

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23941

研究課題名（和文）尿細管障害におけるRAGE分子種の機能的役割

研究課題名（英文）Differential roles of RAGE species for renal tubular damages

研究代表者

宮川 太郎（Miyagawa, Taro）

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：20738207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：急性腎障害（AKI）は慢性腎臓病や末期腎不全を発症させる重要な危険因子である。本研究は、可溶性RAGE（sRAGE）に着目し、AKIに対するsRAGEの保護機構について検討した。虚血再灌流によるAKIモデルにおいて、RAGE欠損によりAKIが増悪した。低酸素曝露を施した近位尿細管細胞において、sRAGE存在下でHigh mobility group box1（HMGB1）をはじめとした炎症性サイトカインが低下し、細胞増殖能が改善した。AKIモデルにおいて、sRAGE投与によりAKIが軽減した。以上の結果から、虚血再灌流によるAKIにおいて、sRAGEが保護的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血再灌流による尿細管障害を背景としたAKIにおいて、デコイ型受容体であるsRAGEの存在が重要な機能を担い、HMGB1がsRAGEに捕捉され、腎障害が軽減する可能性があることが初めて明らかとなった。さらに、リコンビナントsRAGEの投与により、HMGB1の炎症性シグナルが抑制され、腎障害に対し保護的に働くことも分かった。以上より、RAGE/sRAGEを介したAKI発症の分子機序が明らかになるとともに、sRAGE補充療法がAKIの新規治療法として有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Acute kidney injury (AKI) is an important risk factor for the development of chronic kidney disease and end-stage renal failure. This study focused on soluble RAGE (sRAGE) and investigated the protective mechanism of sRAGE against AKI. In an ischemia-reperfusion model of AKI, RAGE deficiency exacerbated AKI. In proximal tubular cells exposed to hypoxia, inflammatory cytokines including high mobility group box 1 (HMGB1) were decreased and cell proliferative capacity was improved in the presence of sRAGE. In an AKI model, sRAGE treatment reduced AKI. These results suggest that sRAGE may be protective in ischemia-reperfusion-induced AKI.

研究分野：腎臓学

キーワード：急性腎障害 RAGE sRAGE HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (AKI) は腎不全の危険因子であり、腎臓病が腎不全へ進展する機序の解明が重要な課題である。虚血再灌流はこのAKIを惹起する原因として代表的な病態である。虚血再灌流では、虚血により壊死に陥った細胞からHigh mobility group box 1 (HMGB1) などの分子が放出されることが知られる。HMGB1は、パターン認識受容体を介して炎症性にシグナル伝達し、免疫反応が誘導される。

パターン認識受容体の一つであるReceptor for AGE (RAGE) に関して、近年、動脈硬化やアルツハイマー病、感染症および癌といった疾患の進展や抑制にRAGEが関与することが報告されている。腎疾患においても糖尿病性腎症やループス腎炎などでRAGEが進展に寄与していることが報告されている (Qin J, et al. Sci Rep. 2019, Goury A, et al. J Immunol. 2015)。HMGB1はRAGEのリガンドの一つであり、通常の完全長RAGEはHMGB1が結合するとシグナル伝達する。一方でデコイ型受容体である可溶型RAGE (sRAGE) は完全長RAGEと異なり、DAMPsなどリガンドに結合してもシグナル伝達せず、シグナル抑制性に作用する。このsRAGEは急性肺障害や敗血症など様々な病態で臓器保護に重要な役割を果たすことが知られる。しかし、AKIの病態におけるRAGEおよびsRAGEの意義は明らかでない。本研究では、sRAGEは虚血再灌流による急性腎障害に対し保護的に関与するという仮説を立て研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は腎臓病が腎不全へ至る病態を解明することおよびその進展を抑制することである。そのため、sRAGE 虚血再灌流による AKI による尿細管障害の保護機構を解明することを目的として、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 10~11 週齢の雄性 RAGE 欠損 (*Ager*<sup>-/-</sup>) マウスに一側腎動静脈の I/R (50 分間、37.0 ) を施行し、2 日目と 7 日目の腎尿細管障害、線維化およびマクロファージ浸潤を評価した。

