

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08734

研究課題名(和文) 実験的腎障害モデルを用いた腎臓病進展因子の解明～IL-34とその関連因子の役割

研究課題名(英文) Role of interleukin-34 in the development of experimental kidney disease models

研究代表者

和田 幸寛 (Wada, Yukihiro)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10465172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ(Mφ)増殖因子IL-34の腎障害への影響は十分検討されていなかったが、シスプラチン腎症(CP-N)と片側尿管結紮(UUO)のモデルマウスにおいて、IL-34は障害後の尿細管上皮(TEC)で高発現し、その受容体(cFMSとPTP-)も障害腎組織で発現亢進していた。また、抗IL-34中和抗体を両モデルに投与すると、腎のMφ浸潤は軽減しTECアポトーシスと腎線維化が有意に抑制された。更に培養TECでも、CP及びTGF- β 刺激後に抗IL-34抗体で処置すると、ERKリン酸化亢進が抑制されTEC障害も改善した。以上より、IL-34は腎障害増悪に関与し治療標的とな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

本研究成果により、IL-34が尿細管上皮細胞障害や腎の線維化に関与し、それらの増悪因子であることが示された。更に、IL-34を阻害することで急性腎障害や腎線維化の増悪が抑制されることも示された。尿細管上皮細胞障害は急性腎障害の主たる要因であり、腎線維化はすべての腎疾患の終末像とされている。よって、これら急性期から慢性期に及ぶ腎障害の本質的な病態に対しIL-34の関与やそれが治療標的となることを解明できた点は、今後増加することが予想されている腎臓病患者の病態と治療戦略への理解を深める上で、重要な知見になりえたと考えられ、学術的及び社会的な意義の高い検討であったと考える。

研究成果の概要(英文)：Thus far, the influence of interleukin-34 (IL-34), identified as macrophage (Mφ) mediator, on renal disorder remained to be fully elucidated. In this study using cisplatin induced nephrotoxicity (CP-N) and unilateral ureteral obstruction (UUO) model mice, significant elevation of IL-34 and its two receptors, cFMS and PTP-z, were determined on damaged tubular epithelial cells (TECs). Moreover, we administrated the anti-IL-34 neutralizing antibody to CP-N or UUO model mice, followed by apparent improvement of TECs apoptosis or renal fibrosis with significant reduction of Mφ infiltration in damaged renal tissues. Additionally, in the experiment with cultured mice TECs, treatment with anti-IL-34 Ab significantly inhibited CP or TGF- β induced expressions of apoptosis regulatory molecules, fibrogenetic genes, and ERK phosphorylation.

Take together, IL-34 might be involved in the pathogenesis of renal damage, and IL-34 inhibition with neutralizing antibody might have therapeutic potential.

研究分野：腎臓病全般、糸球体腎炎、ネフローゼ、腎と免疫

キーワード：Interleukin-34 マクロファージ 抗IL-34抗体 尿細管アポトーシス 腎線維化

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (AKI) や慢性腎臓病 (CKD) の発症から進展・転帰までを考える際、腎局所並びに全身性の免疫・炎症は重要であり、その中でマクロファージ (M ϕ) は炎症促進系 (M1M ϕ) や免疫抑制系 (M2M ϕ) に分化して腎予後に深く関与している [Ricardo SD et al. J Clin Invest 2008]。しかし、M ϕ の増殖・分化を調整する因子や腎疾患での M ϕ の分化様式、M ϕ が腎予後を規定する詳細な機序など、未だ不明な部分も多く残されている。

Interleukin-34 (IL-34) は 2 量体を形成して存在するサイトカインで、既知の M ϕ の増殖因子 Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) の受容体 c-FMS に共結合する新規リガンドとして 2008 年に同定された。申請者らの過去の報告では、IL-34 も CSF-1 同様、傷害された TEC より分泌され、M ϕ の増殖・分化を調整する因子であることが明らかにされている [Baek JH et al. J Clin Invest 2015]。興味深いことに、IL-34 は CSF-1 と比較し M ϕ や TEC 上に発現する c-FMS への親和性が 7 倍高く、c-FMS とは別に TEC や B 細胞などに発現する Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ (PTP- ζ) にも結合して、細胞の増殖や遊走などにも関与するため [Nandi S et al. J Biol Chem 2013]、CSF-1 とは異なる作用を持つ可能性がある。

