

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08614

研究課題名（和文）急性腎障害の遷延機序解明を通じた慢性腎臓病の重症化抑制法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to suppress the severity of chronic kidney disease through elucidation of mechanism of transition from acute kidney injury

研究代表者

岡田 浩一（Okada, Hiromasa）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60233342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：虚血や尿路閉塞などによるAKIでは、尿細管上皮細胞への障害から細胞周期停止細胞が出現し、線維化促進形質を獲得して腎線維化を発症・進展させる可能性がある。このG2/M期休止細胞は尿細管障害により誘導され、その障害程度に応じて数や残存期間が増加していた。この細胞を標的とした線維化促進性形質の抑制は、抗CKD治療への発展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病（CKD）の原因となる病変は腎線維化であり、その発症・進展メカニズムの一つは急性腎障害（AKI）の反復とされている。我々はAKIモデルマウスの腎尿細管上皮細胞の一部に細胞周期停止細胞が出現し、線維化促進性の形質を獲得している可能性を示唆するデータを得た。この細胞の線維化促進性の形質を抑制する治療を開発することで、AKI後のCKDの発症・進展に対する治療に結び付けることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In AKI due to ischemia or urinary tract obstruction, renal tubular epithelial cells are damaged, resulting in the appearance of cell cycle arrested cells, which may acquire profibrotic traits and cause the onset and progression of renal fibrosis. These G2/M-phase resting cells were induced by renal tubular injury, and the number and survival period increased according to the degree of injury. Suppression of this cell-targeted profibrotic trait is expected to be developed into an anti-CKD therapy.

研究分野：腎臓病学

キーワード：慢性腎臓病 急性腎障害 腎線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来より、AKI は原因が除去されれば発症以前の状況に回復する「一時的な病態」と考えられていたが、既に CKD を有する場合には AKI を原因とする CKD の進行が免れない。現在、AKI の発症を予見するバイオマーカーの検索が盛んであるが、一方、治療については循環動態の安定化や感染のコントロールなど、AKI の原因を除去し腎の自己修復能に頼るのみであり、AKI の病態に立脚した新規治療法の開発が望まれている。マウス AKI モデルでの検討で、損傷遺伝子の修復が困難な高度障害を受けた尿細管上皮細胞では、細胞周期が G2/M 期に休止し、同時に Twist1 や Snai11 などの上皮間葉系形質転換に関わる転写因子の誘導により、線維化促進性の形質を獲得することが報告されている。我々は Cre-loxP システム/gGT (glutamyltranspeptidase) -Cre を用いて皮質尿細管上皮細胞特異的に遺伝子操作を可能にする動物実験系を導入、皮質尿細管上皮細胞特異的に whole CCN2 を knock-down した遺伝子改変マウスを作成し、IRI モデルで検討したところ、wild-type マウスと比較して AKI に続く腎線維化程度が有意に軽減され、CKD の発症・進展が抑制されることを見いだした。そこから、AKI 発症時に障害された尿細管上皮細胞が CCN2 等の産生を介して線維化促進性に作用し、CKD の発症・進展に関与している可能性が予想されている。

2. 研究の目的

AKI 発症時の障害尿細管上皮細胞の形質変化について検討し、AKI が CKD を発症・進行する機序について詳細を明らかにするために、既報および当研究室の成果から、AKI 修復過程における尿細管上皮細胞の細胞周期と線維化促進形質との関連を検討することが特に重要と考えられる。そこで細胞周期に対応して異なる蛍光を発する Fucci2aR レポーターマウスと尿細管上皮細胞特異的な Cre-loxP システムを発現する gGT-Cre マウスとの交配によって尿細管上皮細胞の細胞周期に注目した実験系を樹立し、AKI 発症時の障害尿細管上皮細胞の線維化促進形質変化 (CCN2 産生・分泌など) について検討し、AKI が CKD を発症・進行する機序についての詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

1) Fucci2aR マウスと gGT-Cre マウスの交配により、尿細管上皮細胞が細胞周期に対応して異なる蛍光を発する gGT-Cre;Fucci2aR^{Tg/+} マウス (G1/S 期 : mCherry による赤色蛍光 (560nm レーザー、610/20nm バンドパスフィルターで検出) S/G2/M 期 : mVenus による緑色蛍光 (488nm レーザー、525/50nm バンドパスフィルターで検出)) を作出する。

2) 一側尿管閉塞 (UUO) モデルと片側腎動脈の虚血再灌流 (IRI) モデルを作成し、急性期 (3 日) 亜急性期 (7 日) と慢性期 (14 日) の腎組織検体を得る。

3) 組織透明化試薬 CUBIC を用いて腎組織を透明化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。mVenus、mCherry の分布から組織学的に尿細管上皮細胞の細胞周期の推移を解析する。

4) さらに腎線維化促進形質マーカーとなる標的物質 (CCN2、KIM-1、Snai11、pHH3 など) に対する特異抗体を用いた免疫染色を行うことで、eVenus 陽性細胞の形質を検出する。

