

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10155

研究課題名(和文) 抗酸化防御機構の腎局所における活性化による腎障害軽減の検討

研究課題名(英文) Kidney specific local activation of Nrf2 and its effects on renal injury in mice

研究代表者

新村 文男 (NIIMURA, Fumio)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30282750

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)：Cre-loxPシステムを利用して腎臓の近位尿細管特異的にKeap1遺伝子を不活化し、抗酸化防御機構の要として働いているNrf2が腎尿細管特異的に活性化した遺伝子改変マウスを作製した。それを用いてシクロスポリンによる腎障害と尿管結紮による腎障害の軽減効果があるかどうかを検討した。今回の検討では、シクロスポリン投与による腎障害の軽減を証明するには至らなかったが、尿管結紮モデルによる腎障害の軽減効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸化防御機構の破綻は腎障害の増悪につながるものの、抗酸化防御機構の活性化が腎障害の軽減につながるかどうかについては未解決な部分が多い。本研究では腎障害モデルによっては必ずしも明確な改善を見出せず、抗酸化防御機構活性化は治療戦略としての合理性はあるが、それが組織障害軽減に寄与するメカニズムは必ずしも単純ではないと考えられた。今後、抗酸化防御機構の活性化をより効果的に腎障害の軽減につなげるためには、他に何らかの工夫が必要であることを示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：We generated a mouse strain in which Keap1 gene is inactivated only in renal straight proximal tubules by conditional targeting using Cre-loxP system, thus resulting in kidney specific local activation of Nrf2 which plays a central role for antioxidant protection mechanisms. Renal injury was introduced in this mouse strain to see whether renal injury was ameliorated by the kidney specific local Nrf2 activation. We were unable to demonstrate the alleviation of cyclosporine A-induced renal damage in this mouse strain. However, the renal damage induced by unilateral ureteral obstruction was alleviated in this mouse strain as shown by renal histology and renal damage-related gene expressions.

研究分野：小児科学

キーワード：腎障害 抗酸化防御機構 酸化ストレス Keap1 Nrf2 シクロスポリン 尿管結紮モデル

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) の病態としては、その原因として敗血症、薬剤、心不全などがあるが、いずれにおいても腎髄質の血流低下をきたすことが知られており、腎組織、とくに腎髄質外層における低酸素状態と酸化ストレスが病態形成に深く関与している。一方、好気性生物である生体においては常に酸化ストレスにさらされており、酸化ストレスを軽減するための抗酸化防御機構が備わっている。

生体における抗酸化防御機構として、Keap1-Nrf2 系が中心的な役割を果たしている。Nrf2 はヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) などの第 2 相異物代謝酵素群の発現を促進する転写因子であり、抗酸化剤応答配列への結合を介して発現を調節する。Keap1 は Nrf2 と細胞質において結合し、Nrf2 の核内移行を阻害するとともに、その分解を促進している。異物・毒物の進入により Keap1 のシステイン残基が修飾される結果、Nrf2 は Keap1 から離れて核内へ移行し、抗酸化防御作用のある種々の遺伝子の転写を促進する。

以前、我々は Nrf2 不活化マウス、および Nrf2 が恒常的に活性化されている Keap1 ノックダウンマウスを用いて、シクロスポリンによる腎障害の検討を行い、Nrf2 がシクロスポリンによる腎障害の主要なメディエーターになっていることを確認した。これらのマウスでは、全身の細胞において Nrf2 の不活化、あるいは活性化が生じており、腎臓局所における Nrf2 の不活化 / 活性化の影響のみを反映しているとはいえなかった。今回の研究では、腎髄質外層局所における Nrf2 の活性化が腎障害にどのような影響を及ぼすかについての検討である。

2. 研究の目的

KAP-Cre マウスは腎臓の近位直尿細管細胞において Cre を発現するトランスジェニックマウスであり、floxed Keap1 アレルを有するマウスとの交配により、近位直尿細管特異的に Keap1 遺伝子を不活化し、その結果として Nrf2 が活性化された状態となる。本研究では、このマウスを用いて全身における抗酸化防御機構の活性化ではなく、腎尿細管局所における抗酸化防御機構を遺伝子操作により活性化することにより各種腎障害の軽減が達成可能であるかどうかを明らかにすることを目的とする。すなわち、Keap1-Nrf2 系の腎臓局所における役割を *in vivo* において検討することにある。

