

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16092

研究課題名(和文) 酸性オルガネラによるV-ATPaseを介した新規腎線維化機序の解明

研究課題名(英文) Effect of V-ATPase inhibition in renal fibrosis

研究代表者

矢花 郁子 (Yabana, Ikuko)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：60778596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：液胞型ATPase(V-ATPase)はオルガネラ小胞のpHを調節し、タンパク質の細胞内・外の輸送に関与している。今回、V-ATPase阻害による線維化抑制効果について腎内構成細胞で検討した。まず、マウス腎皮質集合管由来のM1細胞を使用し、TGF- β 誘導性の線維化に対するバフィロマイシン(BAF：V-ATPase阻害薬)の効果を検討した。TGF- β 誘導性に増加した線維化タンパク質等は、V-ATPase阻害により細胞質内オルガネラにとどまっていた。次に、腎線維化モデルであるUUOにてBAFの腎線維化抑制効果を検討したが、肝毒性が強くと、腎線維化の治療としてBAFを使用することは困難と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎線維化の進展にはV-ATPaseにより調節される細胞内酸性オルガネラを介したタンパク質輸送が関与している。障害により誘導された線維化タンパク質は、V-ATPase阻害により細胞外への輸送が抑制され、細胞内の酸性オルガネラにとどまるようになる。組織障害に伴う線維化に対し、障害を受けた組織特異的なV-ATPase阻害により線維化を抑制し、組織を保護できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The vacuolar ATPase (V-ATPase) regulates the pH of organelle vesicles and is involved in the intracellular and extracellular transport of proteins. We investigated the effect of V-ATPase inhibition on fibrosis in the kidney. First, we examined the effect of bafilomycin (BAF: V-ATPase inhibitor) on TGF- β -induced fibrosis in M1 cells derived from mouse renal cortical collecting ducts. The fibrotic proteins induced by TGF- β were trapped in the cytoplasmic organelle by V-ATPase inhibition. Next, we investigated the effect of BAF on renal fibrosis in a renal fibrosis model, UUO. Fibrosis induced by the UUO was partially inhibited in the BAF-treated group compared to the control group. However, the increase in liver weight and hepatic fibrosis were observed, meaning the hepatotoxicity was stronger than the inhibitory effect of BAF on fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓 線維化 細胞内タンパク質輸送 酸性オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

ATP 駆動性のプロトンポンプである Vacuolar-ATPase (V-ATPase)はオルガネラ小胞内の pH 調節により蛋白質細胞内輸送や細胞外分泌の中心的役割を担っている。一方、臓器障害の common pathway である線維化は腎臓においても重要でありその機序を解明することは重要な課題である。

2. 研究の目的

今回、『V-ATPase の活性化が、TGF- β 刺激による細胞外への線維化関連蛋白分泌を亢進させ、腎間質の線維化に参与している』と仮説を立て、細胞内蛋白輸送に関わる酸性オルガネラを構成する V-ATPase の線維化に対する役割について腎内構成細胞（腎集合管細胞）で検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞実験

マウスの腎皮質集合管から採取された細胞を SV40 によって不死化し作成した M1 を使用し、腎集合管細胞における V-ATPase の役割を線維化マーカーやオルガネラマーカー、形質転換マーカーの免疫染色及び qPCR により検討した。腎集合管細胞（M-1 細胞）の細胞株を培養後、コントロール、BAF（V-ATPase 阻害薬）、TGF- β 、TGF- β + BAF の刺激に対するタンパク質発現の変化は免疫染色により行い、1 次抗体（Fn1、Lamp1、Col4、Atp6v1b1/2、Ctnnb1、Vim、Col1a1、NaK-ATPase、表 1）と 2 次抗体（Rb-555、Mo-488）を用いた。加えて、Fn1、Cdh1、Cdh2 の遺伝子発現の変化を qPCR によって検討した。