(2) マウス尿細管上皮細胞を低酸素下で培養し、RAGE 分子種の遺伝子発現と培地中への sRAGE 添加の有無による細胞障害と増殖能を調べた。

(3) 野生型 (*Ager*<sup>+/+</sup>) マウスおよび *Ager*<sup>-/-</sup> マウス由来の尿細管上皮細胞の初代培養を行い、低酸素曝露後の向炎症性メディエータの変化を評価した。

(4) 7 週齢の *Ager*<sup>+/+</sup> マウスに一側腎動静脈の I/R (50 分間、37.0 ) を行い、リコンビナント可溶型 RAGE (sRAGE) 投与の有無により 2 日目の腎尿細管障害の評価を行った。

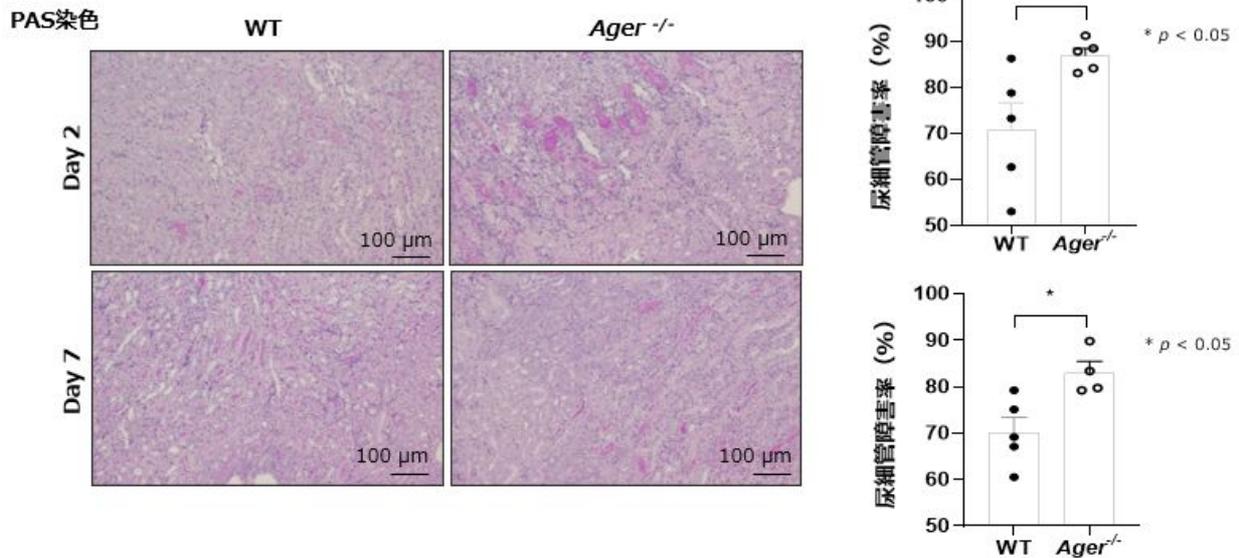
(5) 抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体型腎炎モデルマウスにおいて、*Ager*<sup>+/+</sup> 群、*Ager*<sup>-/-</sup> 群および、*Ager*<sup>+/+</sup> + sRAGE 群の 3 群で 7 日目の尿細管障害を評価した。