3. 研究の方法

(1) 後述する近位直尿細管細胞特異的に Keap1 が不活化された (すなわち Nrf2 が活性化された) マウスを作製し解析に用いた。シクロスポリン (CyA) の投与を行い、腎組織の解析ならびに Nrf2 の下流にある遺伝子の発現、腎障害に関連した遺伝子の発現を解析した。さらに、尿管結紮による腎障害について検討を行った。CyA の投与は 50mg/kg/dose (腹腔内投与) を 3 週間投与の長期の系と、1 週間投与の短期の系で検討した。尿管結紮モデルは片側尿管結紮を腎下極レベルで実施して、1 週間後に採材した。遺伝子発現はリアルタイム定量 PCR 法にて評価し、18SrRNA を内在性コントロールとして比較定量を行った。

(2) 近位直尿細管細胞特異的に Keap1 遺伝子を不活化したマウスの作製

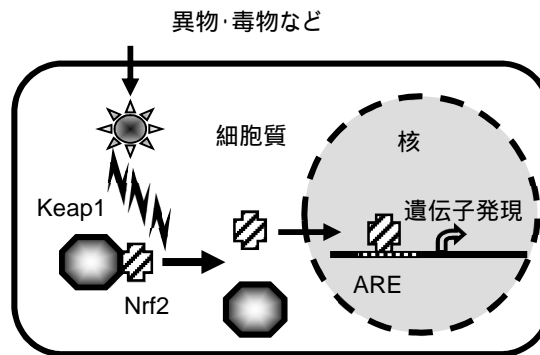
KAP-Cre マウスは、KAP (kidney androgen regulated protein) 遺伝子のプロモーターの下流に Cre 酵素の遺伝子を組み込んだアレルを有するトランスジェニックマウスである。雄の KAP-Cre マウスにおいては、Cre 酵素は腎臓の近位尿細管直部にのみ発現される。一方、Keap1 (flox/WT) の遺伝子型を有するマウスは Cre 酵素が作用することにより Keap1 遺伝子において欠失が生じ、機能が失われる。以上の KAP-Cre マウスと Keap1 (flox/WT) マウスを交配し、[Keap1 (flox/WT), KAP-Cre(+)] マウスを得、さらにこのマウスと Keap1 (flox/WT) マウスとを交配することにより、[Keap1 (flox/flox), KAP-Cre(+)], [Keap1 (flox/flox), KAP-Cre(-)], [Keap1 (flox/WT), KAP-Cre(+)], [Keap1 (flox/WT), KAP-Cre(-)], [Keap1 (WT/WT), KAP-Cre(+)], [Keap1 (WT/WT), KAP-Cre(-)] の 6 種類の遺伝子型を有するマウスを得た。このうち、[Keap1 (flox/flox), KAP-Cre(+)] マウスの雄 (以下 Ho/+ マウス) は近位直尿細管細胞においてのみ Keap1 が不活化 (すなわち Nrf2 が活性化) されているマウスとして解析対象とした。対照群としては、[Keap1 (WT/WT), KAP-Cre(-)] のマウス (WT/- マウス) が最も理想的であるが、交配により得られたマウスの数により、[Keap1 (flox/flox), KAP-Cre(-)] の雄マウス (以下 Ho/- マウス) および [Keap1 (flox/WT), KAP-Cre(-)] の雄マウス (以下 He/- マウス) を用いた。

4. 研究成果

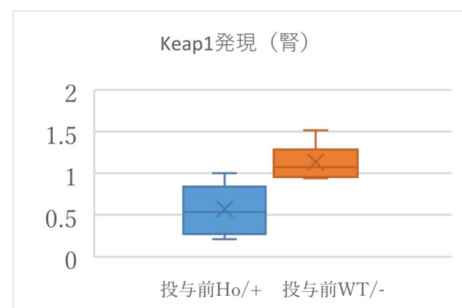
(1) CyA 長期投与系での検討

Keap1 遺伝子の腎での発現

Ho/+ においては、WT/- よりも腎での Keap1 発現は半



ARE: 抗酸化剤応答配列



分程度に低下しており、有意差を認めた ($p=0.00028$)。この低下が尿細管での発現低下を反映しているのか、あるいはすべての細胞における発現低下であるのかを区別するには免疫組織化学的なアプローチが必要となるが、実施が困難であり厳密な区別をすることができなかった。少なくとも Ho/+マウスの腎臓において Keap1 遺伝子がある程度不活化されていることが示された。