腎臓病の進展と CSF-1 との関連を検討した報告は多数あり、特殊な環境を除いて、腎臓病下で分泌された CSF-1 は M2M ϕ を増殖させて腎保護作用を発揮することが示されている。一方、IL-34 と腎疾患に関する報告は乏しいものの、申請者らの既報では、C57BL/6 (B6) マウスに I/R を加えた AKI モデルでは、IL-34 の発現が障害 TEC で経時的に亢進し、腎臓に局在・浸潤する M ϕ の増殖を促して腎障害を増悪させた [Baek JH et al. J Clin Invest 2015]。同様にループス腎炎 (LN) を自然発症する MRL-Fas^{lpr} マウスでも、IL-34 や IL-34 の受容体の発現が LN 発症前に比べ進行期で有意に亢進していた。更に IL-34 を遺伝的に欠損 (KO) させた MRL-Fas^{lpr} マウスと野生型を比較すると、M ϕ の増殖が KO 群で有意に抑制され、腎炎の進行も抑制されていたことから [Wada Y et al. J Am Soc Nephrol 2019]、IL-34 とその関連因子は腎臓病の進展機序に深く関与していると考えられる。

しかし上述の検討では、IL-34 による M ϕ の増殖が腎固有細胞を傷害させた詳細な機序が不明のままである。また、MRL-Fas^{lpr} マウスは腎炎の発症時期や重症度がやや hetero であり、腎障害の比較検討モデルとしては若干の問題を抱えている。同様に、I/R 後の AKI も手術手技や使用器具、飼育環境などで腎障害の程度が変動することがあり、2015 年の米国腎臓学会シンポジウムでも、I/R モデルで得られた実験結果の再現性が疑問視された。よって、IL-34 と腎臓病に関するエビデンスを蓄積し確立するためには、I/R や LN モデルだけでなく、より多くの腎臓病モデルでの詳細な検討が必要である。

2. 研究の目的

既報とは異なるモデルマウス (Cisplatin 腎症 (CP-N) による AKI モデルと片側尿管結紮 (UUO) による腎線維化・CKD モデル) を用い、IL-34 の発現様式は傷害を反映する指標となるか? IL-34 の TEC への直接作用は? IL-34 に調整される M ϕ はどのような増殖と分化を示すか? IL-34 で増殖した M ϕ はアポトーシスや線維化を誘導して腎固有細胞を傷害させるか? IL-34 の発現を抑制することは実験的腎障害モデルの転帰にどのような影響を与えるか? などの検討課題に焦点を当て、IL-34 の腎疾患進展上の役割やバイオマーカー・治療標的としての可能性について明らかにする。

3. 研究の方法

CP-N による AKI モデルと UUO による腎線維化 (CKD) モデルを作成後、無治療群、抗 IL-34 抗体投与群に振り分け、治療効果を比較検討する。また培養マウス TEC を CP や TGF- β で刺激後に抗 IL-34 抗体で処置して、TEC の Apoptosis や線維化抑制効果、M ϕ 分画などを評価する。

(1) *in vivo* の実験プロトコール

CP-N に関しては、16 匹の B6 マウス (7 W, ♂) に 8 時間の絶飲食を課し、CP (25 mg/kg, sigma) を腹腔内投与 (i.p.) して、72 時間後に CP-N を誘発させる (Day 0)。その後、Vehicle 群 (CP-N+V 群, n=8)、anti-mouse IL-34 Antibody (anti-IL-34 Ab) (R&D system, 400 ng/kg/BW i.p.) 治療群 (CP-N+anti-IL-34 Ab 群, n=8) に振り分ける。更に同週齢の normal control (NC) 群 (n=3) も置く。治療は Day -1 から 2 まで連日 1 回 i.p. にて施行する。Day 3 にペントバルビタール過量投与 (100 mg/kg, 2.0 ~ 2.5 mg/匹, 29G 針で ip) にて安楽死させ、血液及び両側腎臓を採取し、治療効果を比較する。

UUO は、16 匹の B6 マウス (12 W, ♂) に右側尿管結紮術を施し (Day 0)、Vehicle 群 (UUO+V 群, n=8)、anti-IL-34 Ab 治療群 (UUO+anti-IL-34 Ab 群, n=8, 400 ng/kg/BW i.p.) に振り分け、同週齢の NC 群 (n=4) も置く。治療は Day 0 から 9 まで連日 i.p. で施行する。最終的に Day 10 で上記同様に安楽死させ、右側腎臓を採取し、効果を比較検討する。

