

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K17739
研究課題名(和文)腎疾患におけるナトリウム利尿ペプチド系-p38MAPKのクロストークに関する研究

研究課題名(英文)Exploring natriuretic peptide system-p38MAPK crosstalk in kidney injury

研究代表者
森 慶太(MORI, Keita P.)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00769507
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)：本研究ではナトリウム利尿ペプチドシグナルの下流で腎障害的に働きうるp38 MAPK (p38)と、腎障害時に腎で著明に発現亢進するCNPやその受容体のNpr2に着目し、これらの腎線維化での意義およびクロストークを明らかにすることを目標とした。近位尿細管およびマクロファージ特異的なp38欠損マウス(cKO)を作出し、UUOや虚血再還流モデルを作製したが、有意な変化を認めなかった。全身薬剤誘導性Npr2欠損マウス(Npr2-cKO)を作出し、腎Npr2のmRNA発現を7割抑制することに成功したが、UUOでの有意な変化を認めなかった。p38とNpr2のダブルcKOの作出も試みたが、成功しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究室では、p38がナトリウム利尿ペプチドシグナルの一つであるBNPとその受容体のNpr1(GC-A)の下流で腎系球体の障害に寄与していることを報告してきた。一方で、腎尿細管・間質におけるナトリウム利尿ペプチドの意義は十分明らかになっていない。腎障害時ではナトリウム利尿ペプチドの一つであるCNPやその受容体のNpr2(GC-B)の発現が著明に亢進することに着目し、これらの腎線維化での意義およびp38とのクロストークを明らかにすることを目標とした。しかし、p38の近位尿細管や炎症細胞の一つのマクロファージにおける欠失や、Npr2の腎を含めた全身の欠失による腎線維化への影響は見いだせなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on p38 MAPK (p38), which can act downstream of natriuretic peptide signaling in kidney injury, and CNP and its receptor Npr2, which are markedly upregulated in the kidney during renal injury, and aimed to clarify their significance and cross-talk in renal fibrosis.

We generated proximal tubule- and macrophage-specific p38-knockout (cKO) mice and induced UUO and ischemia-reflux models, but found no significant changes. Systemic drug-inducible Npr2-knockout mice (Npr2-cKO) were generated and renal Npr2 mRNA expression in these mice was successfully suppressed by almost 70%, but no significant changes were observed in UUO. Generation of double cKO of p38 and Npr2 was also attempted but not succeeded.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓 ナトリウム利尿ペプチド p38 MAPK

1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ペプチド系は降圧・利尿・骨伸長作用などの多様な作用を有し、腎臓はその作用の主要臓器の一つである。ANP・BNP/GC-A(Npr1)系が種々の腎障害に対し保護的に作用することが報告されているのに対し、CNP/GC-B系(Npr2)の腎障害における作用については報告が少ない。申請者は障害腎におけるCNP発現亢進を確認しており(未発表データ)さらにリコンビナントCNP投与が腎障害に対し保護的であること(Hu et al. Lab Invest 2015, Kimura et al. Cancer Chemother Pharmacol 2015)が報告されていることから、腎CNP/GC-Bが腎障害において生理作用を発揮している可能性が示唆されている。しかし、CNP/GC-B系に関しては遺伝子改変動物による検討は今までに報告がなかった。さらに、p38MAPKは種々のストレスにより活性化し炎症やアポトーシスを誘導する細胞内シグナル伝達物質であるが、近年ナトリウム利尿ペプチド系の制御を受けることが注目されている。p38は発現解析や薬理的な検討(p38阻害薬投与)により、半月体形成性腎炎モデル(Wada et al. J Am Soc Nephrol 2000)、糖尿病性腎症モデル(Adhikary et al. Diabetologia 2004)、片側尿管結紮線維化モデル(Stambe, et al. J Am Soc Nephrol 2004)、ネフローゼ症候群モデル(Koshikawa, et al. J Am Soc Nephrol 2005)、アルドステロン負荷系球体障害モデル(Ogawa et al. J Am Soc Nephrol 2012, Kato, Mori et al. Sci Rep 2017)など複数の動物モデルにおいて腎障害促進的であることが申請者の研究室を含め複数報告されている。一方、全身性p38ヘテロノックアウトマウスは加齢により腎障害を自然発症することが報告されており(Maruyama, et al. J Recept Signal Transduct Res 2003)、p38の腎障害における意義については結論が出ていない。また、申請者の研究室では、GC-A欠失が糸球体足細胞のp38の過剰な活性化を介して糸球体障害を促進することを報告している(Ogawa et al. J Am Soc Nephrol 2012, Kato, Mori et al. Sci Rep 2017)。しかし、腎構成細胞の大半を占める尿細管細胞におけるp38の役割とくにナトリウム利尿ペプチド系とのクロストークについては未知であった。

2. 研究の目的

本研究では1)腎臓特異的GC-B(Npr2)コンディショナルノックアウトマウスを作製し、腎障害におけるCNP/GC-Bの作用を検討すること、また2)尿細管特異的もしくは薬剤誘導性全身性p38MAPKコンディショナルノックアウトマウスを作製し、腎障害におけるp38MAPKの作用を検討することを計画し、腎臓におけるナトリウム利尿ペプチド系とp38MAPKとのクロストークの解明を目指した。

