

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15992

研究課題名(和文) 抗酸化ストレス酵素APE1の慢性腎臓病における役割解明

研究課題名(英文) Role of antioxidant and DNA-repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in kidney injury

研究代表者

丸山 啓介 (Maruyama, Keisuke)

旭川医科大学・大学病院・客員助教

研究者番号：30648324

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)：慢性腎臓病は末期腎不全に至る危険率が高いのみならず、心血管疾患の独立した危険因子である。しかし、既存の治療法は腎不全の進展抑制には一定の効果を確認するが、決して十分とは言えず、新しい治療法の開発が重要な課題となっている。我々は抗酸化ストレス作用を持つ多機能酵素であるApurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) に注目した。APE1を発現するプラスミドベクターを腎障害モデルマウスに投与したところ、コントロールと比べ、腎組織において線維化および炎症反応を有意に軽減することを明らかにした。したがって、APE1は腎保護的に作用す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

我々は抗酸化ストレス酵素APE1の尿管結紮モデルでの腎間質線維化における役割とその作用機構を解明した。APE1は酸化ストレスの軽減のみならず、免疫機能を調整することで腎保護的に作用することを明らかにした。これらの結果より、APE1の慢性腎臓病に対する新しい治療法としての可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) is a multifunctional protein that controls the cellular response to oxidative stress and possesses DNA-repair functions. Its function and therapeutic prospects with respect to kidney injury are unknown. To study this, we activated APE1 during kidney injury by constructing an expression vector (pCAG-APE1), using an EGFP expression plasmid (pCAG-EGFP) as a control. We performed unilateral ureteral obstruction (UUO) as a model of tubulointerstitial fibrosis on ICR mice before each vector was administered via retrograde renal vein injection. In this model, pCAG-APE1 injection significantly reduced histological end points including fibrosis, inflammation, tubular injury, and oxidative stress. qPCR analysis showed significantly lower expression of Casp3 and inflammation-related genes in pCAG-APE1-injected animals. Thus, therapeutic APE1 modulation might be beneficial for the treatment of renal diseases.

研究分野：腎臓内科

キーワード：APE1 慢性腎臓病 抗酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年糖尿病、高血圧症に伴う慢性腎臓病患者数が増加している。慢性腎臓病は末期腎不全に至る危険率が高いのみならず、心血管疾患の独立した危険因子である【Maruyama K, et al. *Hypertens Res.* 2016 Sep;39(9):633-9.】。しかし、レニン・アンジオテンシン系抑制薬などの既存の治療法は腎不全の進展抑制には一定の効果を認めるが、決して十分とは言えない。したがって、慢性腎臓病および腎不全の病態生理の解明、さらに効果のある新しい治療法の開発が重要な課題となっている。

(2) Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) は DNA 修復やレドックス機構を介して、抗酸化ストレス作用を持つ多機能酵素である。動脈硬化病変や神経変性疾患などの酸化ストレス環境下において APE1 活性が上昇することが知られている。我々は心筋前駆細胞において、APE1 が酸化ストレス条件下で細胞死を抑制することを証明した【Aonum T, Maruyama K, et al. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Aug;5(8):1067-78.】。さらに APE1 を強制発現させた心筋前駆細胞を用いて、心筋梗塞モデルマウスに対して細胞療法を行ったところ、心機能が改善することを証明した。

(3) 腎不全の進展には、低酸素や酸化ストレスの亢進が大きく関わっており、抗酸化ストレス作用を持つ APE1 は腎保護的に作用する可能性がある。そこで本研究では腎不全病態モデルにおける APE1 の役割およびその作用機構の解明を目指した。

## 2. 研究の目的

我々は抗酸化ストレス酵素である APE1 による遺伝子治療は腎不全の進展を抑制し、腎保護的に作用するという仮説を立て、腎不全の新規治療への応用を模索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) プラスミドベクターの作成

pCAG ベクターを用いてマウス APE1 発現プラスミド (pCAG-APE1) ならびにコントロールとして EGFP 発現プラスミド (pCAG-EGFP) を作成した。また pCAG-APE1 には HA タグ配列を加えた。プラスミドの機能解析としては BHK-21 細胞にトランスフェクションを行い、蛍光免疫染色法を用いて APE1 ならびに EGFP の蛋白発現を解析した。