(2) *in vitro* の実験プロトコール

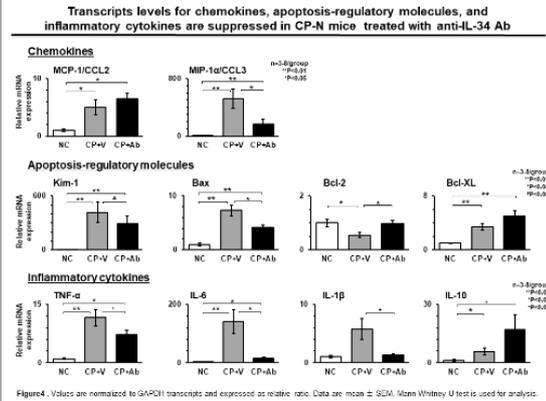
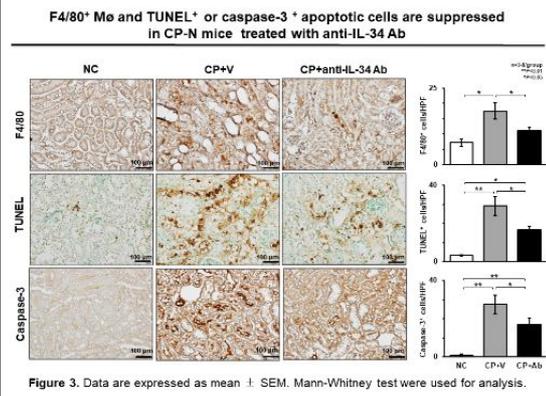
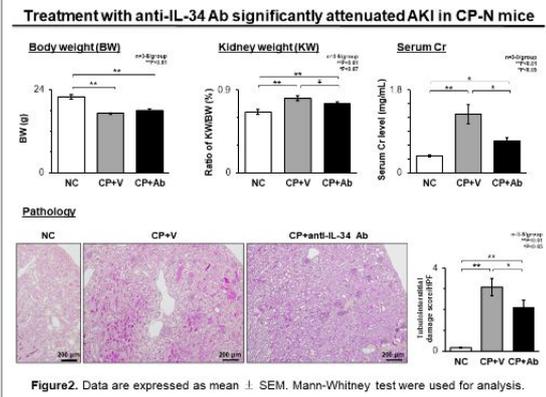
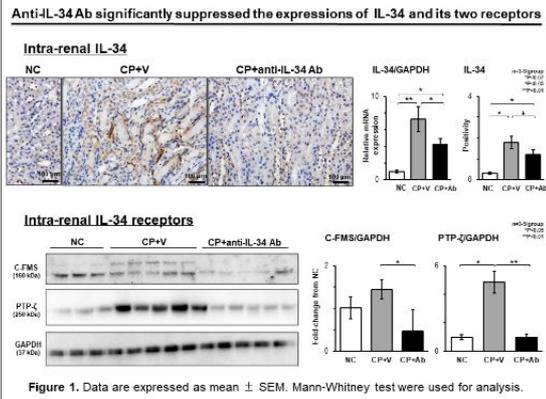
Mouse TEC (MRTEpiC) [ScienCell Research]を培養し CP (2 mg/mL) または TGF-β (5 ng/mL) で刺激後に抗 mouse IL-34 抗体 (R&D system, 1000pg/mL) で処置して、MRTEpiC の細胞障害度、アポトーシスの程度や線維化関連因子の発現度などを各群で比較する。また、IL-34 の生理活性を確認するためにマウス Mφ (RAW264.7) [DS pharma biomedical]も培養し、RAW264.7 の増殖度を MTT assay で評価する。