## 4. 研究成果

(1) *Ager*<sup>-/-</sup> 群 (day 2, day 7) で腎障害が増強した

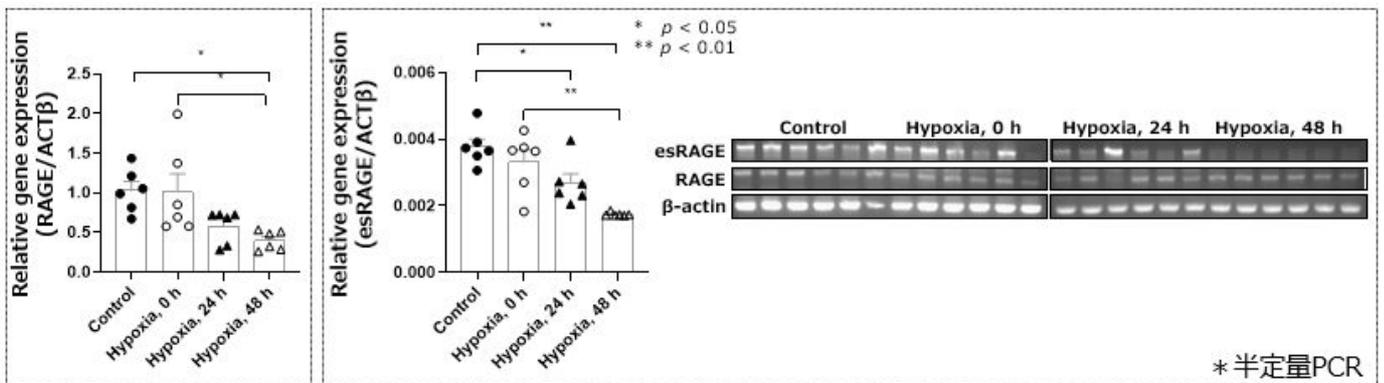
*Ager*<sup>-/-</sup> 群は *Ager*<sup>+/+</sup> 群に比べ、尿細管障害、線維化およびマクロファージ浸潤が増悪した。

以下に代表として尿細管障害に関する結果を示す。マウス腎組織のPAS染色であり、皮質髄質の境界部における尿細管を示す。尿細管障害の程度は、尿細管拡張や内部の円柱、冊子縁の消失などをカウントし、全尿細管に対する割合で比較した。下グラフに示すように、day2 および day7とも RAGE 欠損群で尿細管障害が増強した。



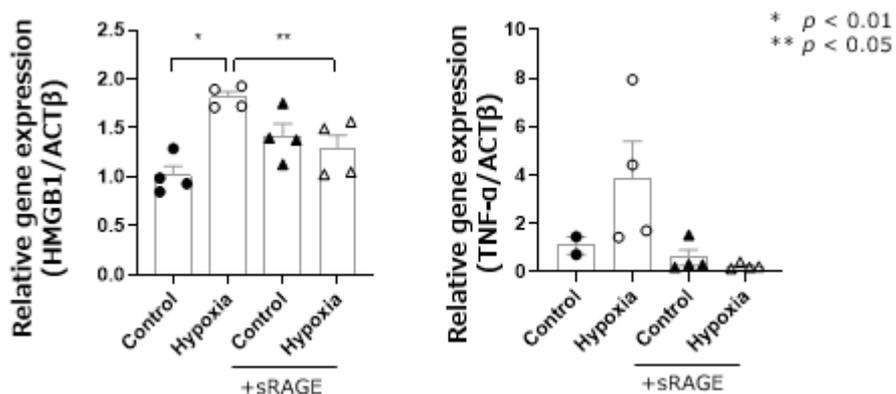
(2) -1 低酸素曝露により尿細管上皮細胞での esRAGE、RAGE mRNA 発現が低下した

マウス尿細管上皮細胞に対して低酸素曝露を行い、直後から回復期における esRAGE および RAGE 遺伝子の動態を評価した。下グラフのように、低酸素曝露により esRAGE および RAGE mRNA 発現量は低下した。