### (2) 腎不全モデルマウスの作成ならびにプラスミドベクターの経静脈投与

動物は 10-12 週齢の ICR マウスを用いた。麻酔下に、マウス左側背部を小切開し、左側尿管一側を結紮した。片側尿管結紮後に腎動静脈をクランプし、左腎静脈より逆行性に pCAG-APE1 もしくは pCAG-EGFP を投与した。術後 4 日目の腎臓を摘出し、蛍光免疫染色法を用いて APE1 ならびに EGFP の発現を解析した。また術後 7 日目に腎臓を摘出し、下記の各種解析に用いた。

### (3) 腎間質線維化の評価

腎組織標本の Sirius red 染色により、組織学的な線維化の解析を行った。

### (4) 免疫組織染色

マクロファージあるいは筋線維芽細胞のマーカー (各々 F4/80 と  $\alpha$  SMA) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、これら細胞の腎間質を場とした浸潤や増殖を解析した。また腎組織内での酸化ストレスを評価するために、DNA 損傷のマーカーである 8-OHdG に対する蛍光染色を行い、酸化ストレスの定量を行った。

### (5) RT-PCR

摘出したマウス腎臓から RNA を抽出し、逆転写によって cDNA を合成した。ついで、線維化関連 (Acta2, Col1a1, Fn1)、炎症性サイトカイン関連 (Il1b, Il6, Il10)、アポトーシス関連 (p53, Casp3)、抗酸化ストレス酵素 (Hmox1) の mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。

### (6) RNA シーケンス

摘出したマウス腎臓から抽出した RNA を用いて RNA シーケンスを行い、遺伝子発現を網羅的に解析した。パスウェイ解析として GO 解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) BHK-21 細胞に pCAG-APE1 をトランスフェクションしたところ、マウス APE1 の発現を認めた。マウス APE1 の発現は HA の発現とマージしており、マウス APE1 遺伝子がクローニングされたことを確認した (図 1)。同様に pCAG-EGFP をトランスフェクションし、EGFP の発現を確認した。

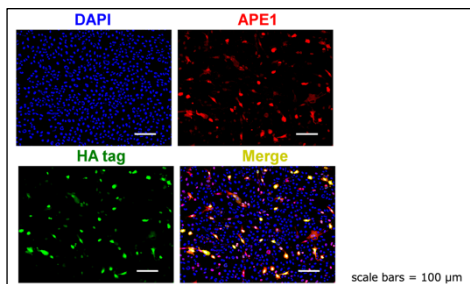


図 1 pCAG-APE1 のトランスフェクション

(2) 術後 4 日目の腎臓を蛍光免疫染色法で解析したところ、pCAG-APE1 を静注したマウス (APE1 マウス) では HA とマージする APE1 の発現を認め、pCAG-EGFP を静注したマウス (EGFP マウス) では EGFP の発現を認めた。プラスミドベクターはびまん性に尿細管間質の線維芽細胞を中心に導入されていることを確認した (図 2)。

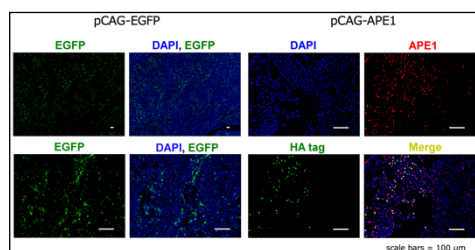


図 2 腎臓への遺伝子導入

(3) EGFP マウスの腎臓では、マクロファージの浸潤と筋線維芽細胞の増殖を伴った間質線維化が認められた。一方で APE1 マウスではこれらの現象を有意に抑制した (図 3、図 4)。

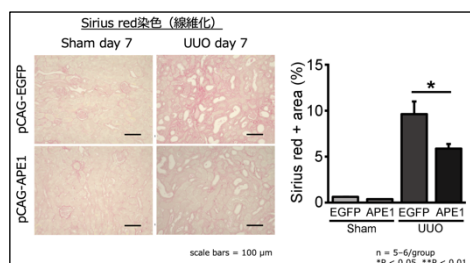


図 3 Sirius Red 染色 (線維化)

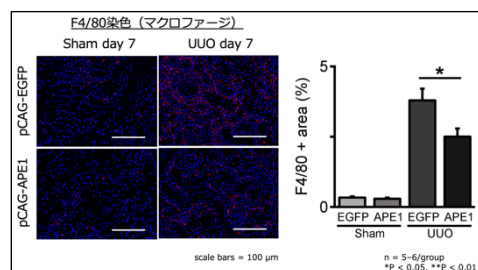


図 4 F4/80 染色 (マクロファージ)

