

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08684

研究課題名（和文）虚血性急性腎不全におけるconnexin 43の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Role of Connexin 43 in Ischemic Acute Renal Failure

研究代表者

衣笠 哲史（Kinugasa, Satoshi）

東北医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80796342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：当研究では急性腎障害や腎移植における後期移植腎機能障害など、腎臓内科領域において重要な疾患に関わる主要な機序の一つである腎虚血再灌流障害の機序に関し、connexin 43が重要な役割を果たしていることを示すことができ、同分子がさらにどのような遺伝子の発現の変化に関わり、疾患の発症につながるかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎虚血再灌流障害の発症する機序に関してconnexin 43の役割を明らかにすることができたため、急性腎障害や腎移植における後期移植腎機能障害など、腎臓内科領域において重要な疾患の治療法・予防法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were able to demonstrate that connexin 43 plays an important role in the mechanism of renal ischemia-reperfusion injury, which is a major mechanism involved in significant diseases in the field of nephrology, such as acute kidney injury and late transplant kidney function disorder in kidney transplantation. We have clarified how this molecule is involved in the changes in the expression of genes, leading to the onset of the disease.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎虚血・再灌流障害 急性腎障害 ギャップ結合

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓内科領域における重要な臨床的病態として知られている急性腎障害や腎移植における後期移植腎機能障害などについて検討する上で、特に重要とされる主要なメカニズムの一つが腎虚血再灌流障害 (renal I/R) であり、血流の一時的な中断と再開により腎臓に引き起こされる炎症反応を中心とする一連の病態変化を指す。本研究では、この腎虚血再灌流障害のメカニズムを明らかにすることを目的としており、特に connexin という蛋白質群の一つである connexin 43 (Cx43) の役割に注目する。Cx43 は細胞間の情報伝達を担う重要な蛋白質で、細胞の生存と死に直接影響を及ぼす可能性があることから、その役割の解明は急性腎障害や移植腎機能障害の新たな治療標的の探索、そして有効な予防・治療戦略の開発に対する貢献が期待される。現在、急性腎障害や移植腎機能障害の予防・治療方法はきわめて限られているため、新たな治療法の開発は非常に重要である。従って、新たに明らかになる腎虚血再灌流障害のメカニズムや Cx43 の役割に基づいた予防・治療法が提供されれば、疾患のより効率的な予防・治療が可能となり、腎疾患による社会的な負担の軽減や患者の生活の質の改善につながる可能性があると考えられる。よって、本研究から得られる基礎的な知見が今後臨床研究や治療へと応用される場合、その影響は大きいと考えられ、また大きな費用対効果が期待されるであろう。

2. 研究の目的

connexin は細胞間の情報伝達を可能にする蛋白質であり、その一つである Cx43 は他の connexin と同様、多量体を形成しギャップジャンクションチャンネル (GJC) またはヘミチャンネル (HC) の構成要素としての役割を担っている。GJC は心臓や脳神経系など多くの重要な臓器における生理学的・病理学的過程での細胞間情報伝達を司る一方、HC は細胞から細胞への物質輸送を調節する自己分泌/傍分泌機構に関与しているとされている。

近年の研究によると、Cx43 は腎臓の各種細胞で発現し、炎症性・虚血性疾患に深く関与していると報告されている。Cx43 の存在が、腎虚血再灌流障害を含む種々の急性または慢性の腎疾患の動物モデルの発症・伸展においてどのように影響するかについての研究が近年増えてきている。腎虚血再灌流障害は腎臓の血流が一時的に中断し、その後再度血流が得られた際に惹起される一連のサイトカイン・ケモカイン・接着分子を含む遺伝子の発現変化により腎臓組織の損傷が引き起こされる現象である。

我々の研究チームは、先行研究を通じて、renal I/R の発症早期段階で Cx43 の発現が増加すること、また、Cx43 のヘテロ接合体ノックアウトマウス (Cx43^{+/-}) を用いた実験から、Cx43 の一部欠損が腎機能と腎組織学的所見の改善に寄与することを明らかにした。これらの結果は Cx43 が renal I/R における病態形成に深く関与している可能性を示唆する。そこで、本研究ではこれらの過去の研究結果を基に、Cx43 の renal I/R におけるより詳細な機能や影響を調査することを目的とした。具体的には、Cx43 の発現がどのように renal I/R の病態形成に影響を及ぼすのか、そしてその過程でどのような細胞間の情報伝達が行われているのかを明らかにすることを目指した。これらの目標が達成されることにより、Cx43 をターゲットとした新たな治療戦略の開発に向けた重要な一歩となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、renal I/R における Cx43 の病態生理学的な役割と、その関与する機序を詳細に解析することを目指した。そのために、以下の三つの主要な視点から研究を進めた。