4. 研究成果

(1) CP-N モデルマウスにおける IL-34 の発現と抗 IL-34 中和抗体の治療効果について

CP-N+V 群では、PAS 染色による腎病理像で尿細管管腔に多数の硝子円柱を伴う重度の TEC 障害が認められ、血清クレアチニン (sCr) 値の上昇を伴う AKI が高度であった。また、qPCR 法で評価した腎の IL-34 mRNA の発現は NC 群と比較して CP-N+V 群で有意に亢進しており、酵素抗体法による immunohistochemistry (IHC) でも IL-34 の高度発現が障害 TECs で確認された。同様に、IL-34 の 2 つの受容体 (c-FMS と PTP-ζ) の mRNA と Western blotting (WB) による蛋白レベルの発現も CP-N 群の腎組織で有意に亢進していた。更に、ELISA 法で評価された血中 IL-34 レベルも CP-N+V 群で有意に上昇していた (Figure 1, 2)。これら CP-N による AKI と CP-N に伴う腎の IL-34 及びその受容体の発現亢進は、抗 IL-34 中和抗体投与により有意に抑制され、CP-N による血中 IL-34 値の上昇も、CP-N+anti-IL-34 Ab 群で有意に抑制されていた (Figure 1, 2)。尚、CP-N+anti-IL-34 Ab 群では vehicle 群と比べ、実験経過中のマウスの死亡例や高度体重減少などは見られず、抗 IL-34 中和抗体による有害事象を認めなかった。以上から、CP-N による AKI の過程には、IL-34 の発現が関連し、中和抗体による IL-34 の阻害が腎障害を軽減させることが考えられた。

抗 IL-34 中和抗体による AKI 改善のメカニズムを検証すべく、CP-N の進展機序の key とされる TEC アポトーシスと障害腎組織の Mφ 浸潤、障害腎組織における炎症性サイトカインの発現 (Paba N. *Kidney Int* 2008) に着目し、それらの関与を IHC と qPCR 法などにより評価した。NC 群と比較して CP-N+V 群では、IHC による腎の F4/80 陽性 Mφ の浸潤細胞や、TEC での TUNEL 及び caspase-3 陽性細胞数が有意に増加しており、CP-N+anti-IL-34 Ab 群で有意に抑制されていた (Figure 3)。また、腎のケモカイン (MIP-1α/CCL3)、腎障害関連マーカー (KIM-1)、炎症性サイトカイン (TNF-α, IL-6, IL-1β)、apoptosis 関連因子 (Bax) などの mRNA の発現も CP-N+V 群では NC 群と比較して有意に亢進しており、抗 IL-34 中和抗体の投与でそれらの発現が有意に抑制されていた (Figure 4)。更に、我々は IL-34 と受容体 c-FMS を共有し、IL-34 同様に Mφ の増殖因子である CSF-1 にも着目したが、腎の CSF-1 の発現は vehicle と中和抗体治療群に有意差はなく、中和抗体による IL-34 の阻害が、別の Mφ の増殖因子 CSF-1 の発現に影響しないことを確認した。以上から、IL-34 が CP-N による腎の Mφ 浸潤、炎症性サイトカインの上昇、TEC アポトーシス促進に関与し、中和抗体による IL-34 の阻害がそれら CP-N の障害増幅因子を抑制して AKI を改善させる可能性が考えられた。既報では、Mφ の浸潤は炎症性サイトカイン上昇と関連するだけでなく、局所で増殖した Mφ が TEC のアポトーシスを誘導することも報告されている [[Baek JH et al. J



Clin Invest 2015; Wada Y et al. J Am Soc Nephrol 2019]. よって、IL-34 signaling を介した M ϕ 浸潤・増殖が局所の炎症を増幅させただけでなく、CP-N による TEC アポトーシスとその後の AKI 増幅にも関与している可能性があり、IL-34 が CP-N による AKI の進展・増悪因子である可能性が考えられた。

M ϕ 浸潤・増殖が CP-N による AKI に重要であることが示されたため、障害腎組織に浸潤している M ϕ の極性を FACS にて評価した。CP-N を誘導したマウス腎組織を染色し、CD11b と F4/80 で gating した後に、TNF- α と IL-10 で gating して、それぞれの陽性細胞を M1 like または M2 like の M ϕ と見立てて評価した (Iwata Y et al. J Immunol 2012)。CP-N+V 群の腎組織では F4/80⁺TNF- α ⁺ の M1 like M ϕ が増加し、CP-N+anti-IL-34 Ab 群ではそれらが軽減していた (Figure 5)。以上から、細胞傷害性のある M1 like の M ϕ が CP-N +V 群で増加しており、中和抗体による IL-34 の阻害でそれら M1 like の M ϕ の浸潤が制御され TECs 傷害が軽減された可能性が考えられた。