H0-1 遺伝子の腎での発現

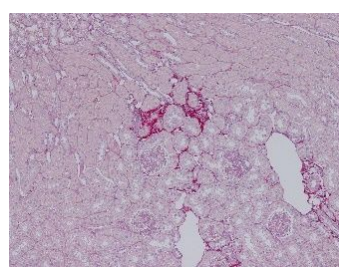
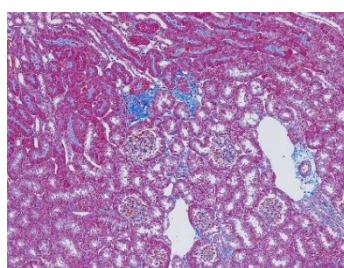
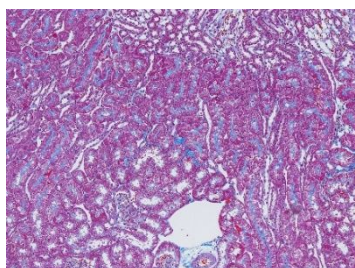
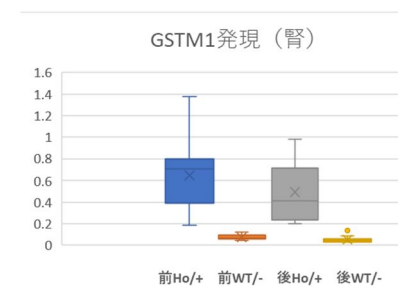
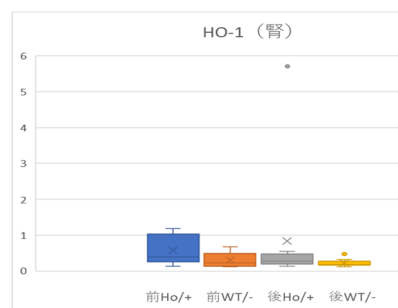
H0-1 は Nrf2 の下流にある抗酸化防御に関連した遺伝子のひとつである。CyA 投与後に H0-1 の発現増強が期待されたが、今回の検討では明らかではなかった。その背景要因の特定に至らなかった。ただし、Keap1 が近位尿細管で不活化されている Ho/+マウスにおいて H0-1 発現がやや増強している傾向は認められ、Keap1 不活化により Nrf2 の分解が低下して Nrf2 が潤沢になった結果として理解できる現象であったが有意差は認めなかった ($p=0.062$)。

GSTM1 遺伝子の腎での発現

GSTM1 も Nrf2 の下流にある抗酸化防御遺伝子のひとつである。H0-1 同様、CyA 投与後に GSTM1 の発現増強がみられなかった。ただし、Ho/+群において発現が増強しており (およそ 8~9 倍、 $p<0.01$)、Ho/+群における Keap1 不活化により Nrf2 分解が低下して、Nrf2 が潤沢に存在することを反映した現象であると理解される。

腎障害の評価 (腎組織による)

PAS 染色、および Masson Trichrome 染色にて評価した。今回の検討においては、CyA 投与後のマウスにおいて認められた腎皮質の線維化は一部の尿細管周囲において認められたものの比較的軽微であり、WT/-群と Ho/+群とでの顕著な差異は認めなかった。PAS 染色(コラーゲン線維が青く染まる)とシリウスレッド染色(コラーゲン線維が赤く染まる)を示す。Ho/+マウスにおいて、抗酸化防御機構が十分に作動することで、腎障害の軽減が期待されたが、腎組織学的にそれを示すことはできなかった。