3. 研究の方法

- 1) GC-B(Npr2)は血管含め、比較的ユビキタスに全身に発現しているとされている。GC-Bの全身ノックアウトマウスは性腺異常や骨格筋発生異常などを呈し、正常な成獣とならない。そこで、腎臓においては主要構成細胞の一つである近位尿細管に着目して、近位尿細管特異的にノックアウトすることを目指した。その目的のために、Npr2-floxマウス(Nakao, et al. Sci Rep 2015)とNdr g1-CreERT2(Endo, et al. J Pathol 2015)を交配し、タモキシフェン誘導性近位尿細管特異的GC-B(Npr2)コンディショナルノックアウトマウス(GC-B-cKO)を作出することとした。この成獣マウスにタモキシフェンを投与した後に、片側尿管結紮(UUO)線維化モデルを作製し、GC-B欠失の効果を見ることとした。
- 2) p38MAPKの全身性ノックアウトは胎児致死となるため、薬剤誘導性全身性ノック

クアウトまたは腎臓、炎症細胞特異的なコンディショナルノックアウトを作出することとした。Mapk14 (p38) - floxマウス(Ventura, et al. Nat Genet 2007)とRosa26 - CreERT2、Ndr g1 - CreERT2、LysM - Creマウスをそれぞれ交配し、上記マウスを作出した。この成獣マウスに、UUO、アデニン食負荷モデル、虚血再還流 (IRI) 急性腎障害モデル、シスプラチン投与急性腎障害モデルを作製し、p38欠失の効果を見ることとした。さらに、その表現型を確認した後、GC - Bとのダブルノックアウトマウスの作出を計画することとした。

4. 研究成果

- 1) GC - B - c KOに関しては、計画の交配にて作出に成功し、成獣マウスにタモキシフェンを投与することで、腎Npr2 mRNAの発現抑制を確認した。蛋白レベルでの評価を試みたが、市販抗体ではウェスタンブロットによる評価や免疫染色がワークせず、評価困難であった。UUOを行うと、UUO腎ではGC - BやそのリガンドのCNPの発現が亢進することを確認したため、GC - B - c KOにUUOを誘導することとした。このマウスの線維化や炎症に関わるmRNA発現はコントロールマウスと有意な変化を認めなかった。さらに、GC - B - c KOでの検討を進めることを計画したが、産仔がなかなか入手されない上に、COVID - 19による一時的な動物飼育施設の使用制限がかかったため、一度凍結胚として実験の中断を余儀なくされた。再度、マウスを産出したが、やはり交配に時間を要し、上記以上の検討を進めることが難しかった。
- 2) GC - B - c KOマウスの作出に時間を要したため、平行してp38のコンディショナルノックアウトの検討を進めることとした。まず、全身性c KOマウスとして、Mapk14 - floxとRosa26 - CreERT2との交配にも成功し、タモキシフェン未投与下では正常に産出・成長することを確認した。タモキシフェンの投与により、mRNA および蛋白レベルで発現が抑制されることをRT - PCRおよびウェスタンブロットにより確認した。興味深いことに、c KOは非腎障害の状態でも貧血および体重減少がタモキシフェン投与後徐々に進行することを確認、既報のように造血細胞の増殖・維持に参与している可能性が示唆された。しかし、体重減少による腎障害への影響を懸念し、近位尿細管特異的c KOの解析を優先することとした。Mapk14 - floxとNdr g1 - CreERT2との交配は成功し、タモキシフェン投与によりmRNA および蛋白レベルで発現が抑制されることをRT - PCRおよびウェスタンブロットにより確認した。さらに、蛍光免疫染色より、p38のリン酸化は非障害腎では集合管、片側尿管結紮や虚血再還流などの障害腎では集合管に加え近位尿細管に認められることを確認し、c KOマウスではリン酸化が抑制されていることを確認した。著明な腎p38のリン酸化を認める線維化モデルとして、UUOモデルやアデニン食負荷モデルを検討したが、c KOの線維化などの組織的腎障害はコントロールと比べて変化が認められなかった。また、急性腎障害モデルとして、IRIやシスプラチン投与モデルを検討したが、虚血再還流のday3では腎障害、腎機能悪化が抑制されている傾向を確認したのみで、有意差は認められなかった。以上より、近位尿細管でのp38のリン酸化は腎障害への寄与が少ない可能性が示唆され、腎障害促進的に働きうるp38は近位尿細管以外の細胞で寄与が大きいと予想された。UUOおよびアデニン食負荷モデルでは、p38のリン酸化は間質でも多数認められ、特にマクロファージマーカーのF4/80との共局在が多数認められた。すなわち、腎障害で認められる浸潤マクロファージ(M ϕ)にて、p38が病的機能を発揮しているという可能性が示唆された。そこで、Mapk14 - floxとLysM - Creを交配し、M ϕ 特異的p38コンディショナルノックアウトマウスを作出した。このマウスに、UUOやIRIモデルを作製し、腎機能や、腎障害・線維化・炎症性遺伝子のmRNA発現を検討したが、コントロールと有意な変化を認めなかった。これらの結果より、腎障害におけるp38のリン酸化の寄与は近位尿細管、マクロファージ以外の細胞である可能性、あるいは特定の細胞ではなく、複数の細胞でのp38のリン酸化が関与している可能性が考えられた。
- 3) 最後に、p38とGC - Bのクロストークを評価するために、p38とGC - Bのダブルコンディショナルノックアウトマウスの作出も試みたが、成功しなかった。前述のように、GC - B単独ノックアウトマウスの産仔がなかなか得られないことに加え、Mapk14 - floxとNpr2 - floxの交配において、何らかの遺伝子的な影響が互いに作用している可能性も示唆された。

(以上)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------