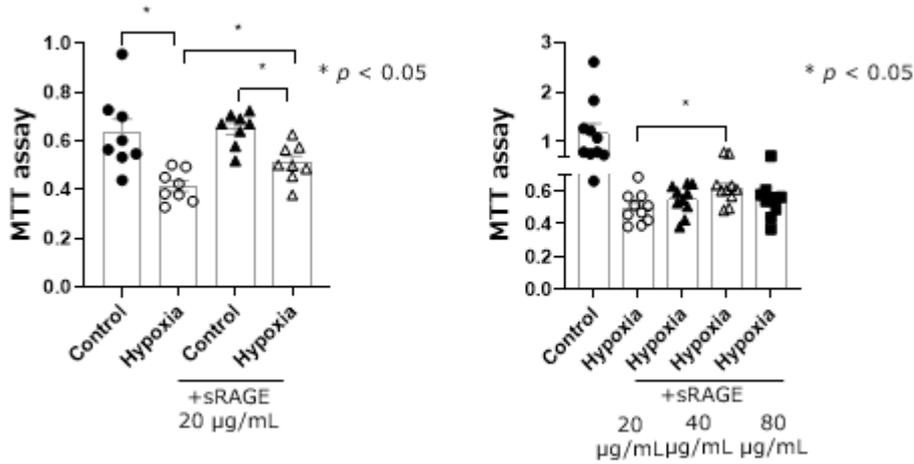
(2) -2 sRAGE 添加により低酸素曝露後の Hmgb1、Tnf- の遺伝子発現の上昇が抑制された

マウス尿細管上皮細胞に対する低酸素曝露実験において、sRAGE を添加し、HMGB1 や Tnf- など炎症性メディエータの変化を確認した。下グラフのように、低酸素曝露でメディエータの mRNA 発現量が上昇し、sRAGE の添加によってその上昇が抑制された。



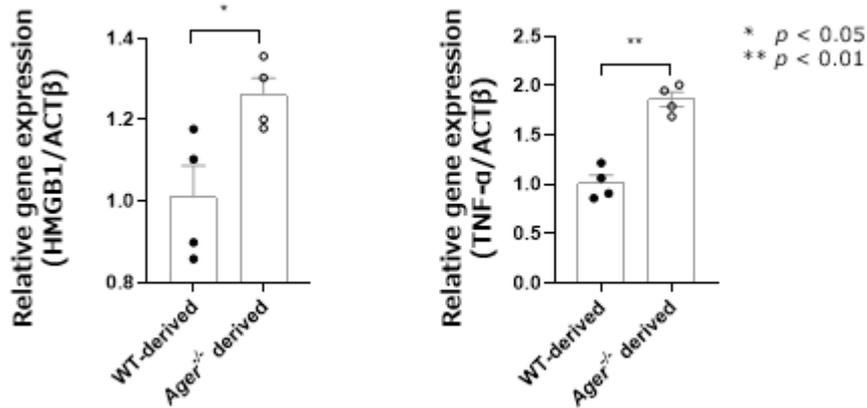
(2) -3 sRAGE 添加により低酸素曝露後の尿細管上皮細胞増殖が回復した

マウス尿細管上皮細胞に対する低酸素曝露実験において、MTT アッセイを用いて sRAGE 添加の有無による細胞増殖の変化を調べた。下グラフのように、低酸素曝露で減弱した細胞増殖が sRAGE 添加で回復し、さらに添加する sRAGE の濃度に伴い増殖が回復した。



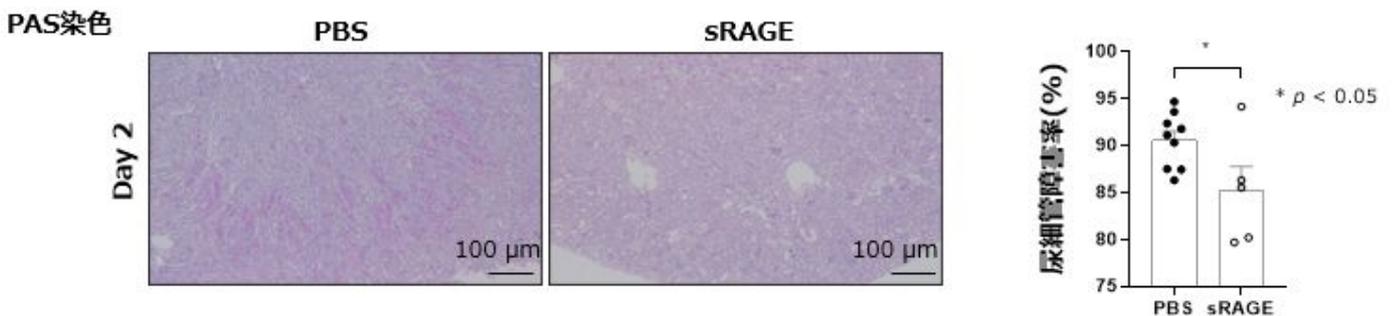
(3) 低酸素曝露後、WT 由来より *Ager*<sup>-/-</sup> 由来で *Hmgb1*、*Tnf*<sup>-</sup> の遺伝子発現が上昇した