一次抗体	Antigen	Catalog number	Host	希釈倍率
	Fn1	F3648	rabbit	1 : 100
	Lamp1	ab25630	mouse	1 : 50
	Col4	ab6586	rabbit	1 : 200
	Atp6v1b1/2	sc-55544	mouse	1 : 50
	Ctnnb1	c2206	rabbit	1 : 1000
	Vim	M0725	mouse	1 : 100
	Col1a1	NB600-408	rabbit	1 : 100
	NaK-ATPase	sc-21712	mouse	1 : 100

表 1：一次抗体と希釈倍率

(2) 動物実験

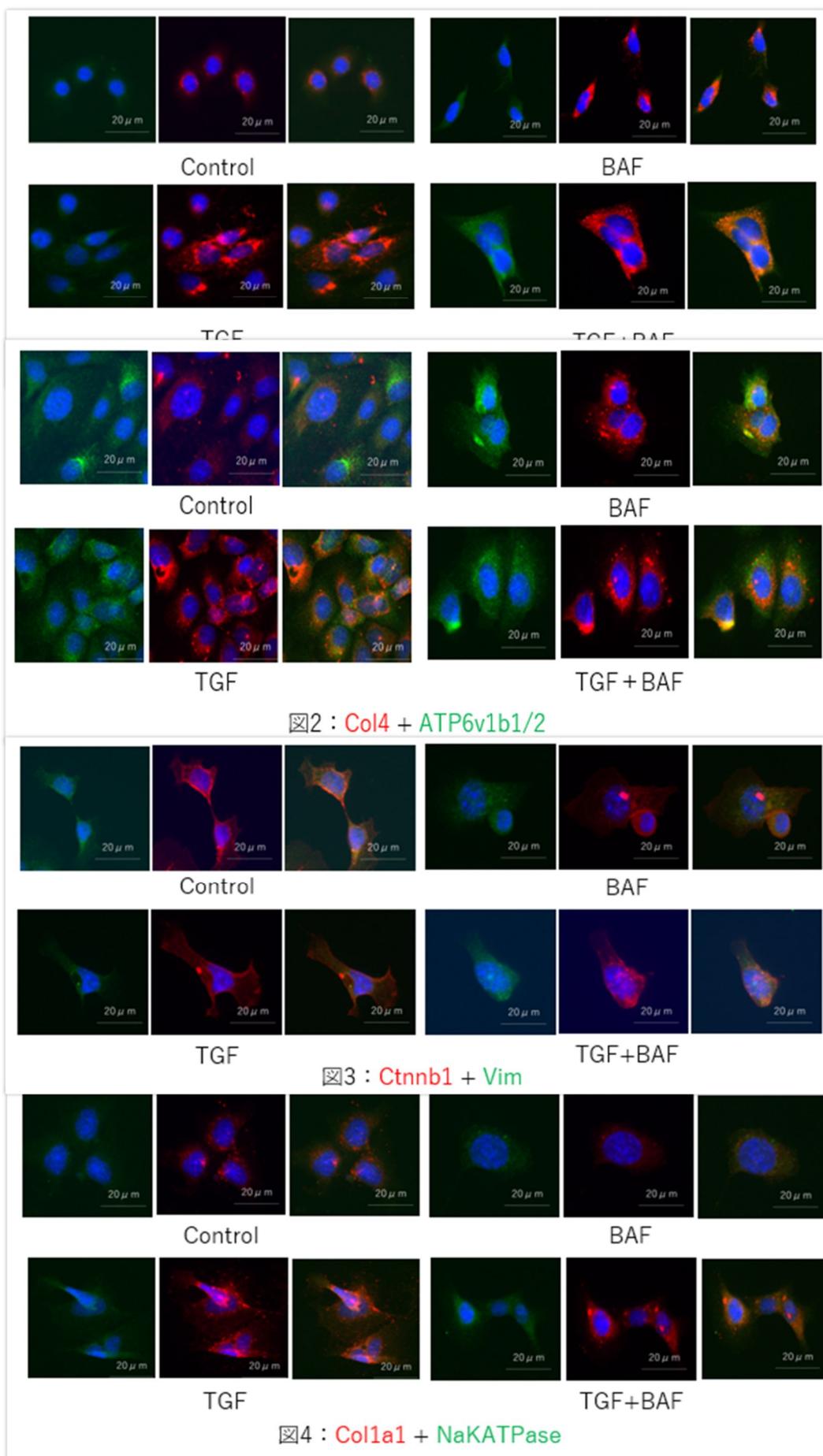
7 週齢の雄性 SD rat にて UUO を施術し、100 nM BAF あるいはコントロールの DMSO を腹腔内投与して、V-ATPase 阻害の線維化抑制効果を検討した。BAF もしくは DMSO は術前日から術後 7 日まで腹腔内投与したのち、術後 8 日目に腎・肝・心臓をサンプリングした。