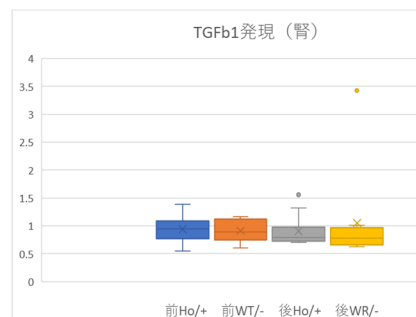
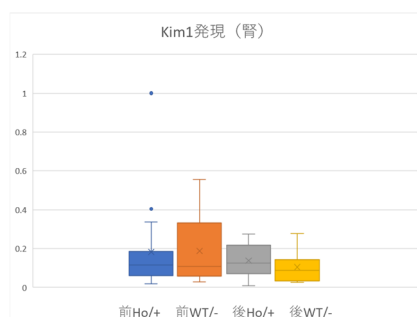


投与後 WT/-マウス (PAS 染色) 投与後 Ho/+マウス (PAS 染色) 同左 (シリウスレッド染色)

腎障害の評価 (遺伝子発現による)

腎障害を評価する目的で、腎障害を反映して発現増強する遺伝子 (Kim1, TGFb1, RANTES, MCP1) について腎臓での発現を検討した。

Kim1 遺伝子と TGFb1 遺伝子の発現を下図に示す。CyA の投与による発現増強は明らかではなかった。また、遺伝子型による差異を認めず、Ho/+マウスにおける腎障害の軽減効果は認めないという結果であった。



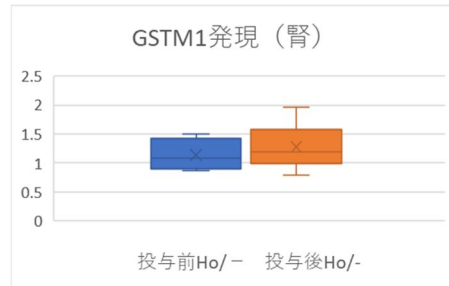
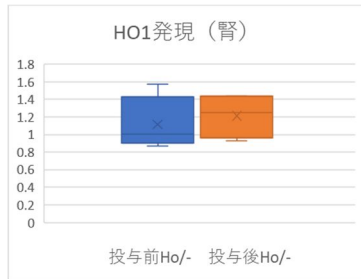
RANTES, MCP1 といった白血球走化性因子の発現についても Kim1, TGFb1 の発現と同様、CyA 投与による発現増強がみられず、また、Ho/+マウスにおける軽減効果も認めなかった。

(2) CyA 短期投与系での検討

CyA の長期投与 (4 週間投与) において H0-1 や GSTM1 の発現増強がみられなかったため、その再現性を確認する一環として、短期投与 (1 週間投与) における発現を検討した。投与群と非投与群に分けて、投与による影響を検討した。

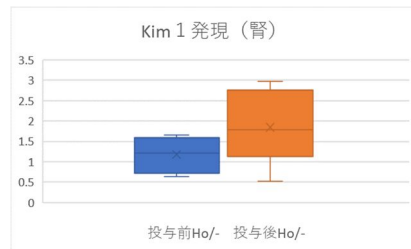
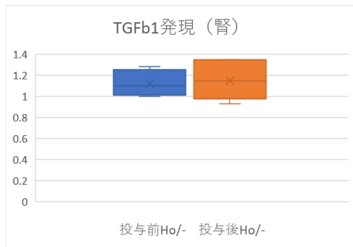
Nrf2 の下流にある抗酸化防御に関連した遺伝子の腎での発現

交配により得られるマウスを遺伝子型ごとに十分得ることができず、対照群として Ho/-マウスを用いた。CyA 投与による影響を Ho/-マウスにおいて検討した結果を次ページの図に示す。この検討においても長期投与の検討結果と同様、CyA の短期投与により HO1、GSTM1 の発現増強は明らかではなかった。我々が以前に行った検討とは異なる結果であり、その背景要因は不明であった。



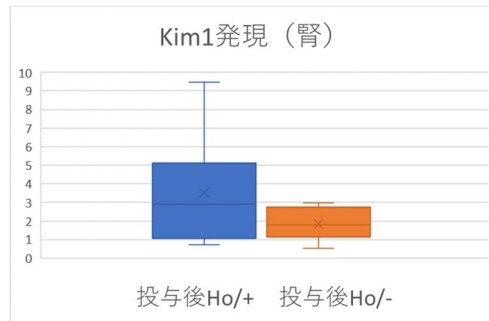
腎障害に関連した遺伝子の腎での発現 (CyA 投与による影響の検討)