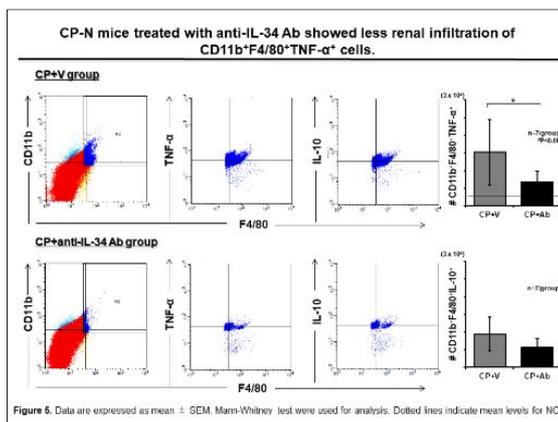


Figure 5. Data are expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test were used for analysis. Dotted lines indicate mean levels for NC.

(2) CP 刺激後 MEPTEpiC における IL-34 の発現とその autocrine 効果について

CP による TEC アポトーシスと IL-34 との関係を詳細に解析するために MRPEpiC を用いた *in vitro* での検討を施行した。培養後の MRPEpiC を CP (2 μ g/mL) で刺激し、0, 6, 12, 24 時間後の IL-34 の mRNA の発現を qPCR で確認したところ、MRPEpiC では CP 刺激後経時的に傷害マーカーである Kim-1 の発現が上昇し、その発現と同様に IL-34 transcript levels の発現も経時的に亢進していた。また、CP 刺激後 MRPEpiC の培養上清中の IL-34 蛋白レベルの発現も ELISA 法で確認したところ、刺激後 12 及び 24 時間の時点で IL-34 の蛋白レベルの発現も確認できた。更に、IL-34 の 2 つの受容体 c-FMS と PTP- にしても、CP 刺激後の MRPEpiC で両者の mRNA 発現が軽度亢進し、WB でも MRPEpiC 上の両受容体の蛋白レベルの軽度発現が確認できた。

尚、CP 刺激後の MRPEpiC の培養上清をマウス RAW264.7 に投与して培養すると、MTT にて RAW264.7 の増殖が確認され、その上清に抗 IL-34 中和抗体を追加投与して培養すると、RAW264.7 の増殖は抑制された。このことから、障害された MRPEpiC 由来の IL-34 は既報通りの生理活性を持ち、中和抗体も IL-34 を適切に阻害する作用を有することが確認できた。

以上の知見から、IL-34 は障害 TEC から分泌され、その受容体も障害 TEC に発現することが考えられたため、IL-34 自身の TEC 障害に対する autocrine 効果が想定された。そこで、CP で MRPEpiC を刺激後に抗 IL-34 中和抗体 (1000 μ g/mL) で処理し 24 時間後の TEC 障害とアポトーシスの程度を LDH assay と caspase-3 及び Bax の発現にて評価した。結果、抗 IL-34 中和抗体投与群で 24 時間後の MRPEpiC 細胞傷害の軽減が LDH assay で確認され、Bax の mRNA 及び蛋白レベルの発現も IL-34 中和抗体処置にて軽減していた (Figure 6)。

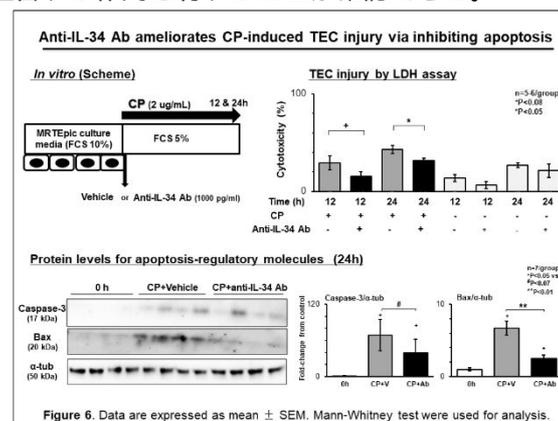


Figure 6. Data are expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test were used for analysis.

