

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17755

研究課題名(和文)腎臓病におけるRNA結合タンパク質による炎症性mRNA制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulational mechanisms of inflammatory mRNAs by RNA-binding proteins in kidney disease

研究代表者

都川 貴代 (MIYAKOGAWA, Takayo)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50631842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)でみられる腎臓の線維化は不可逆的な変化であり、線維化を起こした臓器は最終的に機能不全に陥る。単球・マクロファージおよびT細胞に発現するRegnase-1とRoquinは炎症性mRNAの抑制因子であり、これらの欠損マウスでは心臓や肺、肝臓での線維化をひきおこすことが知られている。

CKD患者でみられる臓器障害において、炎症が関与するメカニズムの詳細は未だ不明な点が多い。本研究では、CKD患者から採集されたPBMCを用いて、CKDにおけるRegnase-1とRoquinなどのRNA結合タンパク質による炎症性mRNA制御とマクロファージ活性化の関連を初めて示し、その機序を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)でみられる全身における持続炎症は組織線維化を促進させることから、CKDの進行を阻止するための治療標的となり得る。

CKDにおける炎症は様々な致死合併症に関連しているが、その特異的な治療方法が確立されていないため不良な予後を来している。本研究はCKDにおける炎症の原因の一端を、腎臓病におけるRNA結合タンパク質の作用メカニズムを詳細に解析することで明らかにしており、TLRを介した自然免疫における炎症調節機構とそれに伴う臓器障害についての理解が進むことが期待される。この研究の成果によって、持続炎症の根本治療における論理的な支柱を形成し治療戦略の基礎が確立されると期待される。

研究成果の概要(英文)：The fibrosis of the kidney seen in chronic kidney disease (CKD) is an irreversible change, and the fibrotic organ eventually becomes dysfunctional. Regnase-1 and Roquin, which are expressed on monocytes, macrophages and T cells, are suppressors of inflammatory mRNAs and are known to cause fibrosis in heart, lung and liver in mice deficient in them.

The mechanism of inflammation-mediated organ damage in CKD patients remains unclear. In this study, using PBMC collected from CKD patients, we showed for the first time that inflammatory mRNA regulation by RNA-binding proteins such as Regnase-1 and Roquin is associated with macrophage activation in CKD, and analyzed the mechanism.

研究分野：腎臓内科学

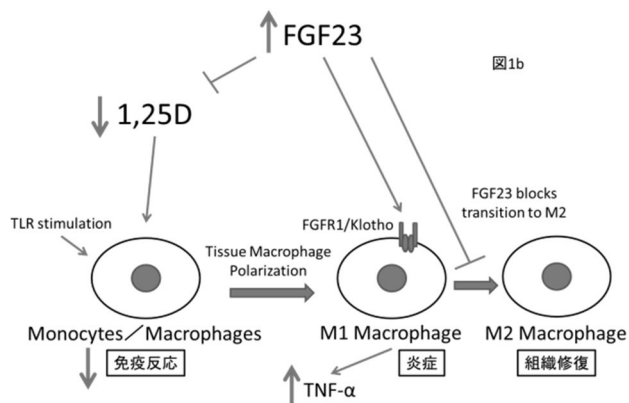
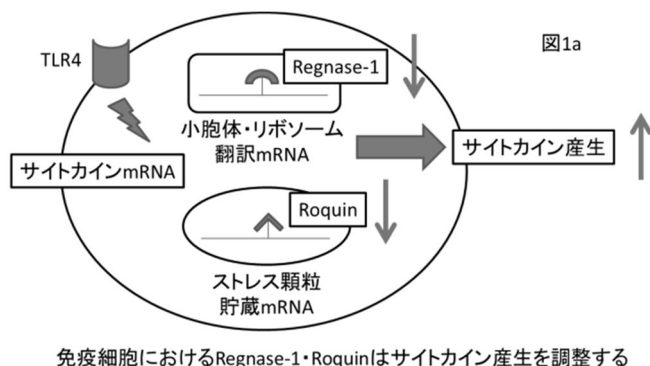
キーワード：慢性腎臓病 炎症 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は世界的に増加しており、末期腎不全や心血管疾患の発症により国民の健康寿命延伸を阻む要因となっている。CKD でみられる腎臓の線維化は不可逆的な変化であり、線維化を起こした臓器は最終的に機能不全に陥る。全身における持続炎症は組織線維化を促進させることから、CKD の進行を阻止するための治療標的となり得ると考えられている。