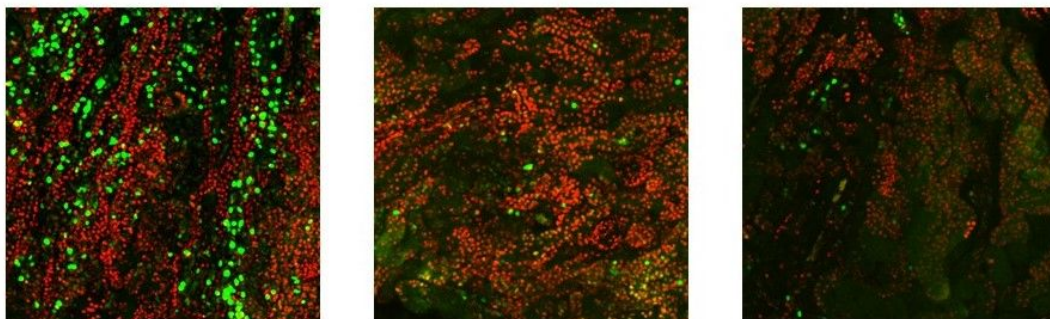
5) 腎組織をコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼで消化し、フィルターを通して未消化塊を除去して単細胞浮遊液を作成、核染色を含めたマルチカラー分析で尿細管上皮細胞の細胞周期の分布を調査し、AKI モデル作成後の時間軸に沿って定量的に評価する。

6) FACS (fluorescence-activated cell sorting) により細胞周期別に尿管上皮細胞を回収してmRNAを抽出し、細胞周期別の遺伝子発現 (CCN2、TGF- β 1、Snail1、Fibronectin、Collagen Type I など) を検討する。

7) 同mRNA サンプルを用いてマイクロアレイにより発現遺伝子を網羅的に検討し、従来より線維化促進性と呼ばれてきた形質を遺伝子レベルで解析する。

4. 研究成果

Fucci2aRマウスとgGT.Creマウスの交配により、尿管上皮細胞が細胞周期に対応して異なる蛍光を発するgGT.Cre;Fucci2aRTg/+マウス (G1/S期: mCherryによる蛍光、S/G2/M期: mVenusによる蛍光) を作出し、片側尿管を結紮する一側尿管閉塞 (UUO) モデルと腎動脈を短時間クランプし開放する虚血・再灌流障害 (IRI) モデルを作成し、短期から中・長期の腎組織病変における尿管上皮細胞の細胞周期の変化を評価した。腎組織を透明化して観察したところ、両モデルとも急性期 (3日目) からmVenus陽性のG2/M期に休止した尿管上皮細胞数が増加することが明らかとなった。UUOモデル腎ではコントロール腎と比較して有意にmVenus陽性細胞数が多い状態で推移していたが、IRIモデル腎では7日目にはコントロール腎と同等のレベルまでmVenus陽性細胞数が減少していた。(図)



3日目

7日目

14日目

図: IRIモデル急性期 (3日)、亜急性期 (7日) および慢性期 (14日) の腎組織におけるmCherry陽性細胞 (赤) (G1/S期) とmVenus陽性細胞 (緑) (S/G2/M期) の経時的推移

UUOでは尿管閉塞という障害が遷延するため進行性腎線維化を呈する一方、IRIでは虚血性障害は一過性であり治癒過程の線維化を呈することから、mVenus陽性細胞数の推移にモデル間で差が認められたものと想定される。

現在、免疫組織化学を用いて、mVenus陽性細胞の線維化促進性形質の3次元解析を進めている。mVenus陽性細胞の内の一部が細胞周期休止期マーカーであるpHH3と共陽性になることから、線維化促進性形質を獲得している可能性のあるG2/M期休止細胞群はmVenus陽性細胞の一部である可能性が示唆された。

各モデル3日目の腎組織を酵素・超音波処理により単細胞化し、フローサイトメトリー法を用いてmVenus陽性細胞の単離を目指した。単細胞化のプロセスにおいて処理を十分に行うと生細胞数減少とシグナル減弱を生じ、処理を軽く行うと単細胞数減少を生じ、いずれのプロトコールでもmVenus陽性細胞の回収率が低く、それ以降の標的遺伝子発現解析等の検討には進めなかった。

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 0件）

1. 著者名 Amano H, Inoue T, Kusano T, Okada H	4. 巻 2582
2. 論文標題 Analysis of the Function of CCN2 in Tubular Epithelium Cells with a Focus on Renal Fibrogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 411-426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2744-0_28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 深谷大地、井上勉、天野博明、岡田浩一
2. 発表標題 CCN2/CTGFはintegrin/FAKを介して腎線維化を進行する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukaya D, Inoue T, Amano H, Okada H
2. 発表標題 CCN2 / CTGF causes progression of renal fibrosis through the integrin / FAK signal pathway
3. 学会等名 The 2021 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	井上 勉 (Inoue Tsutomu) (30406475)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

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