4. 研究成果

(1) 免疫染色

TGF- β により細胞外での Fn1 発現が増強した。この細胞外での Fn1 発現の増強は BAF により消失し、細胞質内に Fn1 がとどまっていた。加えて、TGF- β + BAF 群では、Fn1 は Lamp1 と共局在しており、細胞内オルガネラにトラップされていると考えられた(図 1)。また、コラーゲン 4 の発現も TGF- β + BAF 群で細胞内オルガネラの膜タンパクである Atp6v1b1/2 と共局在していた(図 2)。加えて、細胞膜構成成分である Ctnnb1、NaK-ATPase、細胞骨格の構成成分である Vim についても、BAF により細胞質にとどまっている

染色像が観察され、V-ATPase 阻害により酸性オルガネラの pH 調節が阻害され、オルガネラによるタンパク質輸送系が破綻していると考えられた(図 3、4)。



(2) qPCR

コントロール、BAF、TGF-、TGF- +BAF の4種の刺激を行った M1 細胞での Gapdh、Fn1、Cdh1、Cdh2 の mRNA の発現量の平均は以下の通りであった(表 2、図 5)。

	control	BAF	TGF-	TGF- +BAF
n	6	6	6	6
Fn1	1.00 ± 0.39	0.90 ± 0.09	5.52 ± 0.64	2.51 ± 0.46
Cdh1	1.00 ± 0.22	0.32 ± 0.07	1.09 ± 0.12	0.28 ± 0.03
Cdh2	1.00 ± 0.19	0.49 ± 0.07	0.80 ± 0.11	0.36 ± 0.06