(4) EGFP マウスでは線維化関連 (Acta2, Colla1, Fn1)、炎症性サイトカイン関連 (Il1b, Il6, Il10)、アポトーシス関連 (p53, Casp3)、抗酸化ストレス酵素 (Hmox1) の mRNA 発現が亢進していた。一方で、APE1 マウスでは炎症性サイトカインである Il1b, Il6, Il10 ならびにアポトーシスの実行に関わるエフェクター・カスパーゼである Casp3 の発現を有意に抑制した (図 5、図 6)。

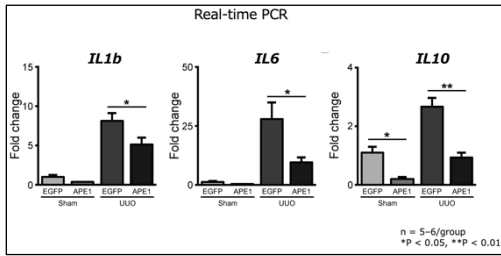


図 5 RT-PCR 結果 (1)

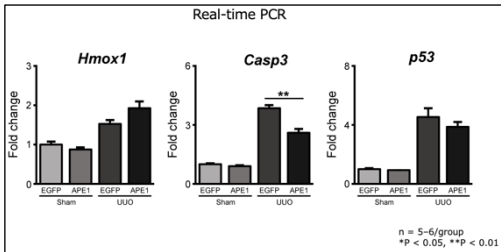


図 6 RT-PCR 結果 (2)

(5) RNA シーケンスで網羅的に遺伝子発現を解析したところ、EGFP マウス腎臓と比べ、APE1 マウス腎臓では、854 個の遺伝子の発現が有意に増強し、773 個の遺伝子の発現が有意に低下した (図 7)。主成分分析ならびにヒートマップで解析したところ、EGFP マウス腎臓と比べ、APE1 マウスの腎臓における遺伝子発現が偽手術を行ったコントロールマウスに類似しており、腎障害が軽減されていることが明らかとなった (図 8)。

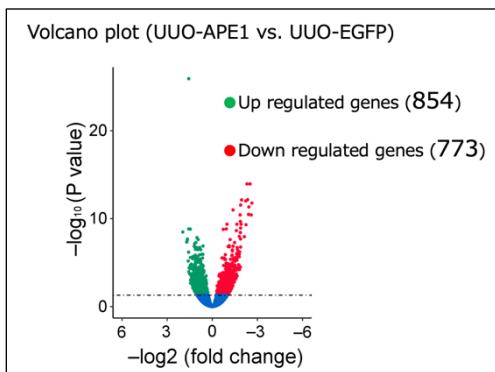


図 7 Volcano plot

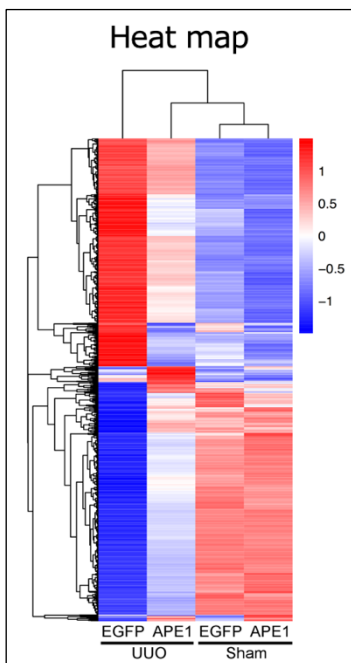


図 8 Heat map

(6) RNA シーケンスで得られたデータに基づき GO 解析を行った。GO 解析において、EGFP マウスでは免疫応答に関わる I16、Tnf などのサイトカインや Cc15 などのケモカインの発現が増強し、また Nos2 や Ptsg2 などの酵素、Casp7 などのカスパーゼに加え、Jak2 や Jak3 などのチロシンキナーゼの発現が増強した。一方で APE1 マウスではこれらの現象を有意に抑制した。

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 Maruyama Keisuke, Nakagawa Naoki, Aonuma Tatsuya, Saito Yukihiro, Hayasaka Taiki, Kano Kohei, Horiuchi Kiwamu, Takehara Naofumi, Kawabe Jun-ichi, Hasebe Naoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 The antioxidant and DNA-repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 limits the development of tubulointerstitial fibrosis partly by modulating the immune system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-019-44241-z	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Maruyama Keisuke, Nakagawa Naoki, Hasebe Naoyuki
2. 発表標題 Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1), an antioxidant and DNA-repair enzyme, has a renoprotective effect during kidney injury
3. 学会等名 ISN World Congress of Nephrology 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------