

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790576

研究課題名（和文） クロマチンリモデリングを介した腎不全治療

研究課題名（英文） Investigation of a new promising therapeutic for renal diseases by chromatin remodeling.

研究代表者

吉川 真弘 (YOSHIKAWA MASAHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：20447414

研究成果の概要：

ヒト近位尿細管上皮細胞における TGF - 1 誘導性アポトーシスを、ヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA が抑制することが示された。

このアポトーシスは ERK シグナルを介していることが示された。

TSA は転写レベルで脱リン酸化酵素を誘導し、ERK 活性を抑えることで、アポトーシスを防いでいる可能性が考えられた。

今後、動物モデルに対して成果を検討し、アポトーシスが一因となる腎不全に対して、ヒストン脱アセチル化阻害剤が新たな治療薬となり得るか、その可能性を検討する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：

キーワード：TGF - 1, apoptosis, 腎線維化, クロマチンリモデリング

1. 研究開始当初の背景

我々はクロマチンリモデリングを介した新しい腎不全治療の開発を目指している。我々は、培養ヒト近位尿細管細胞における TGF - 1 誘導性の epithelial mesenchymal transition (EMT) が、TSA の作用によって抑制されることを示した (Yoshikawa M, et al. Journal of American Society of Nephrology 18(1):58-65, 2007)。

尿細管上皮細胞の apoptosis は、尿細管萎縮を来し、線維芽細胞増殖に適した環境を形成することで、EMT 同様やはり間質の線維化を誘導することが知られている。間質の線維化は不可逆的な慢性腎不全を来し、最終的には透析や腎移植などの代替療法が必要な状態となる。

2. 研究の目的

我々は、EMT に対してと同様、ヒト近位尿細管上皮細胞における TGF - 1 誘導性の apoptosis に対しても、TSA が保護的に働くか否かを検討する。更に TSA によるヒストンアセチル化を介した、anti-apoptotic factor の誘導が見られるかなど、その分子生物学的機序を解明することも目指す。

最終的には、in vivo の系に発展させ、腎における線維化や apoptosis に対するモデル動物に、TSA を始めとした HDAC-inhibitor を投与した際の効果を検証するとともに、生体内における HDAC-inhibitor の作用機序を分子生物学的に検討することを目標とする。

本研究を通して、不可逆性と考えられてきた慢性腎不全に対する、新たな薬物療法の開発が可能となると考えている。

3. 研究の方法

(1) ヒト近位尿細管上皮細胞における、TSA による TGF - 1 誘導性 apoptosis 抑制のメカニズムの検討。

実験においては、市販の、ヒト近位尿細管上皮細胞を培養皿上に sub-confluent に培養して用いる。培地に TGF - 1、TSA、caspase-inhibitor を添加し、一定時間培養した後、apoptosis の指標である断片化 nucleosome を、電気泳動や ELISA 法によって検出する。

TGF - 1 が apoptosis を来すメカニズムの検討。

HDAC-inhibitor の作用機序を解明するために、まず TGF - 1 が apoptosis を来すメカニズムを検討する必要がある。まず TGF - 1 による apoptosis が、caspase-inhibitor の作用により抑制されるかを調べることで、この apoptosis が caspase-dependent であるかを検討する。更にその上流にある apoptosis 誘導因子の signal についても同定を試みる。

TSA が TGF - 1 誘導性 apoptosis を抑制するメカニズムの検討。

apoptosis に対し抑制的に働く因子は数多く報告されている。これらの因子が TSA によって転写レベルで誘導されるか、real-time RT-PCR などを用いて検討を行う。

(2) 片側性尿細管閉塞 (UUO) モデルマウスにおける、TSA による腎線維化抑制の検討。UUO モデルマウスは腎間質線維化の代表的なモデルであり、TGF - 1 の関与が知られ、尿細管上皮細胞は apoptosis を来す。このモデルにおいて、TSA が腎線維化や apoptosis

を抑制し得るかを検討する。

UUO モデルの作製および TSA の投与。

UUO モデル作製には、8週齢前後の雄 C57BL6/J を使用する。0.5mg/kg の TSA を、UUO モデル作製直後から、1日1回皮下注射にて24時間毎計7回投与を行う。

線維化の評価

腎皮質間質の線維化の評価のため、Masson-Tricrome 染色を三菱化学ビーシーエルに委託する。

apoptosis の評価

apoptosis の評価は、市販の Kit を用いた TUNEL 染色にて行う。

4. 研究成果

(1) TGF- β 1 はヒト近位尿細管上皮細胞に対して、アポトーシスを誘導した。(図1)

(2) このアポトーシスは caspase 依存性であり、かつ ERK 阻害剤 U0126 で阻害されることから、ERK シグナル経路を介すると考えられた。(図1、図2)

(3) TSA は TGF- β 1 によるアポトーシスを抑制した。(図1)

(4) TSA は TGF- β 1 による ERK シグナル活性化を抑制することでアポトーシスを防ぐと考えられた。(図2)

(5) TSA は脱リン酸化酵素である mitogen activated protein kinase phosphatase 等の転写レベルでの誘導を介して、ERK シグナルを不活化している可能性が推測された。

(6) 線維化を原因とする慢性腎不全モデ

ルである UUO マウスに対し、TSA を投与する実験を行った。当初の予定より、薬剤の投与量や投与期間を延長するなどの条件変更を試みたが、現時点では TSA の明らかな治療効果を認めるには至っていない。

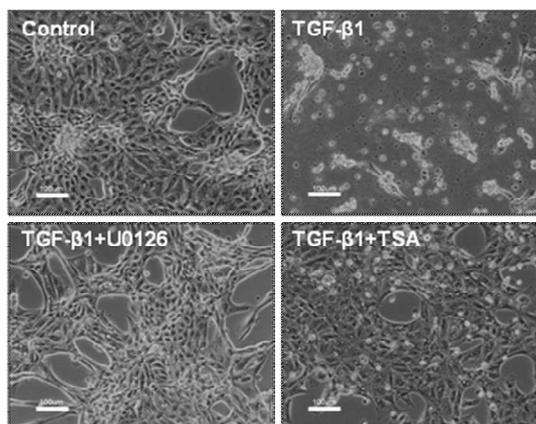


図1. TGF- β 1 によるアポトーシス誘導と、TSA による抑制

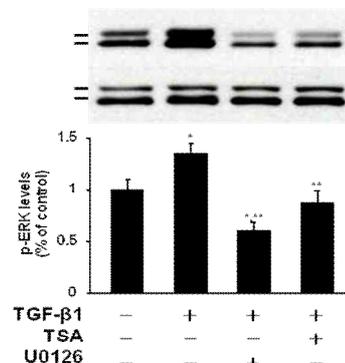


図2. TGF- β 1 による ERK シグナル活性化と、TSA による不活化

上記(1)-(5)の成果に付き、現在、英文学術誌に投稿中である。

また、今後は薬剤の投与方法などを検討し直すことで、腎不全モデル動物に対する効果を改めて検証し、TSA を始めとしたヒストン

脱アセチル化酵素阻害剤の腎不全治療薬としての可能性を追及していく。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

吉川 真弘

Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses TGF- β 1-Induced Apoptosis by Inhibiting ERK Signals in Renal Tubular Epithelial Cells.

The Annual Meeting of the American Society of Nephrology.

2007 年 11 月 1 日

in San Francisco, California, USA.

6．研究組織

(1)研究代表者

吉川 真弘 (YOSHIKAWA MASAHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：2 0 4 4 7 4 1 4

(2)研究分担者

菱川 慶一 (KEIICHI HISHIKAWA)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：5 0 2 5 5 4 6 0