更に、我々は CP-N による TEC のアポトーシスには ERK や AKT のリン酸化が関与する事 [Pabla and Dong Z. Kidney Int 2008]、IL-34 が受容体 c-FMS や PTP- などの受容体に結合後に ERK や AKT のリン酸化亢進を介して細胞死を誘導した基礎研究結果 (Sonia B et al. Scientific Report 2018; Nandi S. Journal Bio Chem 2013) に着目し、CP-N 刺激後 MRPEpiC での ERK 及び Akt のリン酸を WB で評価した。CP 刺激後比較的早期の時相 (4h) で MRPEpiC の ERK リン酸化は亢進しており、抗 IL-34 中和抗体処置でそのリン酸化が有意に軽減していた (Figure 7)。同様な結果・傾向は CP-N モデルマウスの腎組織でも確認できた。尚、Akt signaling に関しては想定に反して、その signaling の有無や IL-34 の影響を確認できなかった。以上から、CP 刺激による障害尿管上皮から分泌された IL-34 は自身の autocrine 効果により ERK リン酸化を介して TEC アポトーシスを促進させていた可能性があり、IL-34 中和抗体をそれを是正した可能性が考えられた。

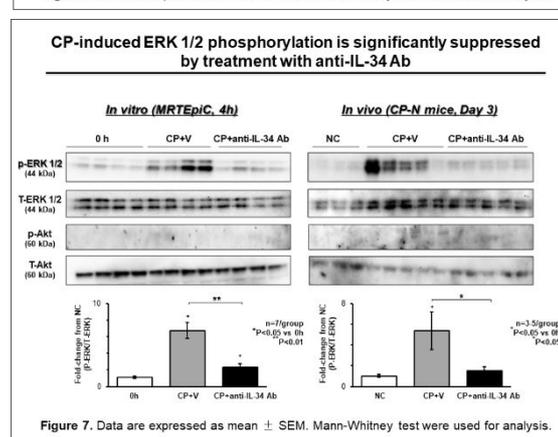
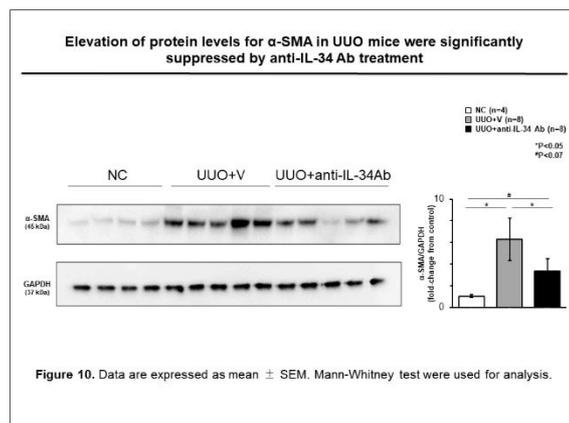
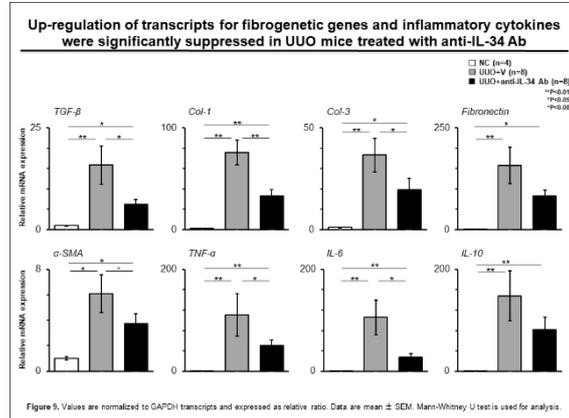
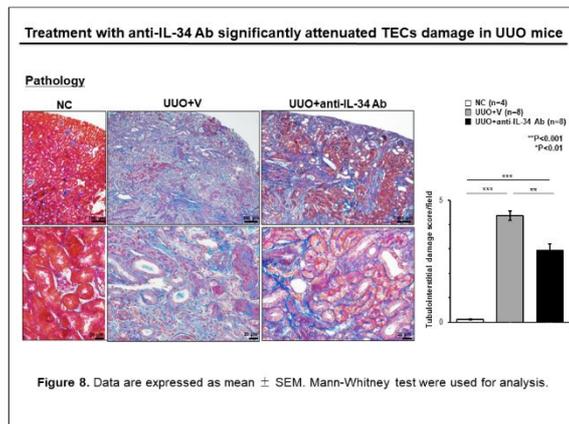


Figure 7. Data are expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test were used for analysis.