- (1) 好中球浸潤における Cx43 の役割と、関与するメカニズムの解明: Cx43 ヘテロ接合体ノックアウトマウス (Cx43^{+/-}) を用いて好中球の動員と接着に関連する分子の発現量の変化を調

べる。これにより、Cx43 が好中球浸潤にどのように関与するか、そしてその機序は何であるかを明らかにすることを目指す。

- (2) renal I/R における NGAL と galectin-3 の役割の究明：我々のデータでは NGAL と galectin-3 の mRNA 量は renal I/R において増加し、Cx43+/- マウスでは野生型マウスに比し発現が減少した。よって、Cx43 が NGAL と galectin-3 の発現を直接制御するのか、それとも好中球浸潤が引き起こす炎症反応の結果として発現が増加するのかを明らかにする。
- (3) Cx43 GJC/HC の renal I/R における役割の解明：腎虚血再灌流障害において、Cx43 GJC/HC を介した炎症反応や細胞死シグナルの伝達がどの程度関与しているかを明らかにする。

以上の視点から解析を進めるため、以下の実験を計画した。

renal I/R 後の野生型マウスと Cx43+/- マウスからの近位尿管上皮細胞 (PTEC)、内皮細胞、好中球の単離：renal I/R において各細胞種で起こる個々の分子事象を明らかにする。129/Sv 系統の野生型と Cx43+/- マウスを腎虚血に暴露した後、様々な長さの再灌流時間の後に腎臓を採取する。採取した腎は dissociator を用いて機械的に解離させた後、磁力を持つビーズに結合した抗体を用い PTEC と内皮細胞、好中球を単離する (Legouis D et al. BMC Cell Biol. 2015, Zhao et al. BMC Cell Biol. 2014, Akis et al. Kidney Int. 2004)。

単離した PTEC、内皮細胞、好中球を用いた定量 PCR 法：単離した各種細胞から RNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR 法を用いて Cx43 の下流で制御される事象に関与すると考えられる遺伝子の発現を調べる。これにより、Cx43 がどの程度その遺伝子の発現に影響を与えているかを定量的に評価することが可能となる。

単離した PTEC、内皮細胞の初代培養細胞を用いた低酸素実験：初代培養の PTEC と内皮細胞において、In vitro 低酸素実験モデルを用いて GJC または HC を介した細胞間コミュニケーションの阻害がどのような影響を及ぼすかを調査する。野生型マウスから単離した PTEC や内皮細胞を用いて初代細胞培養を行い、免疫蛍光法を用いて Cx43 の発現を確認する。その後、得られた細胞を低酸素環境に曝露し、GJC または HC の阻害薬を投与した後、定量 PCR 法とウェスタンブロッティングを用いて各種分子の発現を評価し、GJC/HC 阻害薬投与群と非投与群の表現型を比較する。

これらの実験を通じ、renal I/R における Cx43 の病態メカニズムの詳細を解明し、Cx43 をターゲットとした新しい予防・治療戦略の構築に寄与することを目標とした。

4. 研究成果

当研究では、急性腎障害や腎移植後の後期移植腎機能障害といった重篤な臨床的病態を引き起こす腎虚血再灌流障害 (renal I/R) の詳細な病態生理学的機序を解明することを目指した。特に、gap junction protein である connexin 43 (Cx43) が renal I/R において果たす役割の究明を試み、新たな治療標的の探求と予防・治療戦略の開発に貢献することを目的とした。

研究の結果について以下に述べる。野生型マウスと Cx43+/- マウスの腎に虚血・再灌流を施し、免疫応答と遺伝子発現の変化を詳細に観察したところ、野生型マウスでは腎虚血後 24~48 時間をピークに髄質外層外帯 (OSOM) において大量の好中球浸潤が確認され、さらに 72 時間後にはマクロファージの大量浸潤が髄質外層内帯 (ISOM) を中心に認められた。

