

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08246

研究課題名（和文）フローサイトメトリーを利用した腎線維化機序の解明

研究課題名（英文）Analysis the Mechanism of Renal Fibrosis Using Flow Cytometry

研究代表者

廣村 桂樹（Hiromura, Keiju）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70292597

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）：本研究では、フローサイトメトリー（FCM）を用いて腎線維化の機序を解明した。片側尿管結紮（UUO）マウスの腎臓細胞を単離してFCMで経時的に解析した結果、非血球細胞であるPDGFR陽性細胞の一部がSMA陽性の筋線維芽細胞となり、腎線維化に関与することを明らかにした。また、血球系細胞のF4/80陽性細胞がPDGFを始めさまざまなサイトカインやケモカインを産生することで、炎症や線維化の促進に関与している可能性が示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎線維化は末期腎不全に至る腎障害に共通してみられ、その病態解明と制御は、末期腎不全を阻止するために重要である。今回、我々はマウスUUOモデルにおける腎線維化に関与する細胞群や分子を明らかにした。これらの知見は腎線維化の早期診断や治療法の開発に繋がる可能性があり、腎疾患患者の生活の質向上や医療費削減に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the mechanism of renal fibrosis using flow cytometry (FCM). By isolating renal cells from unilateral ureteral obstruction (UUO) mice and analyzing them over time with FCM, we found that a subset of non-hematopoietic PDGFR⁺ cells became SMA-positive myofibroblasts and contributed to renal fibrosis. Additionally, it was shown that hematopoietic F4/80-positive cells might promote inflammation and fibrosis by producing various cytokines and chemokines, including PDGF.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓病学 尿細管間質障害 筋線維芽細胞 腎線維化 腎不全 フローサイトメトリー

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎尿細管間質障害は糖尿病性腎臓病、腎硬化症、糸球体腎炎など種々の腎障害における腎機能低下に共通する病態である。尿細管間質障害の過程では、進行性間質線維化、傍尿細管毛細血管減少、尿細管萎縮による機能ネフロン減少といった一連の病態が生じる。特に間質線維化は長期的な腎機能悪化の強力な予測因子である。尿細管間質線維化は、筋線維芽細胞の増生と過剰な細胞外基質産生が主因となるが、その機序は十分に解明されていない。

腎臓の筋線維芽細胞の起源について、マウスの片側性尿管閉塞 (UUO) に利用した Fate mapping による解析では、大部分の筋線維芽細胞は腎局在や骨髄由来の線維芽細胞に由来し、一部は尿細管上皮細胞 (上皮間葉転換、EMT)、内皮細胞 (内皮間葉転換、EndMT) であると報告されている^①。一方で、マクロファージが筋線維芽細胞に形質転換するという (Macrophage-myofibroblast transition: MMT) 説もあり^②、完全な結論に至っていない。

2. 研究の目的

腎臓内の細胞群解析は、主に組織の免疫染色によって行われるが、技術的制約が存在する。一方、フローサイトメトリー (FCM) では多重染色が可能であり、生細胞を分画することができる。我々はこれまでに、FCM を用いて腎臓内の血球系細胞を詳細に解析し、効率的な分画手法を考案している^③。今回の研究では、FCM を用いて α SMA を筋線維芽細胞のマーカーとし、マウスの腎線維化モデルにおける筋線維芽細胞のフェノタイプと動態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス

16~22 週齢の C57BL/6j マウスを使用した。すべてのマウスは群馬大学生物資源センターにて SPF 環境で飼育され、動物実験はガイドラインに準拠し、動物実験計画の承認を得て実施した。

(2) UUO (尿管閉塞)

マウスはケタミンとキシラジンで麻酔し、開腹手術で左尿管を結紮した。偽手術は同じ手術手順で尿管結紮を行わなかった。マウスは腎線維化の評価のために 0、2、4、7、14、28 日目に屠殺した。

(3) 病理組織学および免疫蛍光

結紮または偽手術をした腎臓を冷 PBS で灌流後、4%パラホルムアルデヒド PBS で固定し、パラフィンに包埋した。4 μ m 切片を各種染色し、免疫組織化学染色を行った。画像は光学顕微鏡で取得した。

(4) 腎臓からのシングルセルの調製

UUO を行った腎臓を冷 PBS で灌流し、digestion solution でインキュベート後、Gentle MACS Dissociator で細かくした。40 μ m メッシュで濾過し、40%パーコールに懸濁、70%パーコールに重層し遠心分離した。

(5) FCM 解析と細胞分取

既報のとおり^③、シングルセル懸濁液に対して抗マウス CD16/CD32 mAb をプレインキュベートし、非特異的抗体結合を最小化し、特定の蛍光色素標識抗体および PI で染色した。フローサイトメトリーで分析し、CountBright Absolute Counting ビーズで細胞数を定量した。また、シングルセル懸濁液を FITC-CD45.2、PE-PDGFR β 、PI および PE-Cy7-F4/80 で染色し、CD45.2- PDGFR β +細胞および CD45.2+ F4/80+細胞を S3 Cell Sorter で分取した。

(6) RNA 抽出および qPCR

腎臓をホモジナイズし、RNeasy Mini Kit で総 RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit で cDNA に逆転写した。線維化および炎症遺伝子マーカーの発現を qPCR で測定し、GAPDH を内部コントロールとして使用した。