腎障害に関連した TGFb1 遺伝子発現については、投与前後での発現に差異を認めなかった。同様に腎障害を反映する Kim1 の発現については、CyA 投与によりやや発現が増強する傾向を認めたが有意差はなかった (p=0.22)。



腎障害に関連した遺伝子の腎での発現 (遺伝子型の違いによる影響の検討)

CyA 短期投与後の腎障害の程度について、Kim1 を指標に Ho/+と Ho/-群とで比較すると、Ho/+群において腎障害の軽減が期待されたが、有意差は無いものの、むしろ Ho/+群においてやや発現が増強していた。Ho/+マウスにおける腎障害の軽減効果が期待されていたが、そういった効果を確認することができなかったことになる。



(3) 片側尿管結紮モデル (UUO) での検討

CyA 投与による腎障害以外の腎障害を検討するべく、片側尿管結紮モデルによる腎障害を検討した。交配により得られた WT/- (野生型マウス) の数が予想以上に少なく、やむなく対照群として He/- (floxed allele をヘテロ接合体で有し、KAP-Cre を持たないマウス) を選び、検討した。また、遺伝子発現に関しては結紮測と対側 (非結紮測) との比 (結紮 / 対側比 = 結紮による影響を反映する指標) を検討した。

Keap1 遺伝子の腎での発現

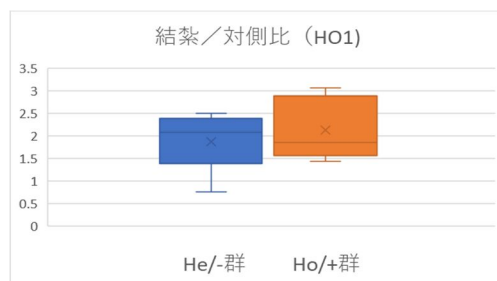
結紮 / 対側比は、He/-群で 1.20 ± 0.33 (n=10)、Ho/+群で 1.11 ± 0.23 (n=7) で、両群に差はなかった。

HO-1 遺伝子の腎での発現

Ho/+群では Nrf2 の分解が抑制され、Nrf2 の下流にある抗酸化防御に寄与する遺伝子の発現増強が期待される。そういった遺伝子のひとつである HO-1 については、結紮 / 対側比で Ho/+群 (2.13 ± 0.41) において対照群 (1.87 ± 0.35) よりやや増強の度合いが強い傾向を認めたが、有意差はなかった。

GSTM1 遺伝子の腎での発現

抗酸化防御遺伝子である GSTM1 の発現についても検討した。GSTM1 発現の結紮 / 対側比は Ho/+群で



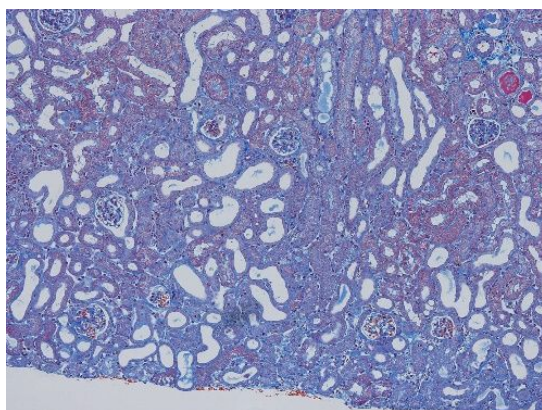
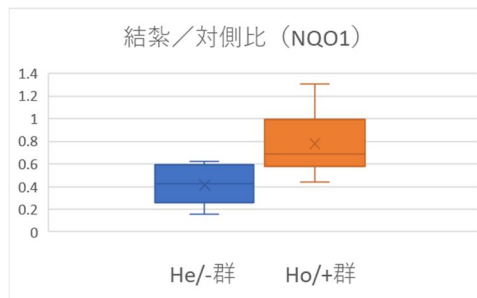
0.86 ± 0.46、対照群で 1.09 ± 0.52 と、両群共に結紮による発現増強を認めず、また両群間の差異を認めなかった。