表 2：それぞれの発現量の平均と標準偏差

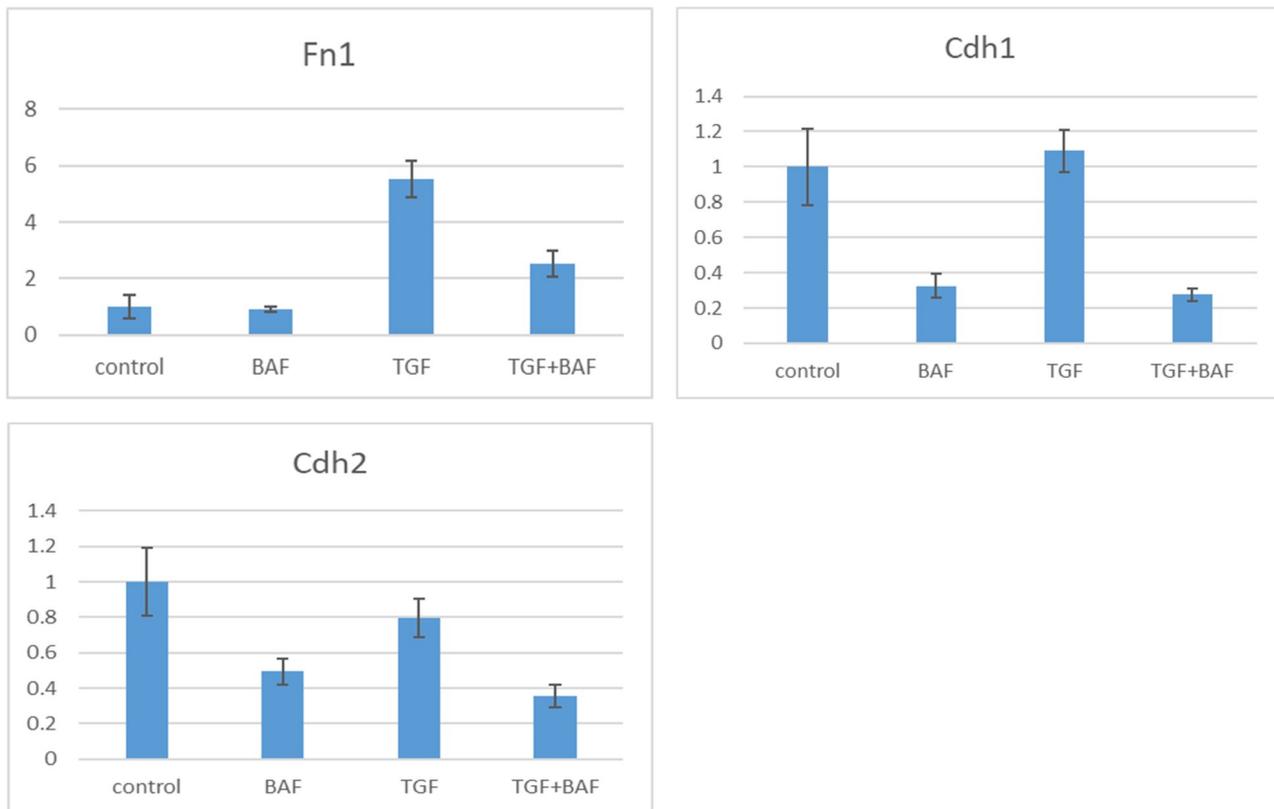


図 5：刺激ごとの発現量の平均と標準偏差

Fn1 の mRNA 発現は TGF- により顕著に誘導された。また、この TGF- により誘導された Fn1 発現は BAF により抑制された。内皮間葉転換のマーカである Cdh1 の発現は、M1 細胞において TGF- では抑制されず、むしろ BAF 刺激により抑制されていた。加えて、Cdh2 の発現も BAF や TGF- の刺激により抑制されていた。

(3) 動物実験

UUO の施術により誘導された左腎の線維化は、コントロールの DMSO 群に比べ、BAF 投与群において一部抑制されていた。一方、コントロールとして評価した右腎は DMSO 群と BAF 群間で変化は認めなかった。しかしながら BAF 投与群において、肝重量の増加および肝線維化が認められ肝毒性が強く認められた。したがって、UUO に伴う腎線維化に対する BAF の線維化抑制効果は限定的であり、むしろ BAF による肝障害の方が重篤であると考えられ、腎線維化に対する V-ATPase 阻害剤による治療として BAF を使用することは困難と考えられた。腎線維化治療には、他の肝毒性の低い V-ATPase 阻害薬を用いるべきである。

(参考文献)

1. Ikuko oba-yabana, Takefumi Mori, et al. Acidic organelles mediate TGF- β 1-induced cellular fibrosis via (pro)renin receptor and vacuolar ATPase trafficking in human peritoneal mesothelial cells. *Sci Rep* . 08 February 2018.
2. Xueqin Cao, Xueqing Yu, et al. V-ATPase promotes transforming growth factor--induced epithelial-mesenchymal transition of rat proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 302: F1121–F1132, 2012.
3. Chien-Yuan Wang, Shih-Chieh Hung et al. Apoptosis in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells: effect of serum and medium supplements. *Apoptosis* (2010) 15:439–449

