

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08685

研究課題名(和文) 腎間質線維化における血管内皮細胞Nrf2-Keap1系の役割の検討

研究課題名(英文) Exploration of the role of Keap1-Nrf2 signaling pathway in renal fibrosis

研究代表者

長田 太助 (Nagata, Daisuke)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40393194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスに2週間の片側尿管結紮(UUO)を施行しバルドキシロンメチルを投与したところ、対照と比べ線維化部分が軽減した。尿管・血管内皮特異的にNrf2を欠損したconditional knock outマウスを作成し(Pax8-Cre/flox-Nrf2, Tie2-Cre/flox-Nrf2)、UUOを作成したところ、peritubular capillaryの密度は対照マウスといずれも差を認めなかったが、Pax8-Cre/flox-Nrf2ではTie2-Cre/flox-Nrf2や対照と比べて有意に線維化が増加し、尿管のNrf2活性化に腎間質線維化抑制作用があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バルドキシロンメチルによりNrf2が活性化されると、腎間質線維化は抑制されることは以前の研究で明らかにされていたが、その機序の詳細や、腎臓のどの部位のNrf2の活性化が重要なのかは長期間不明のままであった。今回の研究で、それが尿管におけるNrf2の活性が重要であることが明確に示された。

研究成果の概要(英文)：Two-week unilateral tubular ligation (UUO) was performed on C57BL / 6 mice, and C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid (CDDO-Me), which has the effect of activating Nrf2, was administered. The fibrotic area was reduced when fibrosis was evaluated by Sirius red staining compared with the control. In this study, we generated conditional knock-out mice lacking Nrf2 in a tubular and endothelium-specific manner (Pax8-Cre / flox-Nrf2 and Tie2-Cre / flox-Nrf2, respectively). When a UUO model was created, the density of peritubular capillaries was not different from that of the control flox-Nrf2 mouse. However, Pax8-Cre / flox-Nrf2 mice significantly increased interstitial fibrosis compared to Tie2-Cre / flox-Nrf2 and flox-Nrf2 mice. When TGF- $\beta$  and collagen I were evaluated by real-time PCR, these expressions increased. These results suggest that renal tubular Nrf2 activation could suppress renal interstitial fibrosis.

研究分野：腎臓病学

キーワード：KEAP1-Nrf2系 腎間質線維化 バルドキシロンメチル Nrf2活性化 片側尿管結紮モデル

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病のステージが進行し、末期腎不全に至る際には、尿細管間質の線維化が重要である。傷害された尿細管細胞が放出する TGF などにより、線維化が増悪すると考えられている。BEAM study (N Engl J Med 2011; 365:327-336) により Bardoxolone methyl (CDDO-Me) が推定糸球体濾過率 (eGFR) を上昇させたことが報告されたが、CDDO-Me が NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 活性化を介して種々の抗酸化酵素の転写を上昇させることが知られているものの、その腎機能改善機序が解明されているとは言い難い。本研究を開始する前に、血管内皮における Nrf2 活性化が、anti-fibrotic factor の産生を増加させる可能性を探究するため、血管内皮特異的 Nrf2 knock out マウスを作成し、片側尿管結紮モデル(UUO)による間質線維化が対照マウスよりも増強するか検討することを計画した。その後、腎臓実質は圧倒的に尿細管・集合管のしめる体積が大きいので、血管内皮だけでなく、腎尿細管特異的な Nrf2 knock out マウスも追加で作成することにした。既存の Tie2-Cre マウスおよび Pax8-Cre マウスと交配して目的のマウス(それぞれ Tie2-Cre/flox-Nrf2、Pax8-Cre/flox-Nrf2) を得た後、UUO で間質線維化が増強するか検討し、血管内皮細胞および腎尿細管の Nrf2 活性化が、in vivo において抗線維化作用に重要であることを示すのが当初の目標となった。

## 2. 研究の目的

KEAP1-Nrf2 系の活性化により腎間質線維化が抑制されることを示すと同時に、腎臓のどの部位の Nrf2 活性化が腎間質線維化抑制に重要であるのかを明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### a. In vitro の検討