NQO1 遺伝子の腎での発現

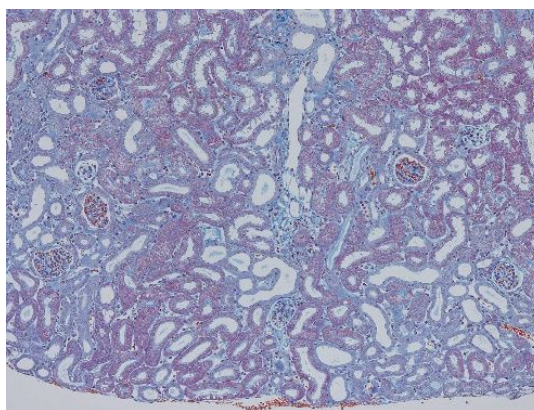
同じく抗酸化防御に関与する遺伝子として NQO1 の発現を検討した。NQO1 については、結紮側での発現はむしろ抑制される傾向（すなわち結紮 / 対側比が 1 以下）を認めたが、Ho/+群ではその抑制が有意に軽減されていた（Ho/+群 0.78 ± 0.29、対照群 0.42 ± 0.16、p=0.015）。Ho/+マウスにおける腎障害軽減に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

腎障害の評価（腎組織での検討）

PAS 染色、および Masson trichrome 染色にて評価した。He/-群では間質の線維化が顕著であり、皮質の近位尿細管の障害も目立つが、Ho/+群では間質の線維化はあるものの比較的軽度であり、近位尿細管の形態も管腔がより保たれている傾向を認めた（下図：Masson trichrome 染色）。



He/-マウス（対照群）



Ho/+マウス

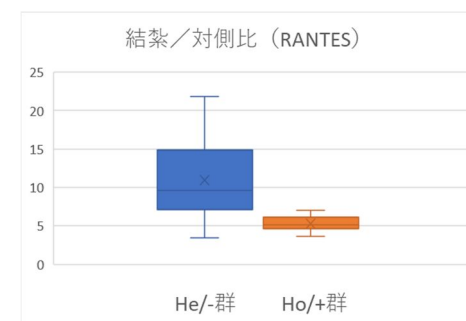
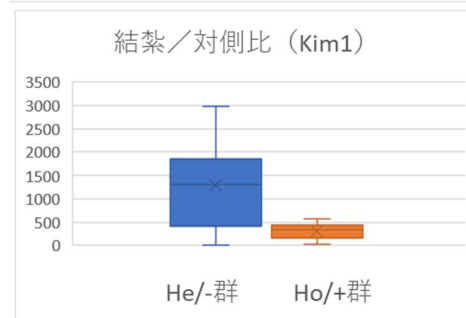
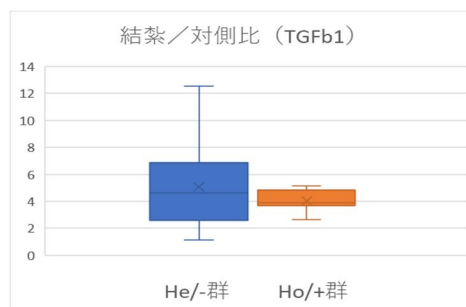
腎障害の評価（腎での遺伝子発現による検討）

腎障害に関連する遺伝子として、TGfb1、Kim1、RANTES の発現を検討した。

TGfb1 の発現は尿管結紮により 4~5 倍の増強を認めた（結紮 / 対側比で評価）。遺伝子型による差異としては、Ho/+群で 4.04 ± 0.81、対照群で 5.06 ± 3.37 と、Ho/+群でやや軽減する傾向はあったが有意差は認めなかった。

Kim1 の発現は尿管結紮により数百倍以上の発現増強を認めた（結紮 / 対側比）。対照群で 1431 ± 929 であったが、Ho/+群では 304 ± 188 と対照群に比較して有意に軽減していた（p=0.0197）。Ho/+群における腎障害軽減効果としてとらえてよい結果であると考えた。

T 細胞や単球の遊走を促進する RANTES の発現についても検討した。尿管結紮により RANTES 発現は 5~10 倍の増強を認めたが、Ho/+群においてその増強は有意に軽減されていた（対照群 10.95 ± 5.74、Ho/+群 5.28 ± 1.10、p=0.0467, unpaired Mann-Whitney U test）。



以上より、UUO モデルにおいては、近位尿細管特異的な Keap1 遺伝子の不活化が腎障害を軽減していることを、腎組織および腎障害に関連した遺伝子発現により確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----