単球・マクロファージおよび T 細胞に発現する Regnase-1 と Roquin は炎症性 mRNA の抑制因子である。Regnase-1 と Roquin ノックアウトマウスでは心臓をはじめ肺や肝臓へのリンパ球浸潤を誘導した結果、線維化をひきおこすことが知られている。末期腎不全患者の単球・マクロファージ・T 細胞を含む末梢血単核細胞 (PBMC) では、Regnase-1 と Roquin の発現低下が認められ、これは炎症抑制機構の破綻を示唆している可能性がある【図 1a】。IL6 のような炎症性物質もまた CKD 患者では高値であり、線維症を進行させるフラクタルカインを含むこれら炎症関連パラメーターの高値は生命予後に影響を及ぼしている。また CKD 患者の予後を規定する心血管疾患の発症において、血管石灰化は重要な因子である。CKD 患者における冠動脈プラークの存在とマクロファージ誘導に見られる局所的な炎症の増加は、CKD 初期段階から存在する。さらに、腎不全患者で顕著に増加する線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) は活性型ビタミン D (1,25D) 産生を抑制することが知られている【図 1b】。ビタミン D 欠乏症は感染症および心血管疾患の要因と考えられており、自然免疫反応に対する FGF23 の影響は主に 1,25D 産生の抑制を介して、免疫細胞機能を損なうマクロファージおよび多核白血球を含む骨髄細胞と相互作用することで免疫機能を調節する可能性が示唆されている。

CKD 患者でみられる臓器障害において、炎症が関与していることは自明であるが、そのメカニズムにおいては未だ不明な点が多く残されている。CKD における Regnase-1 と Roquin などの RNA 結合タンパク質による炎症性 mRNA 制御とマクロファージ活性化の関連を示した報告は未だ存在しておらず、CKD 進行の背景にある持続性の炎症病態と炎症性 mRNA 制御タンパク質に注目し本研究を立案するに至った。



2. 研究の目的

腎臓病の進行に伴ってみられる炎症は患者の予後不良因子である。自然免疫を介した炎症は RNA 結合タンパク質により制御されることが知られているが、腎臓病における炎症制御には不明な点が多い。予備実験では末期腎不全で RNA 結合タンパク質が低下していることから、本研究では腎臓病における RNA 結合タンパク質による炎症性 mRNA 制御機構を明らかにすることのために、腎

機能障害の程度に応じた末梢血中の炎症性 mRNA 制御タンパクなどの発現を調査して、それらの関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫細胞の炎症誘導による遺伝子発現の変化を明らかにする

培養系を用いて炎症誘導による細胞反応性と遺伝子発現を解析する。FGF23 と VDRA による発現変化を詳細に解析することで、これらのメカニズムを検討する。

(2) 腎機能障害の程度に応じた炎症性 mRNA 制御タンパクなどの関連を明らかにする

慢性腎臓病の患者を対象として、血液中の炎症性 mRNA 制御タンパクの発現と免疫細胞の活性化を測定し分析する。腎疾患の進行度と RNA 結合タンパク質による炎症性 mRNA 発現の関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 免疫細胞の炎症誘導による遺伝子発現の変化

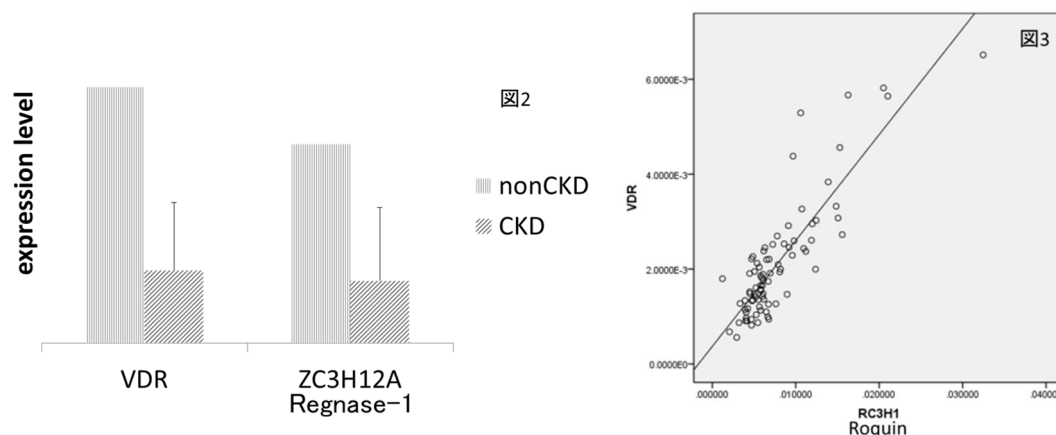
CKD患者血液から採取したPBMCとヒト単球株化細胞THP-1を用いて、培養系における炎症性mRNA制御タンパクの発現と活性化を測定し分析した。その結果、()患者PBMCまたはTHP-1をLPSで刺激すると、CD14、MAPK1、Regnase-1、Roquinの発現は刺激後1-2時間でピークを形成したが、IL6は刺激後8-12時間で発現ピーク迎えるも、その2時間後には発現はほとんど基底レベルまで抑制された。このような炎症の誘導と抑制のコンビネーションはCKD患者由来のPBMCでより明確であった。()同様に単球やマクロファージの免疫応答を抑制するFGF23で刺激した場合には、THP-1ではCD14、MAPK1、Regnase-1、Roquinの発現が刺激後10時間でピークに達したがその2時間後には元のレベルに戻った。CKD患者のPBMCではRegnase-1が刺激後1-2時間でピークを形成した他はほぼ一定であった。

