調べるため、アルギニン不含培地でも同様の実験を行ったが、Arg2 ノックダウン細胞においてニトロチロシンやスーパーオキシドの減少がみられた。Arg2 ノックダウン細胞は L-アルギニン枯渇によるニトロ化ストレスが軽減したと想定されたため、培地にアルギニンを補充し、低酸素再酸素化障害を軽減できるかを調べた。予想に反して 1500 μM と十分なアルギニン補充を行っても、コントロール細胞のニトロチロシンの蛍光強度は Arg2 ノックダウン細胞のレベルまで改善しなかった。

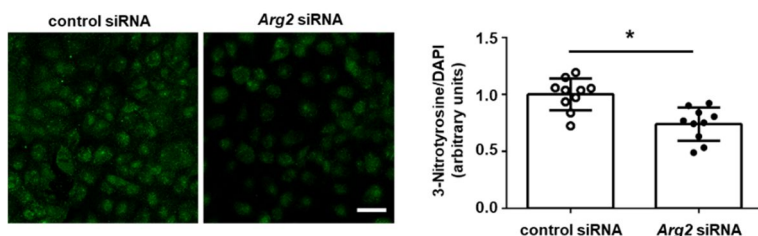
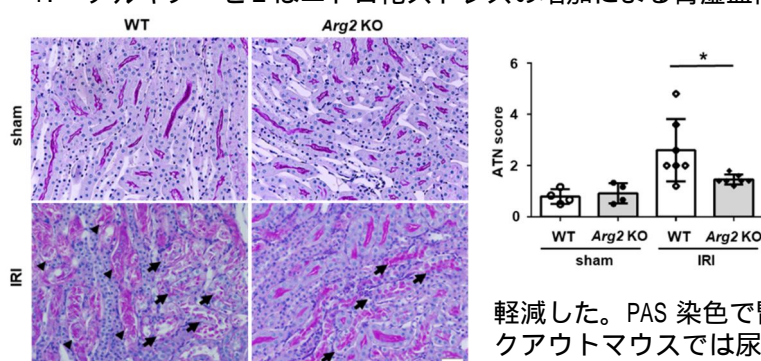


図 3 低酸素再酸素化後の HK-2 のニトロチロシン染色

左 コントロール siRNA、右 Arg2 siRNA、スケールバー 50 μm 、グラフは蛍光強度の定量結果

4. アルギナーゼ 2 はニトロ化ストレスの増加による腎虚血再灌流障害を引き起こす



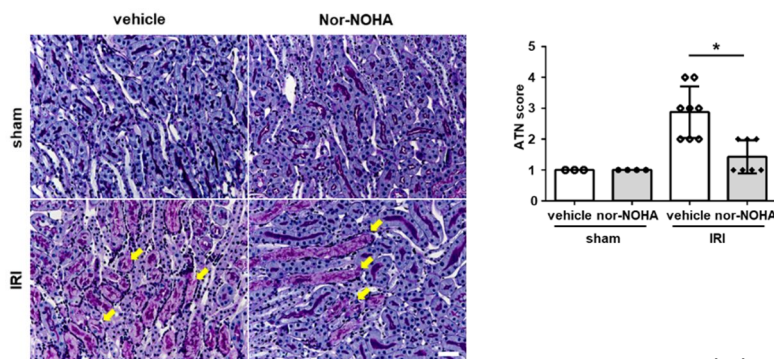
Arg2 ノックアウトマウスを使用して腎虚血再灌流障害モデルを作成した。野生型マウスでは虚血再灌流障害後に血清尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン (Cr) の濃度上昇に反映される腎機能障害を認めたが、Arg2 ノックアウトマウスでは血清 BUN および Cr の増加は有意に

軽減した。PAS 染色で腎組織の解析を行うと、Arg2 ノックアウトマウスでは尿細管壊死が明らかに減少し、急性尿細管壊死スコアは野生型マウスの約半分であった (図 4)。これに一致して Arg2 ノックアウトマウスではニトロチロシンが減少し、尿細管のアポトーシスも減少していた。

図 4 虚血再灌流後の腎臓の PAS 染色

矢印は尿細管障害、矢頭は尿細管壊死を示す。スケールバー 20 μm 、グラフは尿細管壊死スコアの定量結果。

5. Nor-NOHA の投与は腎虚血再灌流障害の治療に有効である



我々はアルギナーゼ阻害薬である nor-NOHA の投与が腎虚血再灌流障害に有用化を解析した。血清 BUN/Cr は nor-NOHA 投与群で対照群の 1/3 の値であった。また急性尿細管壊死スコアも野生型に比べて有意に減少した。

図 5 nor-NOHA を投与した虚血再灌流後の腎組織腎組織の PAS 染色を示す。矢印は傷害尿細管を示す。スケールバー 50 μm。グラフは尿細管壊死スコアの定量結果。

1. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Acute kidney injury: prevention, detection and management up to the point of renal replacement therapy. Clinical Guideline, CG169. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg169>.
2. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet*. 2013;**382**:170–179.
3. Agarwal A, Dong Z, Harris R, et al. Cellular and molecular mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016;**27**:1288–1299.
4. Molitoris BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest*. 2014;**124**:2355–2363.
5. Levillain O, Balvay S, Peyrol S. Localization and differential expression of arginase II in the kidney of male and female mice. *Eur J Physiol*. 2005;**449**:491–503.
6. Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;**13**:161–167.
7. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, et al. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol Rev*. 2018;**98**:641–665.
8. Virág L, Szabó É, Gergely P, et al. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 2003;**140–141**:113–124.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hara M, Torisu K, Tomita K, Kawai Y, Tsuruya K, Nakano T, Kitazono T	4. 巻 -
2. 論文標題 Arginase 2 is a mediator of ischemia-reperfusion injury in the kidney through regulation of nitrosative stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hara M, Torisu K, Kawai Y, Nakano, T, Tsuruya K, Kitazono T
2. 発表標題 Arginase 2 mediates ischemia-reperfusion injury in the kidney through regulation of nitrosative stress
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原雅俊、鳥巢久美子、川井康弘、鶴屋和彦、中野敏昭、北園孝成
2. 発表標題 アルギナーゼ2はニトロ化ストレスを介した腎虚血再灌流障害を誘導する
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原雅俊、鳥巢久美子、川井康弘、四枝龍佑、長谷川祥子、鶴屋和彦、北園孝成
2. 発表標題 尿細管のアルギナーゼ2発現は虚血再灌流で増加する
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原雅俊、鳥巢久美子、富田佳吾、川井康弘、鶴屋和彦、中野敏明、北園孝成
2. 発表標題 アルギナーゼ2は尿細管でのニトロ化ストレスを介した腎虚血再灌流障害を誘導する
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院医学研究院 病態機能内科学 腎臓研究室 http://www.kcu.med.kyushu-u.ac.jp/

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	鶴屋 和彦 (Tsuruya Kazuhiko) (20372740)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	升谷 耕介 (Masutani Kosuke) (30419593)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	