CDDO-Me 刺激が Nrf2 を介して anti-fibrotic factor の発現を増やすのかを確認し、その本体が何かを検討をした。CDDO-Me と対照として DMSO (溶媒) で over-night 刺激したヒト腎臓微小血管内皮細胞 (MVEC) の培養上清を遠心した後、上澄みを Cut-Off limit 3.5 kDa の透析カセット (Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO: Thermo Fisher Scientific) で透析して CDDO-Me を除き、さらに遠心式限外濾過フィルタ (Amicon Ultra 分画分子量 3 kDa: Millipore Merck) で容量を減じた後、それを NIH-3T3 細胞の培養液に混じり、TGF  $2.5\text{ng/mL}$  で 20hr 刺激した。CDDO-Me で MVEC を刺激した培養上清を用いた際、TGF で刺激による NIH-3T3 細胞の collagen I 1 発現増加が培養上清添加で抑制されるのかを real time PCR で確認した。数回この実験を繰り返したが、一定の傾向を得られなかったため、CDDO-Me の刺激によって血管内皮から anti-fibrotic factor の産生が有意に増加することはないであろうと結論した。もし差があった場合には、siRNA で Nrf2

を knock down して、CDD0-Me の効果の依存性を示し、さらに CDD0-Me 刺激によって scramble siRNA 処理の血管内皮で増加した transcript のうち、Nrf2 knock down では増加しなかったものを DNA microarray で選択し、real time PCR で結果を確認する予定としていたが、これは実施しなかった。

#### b. In vivo の検討

創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援の下、群馬大学畑田教授(本学学外教授)の研究室で、Nfe2l2 (Nrf2) 遺伝子の Exon5 を挟み込むように flox 配列を挿入した遺伝子改変マウスを作成していただいた。既存の Tie2-Cre マウスおよび Pax8 マウスと交配して、目的の Tie2-Cre/flox-Nrf2 マウス、尿管特異的 Pax8-Cre/flox-Nrf2 マウスを作出した。

最初に野生型の C57BL/6 マウスに 2 週間の片側尿管結紮: Unilateral Ureter Obstruction (UUO) を施行し、Nrf2 を活性化する作用のある C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid (Bardoxolone methyl: CDD0-Me) を投与し、対照と線維化部分の面積を比較した。また Pax8-Cre/flox-Nrf2、Tie2-Cre/flox-Nrf2 に対して UUO モデルを作成し、peritubular capillary の密度、間質線維化部分の面積を比較した。さらに real-time PCR 法を用いて TGF- $\beta$ 1, collagen  $\alpha$ 1(I), aSMA の発現を評価する。

#### 4. 研究成果

CDD0-Me で MVEC を刺激した培養上清は対照の DMSO と比べると、TGF- $\beta$ 1 で刺激した NIH-3T3 細胞の collagen I  $\alpha$ 1 の転写を抑制することもあったが、数回繰り返すとかえって増加させることもあり、血管内皮細胞から anti-fibrotic factor が産生されるかを今回の系で示すのは難しいと判断し、microarray の実験は試行せず、直接 in vivo の系に移行した。

C57BL/6 マウスに 2 週間の UUO モデルを作成し、CDD0-Me を投与したところ、対照と比べ Sirius red 染色で評価した線維化部分が軽減していた。また我々は本研究において尿管特異的、血管内皮特異的に Nrf2 を欠損した conditional knock out マウスを作出したので(それぞれ Pax8-Cre/flox-Nrf2、Tie2-Cre/flox-Nrf2)、それらに対して UUO モデルを作成した。peritubular capillary の密度は、対照である flox-Nrf2 マウスといずれも差を認めなかった。しかし Pax8-Cre/flox-Nrf2 マウスでは Tie2-Cre/flox-Nrf2 や flox-Nrf2 マウスと比べて有意に間質線維化が増加した。また real-time PCR で transcript を評価した結果、Pax8-Cre/flox-Nrf2 マウスでは TGF- $\beta$ 1, collagen  $\alpha$ 1(I), aSMA の発現が上昇傾向であった。これらの結果より、尿管の Nrf2 活性化には腎間質線維化を抑制する作用があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菱田英里華、長田太助
2. 発表標題 尿細管・血管内皮Nrf2欠損が腎間質線維化に及ぼす影響についての検討
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学腎臓内科学部門ホームページ <a href="https://www.jichi.ac.jp/nephrol/">https://www.jichi.ac.jp/nephrol/</a>
--

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
研究 分 担 者	前嶋 明人  (Maeshima Akito)  (70431707)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	削除：2021年6月28日

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