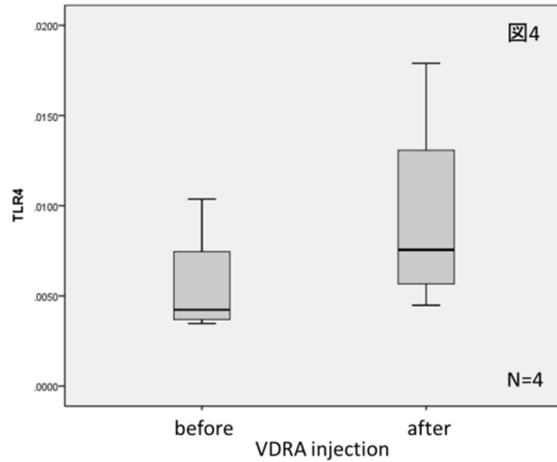
以上の炎症促進/抑制刺激の解析から、PBMCにおけるRNA結合タンパク質による炎症性mRNA発現調節の関連が示された。

(2) 腎機能障害の程度に応じた炎症性 mRNA 制御タンパクなどの関連

末期腎不全患者における炎症の進行に関わる自然免疫細胞の影響を検討するため、PBMCにおける炎症関連因子の解析として、CKD5にて透析を実施予定の患者の血液からPBMCを分離しタンパクおよびRNAを抽出し、Regnase-1およびRoquinを含む因子を健常ボランティアと比較した。健常者に比べてCKD患者ではToll様受容体4 (TLR4)の発現は35%に低下しており、Regnase-1 (ZC3H12A)の発現は32%に低下していた【図2】。この観察集団では極めて重篤な尿毒症により全例が腎代替療法を要しており、腎不全の極期において前炎症病態の制御が破綻していることを示唆していると考えられた。これらの結果は、腎機能障害による全身性の炎症反応の促進を背景としていられると思われ、この過程においてCKD保存期の臓器への免疫細胞の浸潤や組織線維化が関連する可能性が考えられた。さらに、同様の集団でのビタミンD受容体 (VDR)の発現を調べたところ、VDRもまた29%まで低下しており、尿毒症による免疫細胞のVDR down-regulationに加えて、FGF23の増加に続く1,25D減少による免疫機能が減弱している可能性が示唆された。TLR4とZC3H12A (Regnase-1)・RC3H1 (Roquin)およびVDRの間には強い正の相関関係が認められており【図3】、興味深いことにビタミンD投与を必要とする維持透析患者でVDRAを投与した直後でそれらの発現上昇傾向が認められた【図4】。

以上により、末期腎不全病態におけるビタミンDと自然免疫・炎症性mRNA制御タンパクとの間には何らかの関連性が明らかになった。





本研究により、炎症促進/抑制刺激に対する応答が明らかになり、PBMCにおけるRNA結合タンパク質による炎症性mRNA発現調節の関連が示された。炎症促進刺激に対してCKD患者に由来するPBMCの応答性が高いのは、生体内で抑制されていた炎症性mRNA制御タンパクの発現が培養条件下において回復した可能性があり、将来的に、一度培養したPBMCを生体に戻すことにより、CKD患者で持続する炎症反応の抑制を可能にする治療法の開発に繋がる可能性が考えられた。

CKDにおける炎症は様々な致死合併症に関連しているが、その特異的な治療方法が確立されていないため不良な予後を来している。本研究はCKDにおける炎症の原因の一端を解明することを目的としており、腎臓病におけるRNA結合タンパク質の作用メカニズムを詳細に解析することで、TLRを介した自然免疫における炎症調節機構とそれに伴う臓器障害についての理解が進むことが期待される。この研究の成果によって、持続炎症の根本治療における論理的な支柱を形成し治療戦略の基礎が確立されるものと考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakuta Takatoshi, Sawada Kaichiro, Kanai Genta, Tatsumi Ryoko, Miyakogawa Takayo, Ishida Mari, Nakazawa Raima, Fukagawa Masafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Parathyroid hormone-producing cells exist in adipose tissues surrounding the parathyroid glands in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60045-y	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 -

〔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
---------	---------