野生型マウスの腎ホモジネートのリアルタイム定量 PCR 法による解析を実施したところ、I/R 後 3 時間で Cx43、HIF1、galectin-3 の発現が増加し、その後 MCP1、Kim1、CXCL1、CXCL2、TNF、IL6、NGAL、IL1、TLR、IL10、selectin、ICAM1、TGF、PECAM 等多数の遺伝子の発現が増加し、さらに遅いタイムポイントで PCNA と VCAM1 の増加が認められた。一方、CXCL12、Cx37、iNOS 等の発現は I/R により低下した。これらの多くは虚血による低酸素状態や炎症反応に関連する分子であり、虚血による細胞ストレスと炎症反応の増大が想定された。また近位尿管 S3 セグメントにおける Cx43 の発現が免疫組織染色により確認された。

特筆すべきことは、Cx43^{+/-}マウスでは虚血後 48 時間で OSOM の好中球浸潤が 80%と著明に減少し、組織学的改善と血中 BUN・Cr 値の有意な低下が認められたことである。また野生型と比べ、PCR 法で NGAL, HIF1 α , NGAL, IL1 β , TLR, HIF1 α , Kim1, selectin, ICAM1, TGF β 1 等の mRNA の有意な減少が確認された。これは Cx43 の欠損が虚血再灌流障害に対する抵抗性を示し、腎機能と腎組織学的所見の改善と関連していることが示唆された。これは、Cx43 をターゲットとした新たな治療戦略の可能性を示唆している。

我々の研究は、さまざまな研究環境の制約や COVID19 のパンデミックという全世界的な保険衛生上の危機による影響を受け、全ての予定していた実験を実施することが困難であった。そのような条件下でも、我々は実験デザインを適応的に変更し、一部の実験に関しては新たな成果を出すことができた。特に、各種の腎細胞の単離とその実験は、Cx43 と renal I/R の関連を明らかにする上で有意義であった。実験計画を大幅に見直すことを余儀なくされたが、その結果として得られた新たな知見は貴重であった。当初、我々は磁力を帯びたビーズを用いて各種細胞の分離を試みていたが、これをフローサイトメトリーとセルソーターによる細胞分離法に切り替えることで、内皮細胞と好中球に関しては更に精密な結果を得ることができた。即ち、Cx43^{+/-}マウスでは野生型と比べ、リアルタイム定量 PCR 法で内皮細胞では CXCR4, TLR, IFN γ , Cx43, CXCL2, TNF 等、好中球では TLR, TGF β , NGAL, TNF, IL1, IL6, これらは先行研究では報告されていない新たな知見であり、腎臓疾患の発症機序解明に対する我々の貢献といえるであろう。

また、我々は connexin 43 ノックアウトマウスの腎ホモジネートを用いて、リアルタイム定量 PCR 法による解析を行った。この解析により、過去に測定した遺伝子に加え、更に多くの遺伝子の発現変化を見出すことに成功した。

これらの結果から、connexin 43 は腎虚血再灌流における細胞レベルでの反応を調節する重要な分子であり、その機能の解明は疾患治療法の開発に対する新たな道筋を示している可能性がある。現在は得られた研究成果をまとめ、論文の執筆を進めており、近日中に科学論文誌への投稿を予定している。

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 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Prud'homme Mathilde, Coutrot Maxime, Michel Thibault, Boutin Louis, Genest Magali, Poirier Françoise, Launay Jean-Marie, Kane Bocar, Kinugasa Satoshi, Prakoura Niki, Vandermeersch Sophie, Cohen-Solal Alain, Delcayre Claude, Samuel Jane-Lise, Mehta Ravindra, Gayat Etienne, Mebazaa Alexandre, Legrand Matthieu et al. | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science | 6. 最初と最後の頁 717 ~ 732 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2019.06.005 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 東北医科薬科大学 内科学第三（腎臓内分泌内科）研究室ウェブサイト http://www.tohoku-mpu.ac.jp/medicine/lab/kidney/ |
|---|

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 | | |
|---------|----------------------------------|--|--|
| フランス | INSERM UMR S 1155, Hopital Tenon | | |