(7) ウェスタンブロット

分取細胞は 10 匹のマウスから収集し、溶解バッファに懸濁後、2 回凍結解凍した。遠心分離後、上澄みを収集し、BCA タンパク質アッセイで濃度を測定した。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写し、一次抗体でインキュベート後、二次抗体で検出した。

4. 研究成果

(1) UUO 腎での FCM 解析

UUO を作成し 14 日目の腎臓をマッソントリクローム染色、EVG 染色で観察したところ、尿細管

間質の線維化を認めた。続いて、線維化に関わる細胞を同定するために、FCM を用いて評価を行った。筋線維芽細胞の細胞マーカーとして α SMA を用いて、陽性細胞を検討した。14 日目の UUO 腎で著明な α SMA 細胞の増加が見られた。血球系細胞のマーカーである CD45.2 について検討すると、 α SMA 陽性細胞の大部分は CD45.2 陰性であり、CD45.2 陽性細胞に含まれる細胞は少数であった。また、 α SMA 陽性となる血球細胞について検討すると、F4/80 陽性細胞の一部が α SMA 陽性となっていた。

α SMA 陽性細胞と線維化と関連ある CD34、vimentin、CD73、PDGFR β との関連を、UUO 14 日目の腎臓から調製したシングルセルを用いて検討した。 α SMA 陽性細胞は、CD34 はほぼ染まらず、CD73 は約 20%陽性、PDGFR β は約 60%陽性、vimentin はほぼ全て陽性であった。一方、CD73 陽性細胞のうち α SMA は約 5%陽性、PDGFR β 陽性細胞のうち α SMA は約 60%陽性、vimentin 陽性細胞のうち α SMA は約 30%陽性であった。 α SMA と PDGFR β の相関を免疫染色でも確認したところ、 α SMA と PDGFR β は概ね一致した。 α SMA は主に CD45.2 陰性群に存在したことから、筋線維芽細胞の大部分は非血球系細胞由来であると考えられた。vimentin、CD34、CD73 は α SMA との相関が弱く、筋線維芽細胞のマーカーとしては適さず、PDGFR β がマーカーとして適しているものと考えられた。

続いて α SMA 陽性細胞について、経時的に検討した。CD45.2 陰性 α SMA 陽性細胞は、UUO 2 日目より増加し 14 日目がピークとなり、28 日目にかけて減少した。 α SMA 陽性 PDGFR β 陽性細胞も同じような変化を示した。また、CD45.2 陽性の血球細胞の経時的変化を検討すると UUO 2 日目より急増し、21 日目くらいまでは高値が持続し、28 日目に減少が見られた。一方、CD45.2 陽性 CD11b 陽性 F4/80 陽性細胞を検討すると、UUO 2 日目より増加し 7 日目がピークとなり、28 日目にかけて減少した。

(2) PDGFR β 陽性細胞と F4/80 陽性細胞の比較

PDGFR β をマーカーとして、UUO マウスの腎臓から FCM で PDGFR β 陽性細胞を単離した。また、UUO マウスの腎臓で増加が見られた F4/80 陽性細胞も単離し、両細胞の比較を行った。FCM の条件を調整することで、それぞれの細胞を約 90%の純度でソートできた。Western blot での解析では、PDGFR β 陽性細胞からはコラーゲン 1 の発現が確認できたが、F4/80 陽性細胞からは確認できなかった。

続いて、PDGFR β 陽性細胞と F4/80 陽性細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、線維化や炎症細胞の遊走、分化に関連する分子について qPCR により検討した。PDGFR β 陽性細胞では *col1a*、*Acta2*、*IL1r1*、*CX3CL1* の mRNA の上昇を確認した。一方、F4/80 陽性細胞では PDGFb、*IL-1 β* 、*Ccr2*、*Ccr5*、*Cc12*、*Cc13*、*CX3CR1* の発現が亢進していた。これらの結果から、PDGFR β 陽性細胞の一部が筋線維芽細胞となり、一方、F4/80 陽性細胞は PDGF を産生するとともに様々なサイトカインやケモカインを産生して炎症や線維化の促進に関与している可能性が示唆された。

(3) PDGFR β 陽性細胞の培養

PDGFR β 陽性細胞の形質変換の詳細を検討するために、マウス腎臓より PDGF 陽性細胞を FCM により単離し、マトリジェルで培養したり、健常マウスの皮下や腎実質に注入したりして観察した。しかし、現時点では単離細胞の長期生存は得られていない。

以上の結果から、PDGFR β 陽性細胞の一部が筋線維芽細胞となり、F4/80 陽性細胞は PDGF を産生し、さまざまなサイトカインやケモカインを産生して炎症や線維化の促進に関与している可能性が示唆された。PDGF 陽性細胞の単離培養は今後の課題となった。

<引用文献>

- ① LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 2013;19(8):1047-53.
- ② Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(3):144-158.
- ③ Watanabe M, Kaneko Y, Ohishi Y, Kinoshita M, Sakairi T, Ikeuchi H, Maeshima A, Saito Y, Ohnishi H, Nojima Y, Matozaki T, Hiromura K. Importance of methodology in the evaluation of renal mononuclear phagocytes and analysis of a model of experimental nephritis with *Shp1* conditional knockout mice. *Biochem Biophys Rep.* 2020;22:100741.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 諏訪絢也、金子和光、渡辺光治、今井陽一、Shreya Shrestha、木下雅人、大石裕子、中里見征央、浜谷博子、坂入徹、池内秀和、廣村桂樹
2. 発表標題 腎線維化における筋線維芽細胞のフローサイトメトリーによる検討
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------