(3) UUO モデルマウスにおける IL-34 の発現と抗 IL-34 中和抗体の治療効果について

UUO モデルにおいて、IL-34 の発現と IL-34 の中和抗体による腎線維化抑制効果を検証した。UUO 後 Day 10 における Masson 染色での腎病理像については、NC 群と比較し UUO+V 群で有意に尿細管障害が高度で、Masson 陽性の腎線維化領域が UUO+V 群で高度に拡大していた (Figure 8)。腎線維化の程度は Sirius red 染色でも評価し、Sirius red 陽性の腎線維化領域は UUO+V 群で有意に亢進していた。また、UUO 後 Day 10 での腎の IL-34 の発現を qPCR と IHC にて評価したところ、UUO 後の腎組織で IL-34 の mRNA の発現が NC 群と比較して有意に亢進しており、障害 TEC 上で IL-34 の高発現が確認された。同様に、IL-34 の受容体である c-FMS と PTP- の mRNA の発現も UUO 後の腎組織で亢進しており、WB による両受容体の蛋白レベル発現も NC 群と比較して UUO+V 群で有意に亢進していた。尚、TGF- β (5 ng/mL) 刺激後の MRTEpiC においても、IL-34 の mRNA 発現が刺激後経時的に亢進し、受容体 c-FMS と PTP- の mRNA 発現も刺激後に亢進していた。一方、UUO+anti-IL-34 Ab 治療群では、UUO+V 群で増悪していた腎病理像や線維化、Sirius red 陽性領域が有意に軽減していた (Figure 8)。また、抗 IL-34 中和抗体処置により UUO 誘導後の腎組織で IL-34 の mRNA 発現と TEC 上の IL-34 蛋白レベルの発現、c-FMS と PTP- の mRNA 及び蛋白レベルの発現が有意に軽減していた。以上から、UUO モデルマウスにおいても IL-34 は高発現し、腎線維化との関連が示唆された。また中和抗体による IL-34 の阻害が IL-34 自身とその受容体の発現を軽減させて腎線維化を抑制していたことから、IL-34 が急性腎障害と同様に腎線維化モデルにおいても治療標的となる可能性が示唆された。

次に、我々は UUO モデルの腎組織における M ϕ の浸潤の程度と炎症性サイトカイン、線維化マーカーなどの発現を IHC と qPCR で評価した。NC 群と比較し UUO+V 群では、F4/80 陽性 M ϕ の腎の浸潤が有意に亢進し、ケモカイン (MCP-1, MIP-1 α)、炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-10)、線維化マーカー (TGF- β , Col-1, Co-3) などの transcript levels も有意に亢進していた (Figure 9)。UUO+anti-IL-34 Ab 群では、これら M ϕ の浸潤と炎症性サイトカインやケモカイン、線維化関連マーカーの mRNA の発現が有意に軽減していた。更に、腎線維化の key で線維化促進と密接に関連しているとされる α -SMA [Matsumoto K et al. Stem Cells Transl Med 2017] についても評価したところ、腎の α -SMA の mRNA 及び蛋白レベルの発現は UUO+V 群で有意に亢進し、抗体投与で有意に抑制されてた (Figure 10)。以上から、IL-34 は UUO モデルで発現亢進し、M ϕ の浸潤促進と炎症性サイトカインや線維化促進因子の増幅と連動しており、抗体投与による IL-34 の阻害がそれらを制御して腎線維化抑制に寄与する可能性が考えられた。



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 Yukihiro Wada	4. 巻 16 (1)
2. 論文標題 Reno-protective effect of IL-34 inhibition on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0245340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0245340	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 和田 幸寛
2. 発表標題 Interleukin-34 (IL-34) の阻害による片側尿管結紮マウスでの腎線維化抑制効果
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukihiro Wada
2. 発表標題 Renoprotective effect of IL-34 inhibition on cisplatin-induced nephrotoxicity in mouse.
3. 学会等名 57th Congress of European Renal Association-European Dialysis Transplant Association 2020 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田 幸寛
2. 発表標題 Interleukin-34 (IL-34) の阻害によるマウスCisplatin腎症進展抑制効果
3. 学会等名 第23回腎間質障害研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 幸寛
2. 発表標題 抗IL-34抗体によるマウスCisplatin腎症進展抑制効果
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukihiro Wada
2. 発表標題 Renoprotective effect of IL-34 inhibition on cisplatin-induced nephrotoxicity in mouse.
3. 学会等名 52th Annual Meeting, American Society of Nephrology, Kidney Week 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukihiro Wada
2. 発表標題 Expression of IL-34 is involved in tubular injury in cultured mouse renal proximal tubular epithelial cells via phosphorylation of ERK1/2.
3. 学会等名 56th Congress of European Renal Association-European Dialysis Transplant Association 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
---------	---------