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oba-Yabana Ikuko, Mori Takefumi, Takahashi Chika, Hirose Takuo, Ohsaki Yusuke, Kinugasa Satoshi, Muroya Yoshikazu, Sato Emiko, Nguyen Genevieve, Piedagnel Remi, Ronco Pierre M., Totsune Kazuhito, Ito Sadayoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Acidic organelles mediate TGF- 1-induced cellular fibrosis via (pro)renin receptor and vacuolar ATPase trafficking in human peritoneal mesothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-20940-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

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 廣瀬卓男、矢花郁子、高橋知香、衣笠哲史、室谷嘉一、伊藤貞嘉、森建文
2. 発表標題 腹膜中皮細胞における（プロ）レニン受容体の役割の検討
3. 学会等名 第63回日本透析医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松木琢磨、森建文、高橋知香、矢花郁子、大崎雄介、廣瀬卓男、熊谷直憲、伊藤貞嘉
2. 発表標題 ポドサイト障害に対するVATPaseの評価
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森建文、矢花郁子
2. 発表標題 細胞内蛋白輸送による腹膜線維化機序
3. 学会等名 第23回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢花郁子、大崎雄介、高橋知香、伊藤貞嘉、森建文
2. 発表標題 酸性オルガネラによる蛋白輸送は腹膜透析におけるグルコース分解産物(GDPs)誘導性腹膜線維化に関与する
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森建文、高橋知香、矢花郁子、大崎雄介、衣笠哲史、伊藤貞嘉
2. 発表標題 腎線維化における集合管酸性オルガネラの役割
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松木琢磨、森建文、高橋知香、矢花郁子、大崎雄介、熊谷直恵、伊藤貞嘉
2. 発表標題 培養ポドサイト線維化機序に対するV-ATPaseの評価
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森建文、矢花郁子、廣瀬卓男、高橋知香、大崎雄介、佐藤 恵美子、伊藤貞嘉
2. 発表標題 腹膜透析におけるV-ATPaseと(pro)renin受容体の役割
3. 学会等名 第10回(プロ)レニン受容体フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬卓男、島田佐登志、松木琢磨、高橋知香、矢花郁子、中村はな、衣笠哲史、室谷嘉一、谷淳一、森建文
2. 発表標題 腎うっ血における(プロ)レニン受容体の発現
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬卓男、松木琢磨、高橋知香、矢花郁子、中村はな、衣笠哲史、室谷嘉一、谷淳一、森建文
2. 発表標題 エクソン4欠失(プロ)レニン受容体のV-ATPase機能に与える影響
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松木琢磨、廣瀬卓男、島田佐登志、高橋知香、矢花郁子、中村はな、衣笠哲史、室谷嘉一、谷淳一、伊藤貞嘉、森建文
2. 発表標題 腎うっ血における(プロ)レニン受容体の発現
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬卓男、衣笠哲史、高橋知香、矢花郁子、中村はな、室谷嘉一、谷淳一、森建文
2. 発表標題 ラット腎臓光学顕微鏡用組織標本の低真空走査電子顕微鏡での観察
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬卓男、高橋知香、松木琢磨、中山晋吾、衣笠哲史、矢花郁子、加藤季子、関敬之、中村はな、谷淳一、森建文
2. 発表標題 光学顕微鏡用腎組織標本の低真空走査電子顕微鏡を用いた観察
3. 学会等名 第48回宮城県腎不全研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moriyama S, Takeuchi W, Kaburaki T, Shimada K, Hirose T, Kinugasa S, Matsuki T, Oba-Yabana I, Muroya Y, Mori T
2. 発表標題 Low-vacuum scanning electron microscopy analysis for formalin-fixed paraffin-embedded rat kidney sections
3. 学会等名 World Congress of Nephrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirose T, Cabrera-Socorro A, Matsuki T, Takahashi C, Oba-Yabana I, Kinugasa S, Muroya Y, Tani J, Nguyen G, Groszer M, Ito S, Mori T
2. 発表標題 Exon 4-encoded domain of (pro)renin receptor impairs several V-ATPase-mediated functions
3. 学会等名 ISARSH2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

講座ホームページ
<https://tohokupd.jimdofree.com/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----