野生型および RAGE 欠損マウスの尿細管上皮細胞を初代培養し、これまでと同様に低酸素曝露を行い、炎症性メディエータの変化を確認した。下グラフのように、野生型と比して RAGE 欠損型由来の尿細管上皮細胞において、HMGB1 や *Tnf*<sup>-</sup> の遺伝子発現が上昇した。



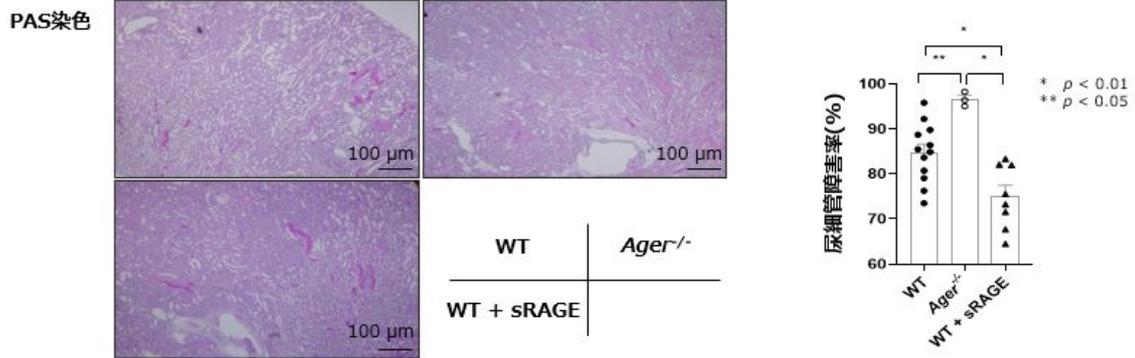
(4) sRAGE 投与群で尿細管障害が軽減した

野生型マウスに虚血再灌流を施し、sRAGE 投与の有無による尿細管障害の程度を比較した。sRAGE 投与群で円柱形成や刷子縁の消失といった尿細管障害が軽減した。



(5) 尿細管障害は *Ager*<sup>-/-</sup> 群で増強し、WT+sRAGE 群で軽減した

他のモデルでの尿細管障害を評価するため、抗糸球体基底膜抗体型腎炎モデルを作成した。コントロール群、RAGE 欠損群および sRAGE 投与群の 3 群に分けて上段のプロトコールで尿細管障害の程度を比較した。下グラフのように、尿細管障害の程度は RAGE 欠損群で増強し、sRAGE 投与により軽減した。



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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyagawa Taro, Iwata Yasunori, Oshima Megumi, Ogura Hisayuki, Sato Koichi, Nakagawa Shiori, Yamamura Yuta, Kamikawa Yasutaka, Miyake Taito, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Hara Akinori, Sakai Norihiko, Shimizu Miho, Furuichi Kengo, Munesue Seiichi, Yamamoto Yasuhiko, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Soluble receptor for advanced glycation end products protects from ischemia- and reperfusion-induced acute kidney injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology Open	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) 10.1242/bio.058852	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taro Miyagawa
2. 発表標題 Differential roles of RAGE species for renal tubular damages
3. 学会等名 18th Asian Pacific Congress of Nephrology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮川 太郎
2. 発表標題 尿細管障害における RAGE分子種の機能的役割
3. 学会等名 第9回西日本腎臓病研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川 太郎
2. 発表標題 尿細管障害における RAGE分子種の機能的役割
3. 学会等名 第40回炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taro Miyagawa
2. 発表標題 Differential roles of RAGE species for renal tubular damages
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川 太郎
2. 発表標題 尿細管障害における RAGE分子種の機能的役割
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
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