

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08252

研究課題名（和文）レドックス制御破綻に着目した急性腎障害の新たな発症修復メカニズムの解明

研究課題名（英文）Novel mechanisms of pathogenesis and repair of acute kidney injury focusing on redox dysregulation.

研究代表者

糟野 健司（Kasuno, Kenji）

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：60455243

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）：AKIの重症度とその後のCKDへの移行に関連したTXNタンパク質の腎発現を調べるため、我々は軽度と重度のAKIモデルマウスを作成した。重症のAKIマウスは軽症のAKIマウスに比べて腎尿細管細胞におけるTXNの枯渇が長く続いた。さらに、TXNの枯渇により、酸化還元依存性の細胞周期制御因子Cdc25Cが不活性化され、G2/M細胞周期の停止が起こった。重症AKIのTXNトランスジェニックマウスは重症AKIの野生型マウスと比較して、尿細管内TXNの枯渇は、Cdc25Cの不活性化、H2AXの増加、p53発現の増加、ATMリン酸化の増加、ゲノムの不安定性、AKIからCKDへの移行を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症のAKIでは尿細管内TXNの枯渇によりCdc25Cの不活性化に加えてゲノム不安定性が遷延して、H2AXが増加し、p53の発現量が増加し、ATMのリン酸化が増加し、AKIからCKDへの移行を促進することが示唆された。TXNの過剰発現はCdc25Cの不活性化、ゲノム不安定性、H2AX増加、p53の増加、ATMのリン酸化を抑制し、G2/M細胞周期停止を解除してAKIからCKDへの移行を阻止できることがわかった。TXN誘導剤はG2/M細胞周期停止を解除してAKIからCKDへの移行を阻止する新規薬剤になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the renal expression of TXN protein in relation to the severity of AKI and subsequent transition to CKD, we generated mouse models of mild and severe AKI. Mice with severe AKI showed prolonged depletion of TXN in renal tubular cells compared to mice with mild AKI. Furthermore, TXN depletion led to inactivation of the redox-dependent cell cycle regulator Cdc25C and arrest of the G2/M cell cycle. Compared to wild-type mice with severe AKI, depletion of TXN in the tubules of TXN transgenic mice with severe AKI was able to suppress Cdc25C inactivation, increased H2AX, increased p53 expression, increased ATM phosphorylation, genomic instability and the AKI to CKD transition.

研究分野：腎臓病学

キーワード：酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の大規模臨床研究により現在の AKI 管理法では予後を改善するには不十分であることがわかってきた(N Engl J Med 2020; 383:240-251)。この理由として、元来 AKI がさまざまな原因で起こる疾患であるにもかかわらず、現在の診断基準が原因に関係なく無差別的に診断されていることが一因と考えられる。予後改善のためには無差別型管理戦略から原因別の病態特異的管理戦略への転換が必要である。従来は AKI は完治する疾患と考えられていたが、重症の AKI では完治せずに慢性腎臓病へ移行することが知られている。慢性化への移行には細胞周期の G2/M 期停止(Yang L et al. Nat Med 2010)が関与するとされているが、酸化ストレスとの関連性については不明な点が多い。酸化ストレスは細胞内の NADPH の供給能力が喪失することにより細胞障害を来す(Tran MT et al. Nature 2016)。NADPH は TRX を介して分子内に S-S 結合を有するレドックス感受性タンパク質に H<sup>+</sup>を供給している。細胞内レドックス感受性タンパク質は TRX から H<sup>+</sup>を受け取ることで S-S 結合を介する高次構造を維持し、活性を維持している。レドックス依存的に活性変化を受けるタンパク質の例として G2/M 制御因子 cell division cycle 25C(Cdc25C)や遺伝子修復酵素 p53 などが知られている

### 2. 研究の目的

TRX は定常状態では TRX 還元酵素により還元されリサイクルされるが、過剰な酸化ストレスによる AKI では尿細管細胞内 TRX が細胞外の尿中に排泄され、尿細管細胞内 TRX が枯渇するレドックス破綻が起こることを研究代表者が独自に発見してきた。本研究課題では尿細管内レドックス破綻によってレドックス感受性タンパク質の活性が変化することが AKI の病態にどのようにかかわっているか解明する。本研究によって尿中 TRX 排泄の病理学的意義が明らかになり、尿中 TRX 測定による AKI の質的診断と、枯渇した TRX を補充する治療法が創造される。レドックス破綻に対する特異的な診断と治療により、従来の無差別型 AKI 管理から病態特異的 AKI 管理が可能となり AKI の予後改善が期待される。

### 3. 研究の方法

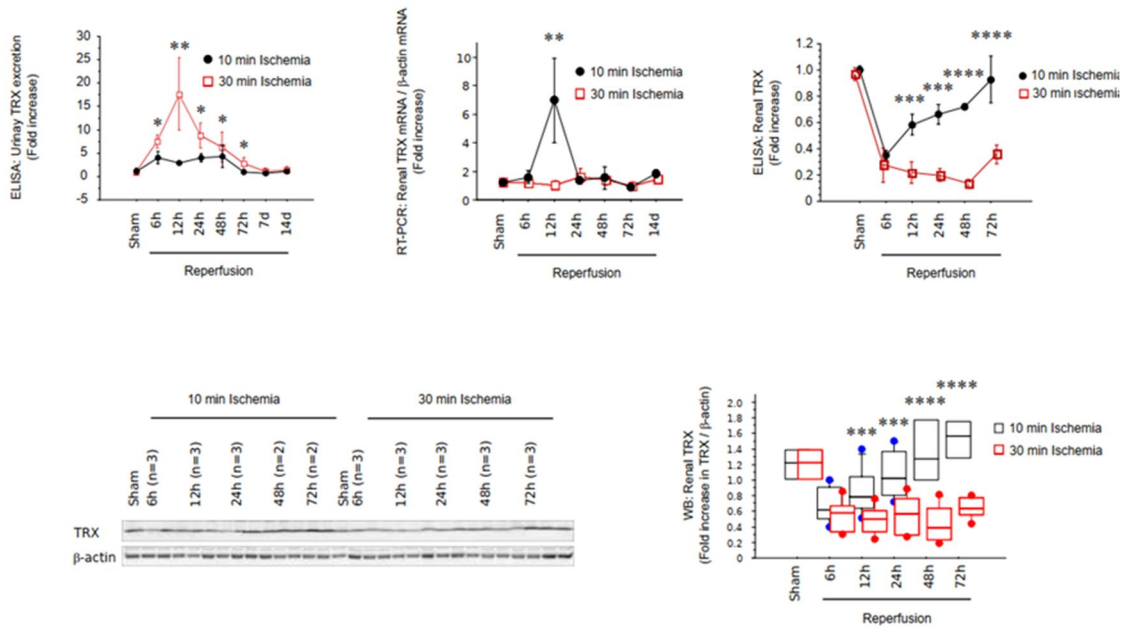
本研究ではレドックス破綻によるレドックス感受性タンパク質の機能破綻を明らかにする。

マウスの軽症 AKI モデルと重症 AKI モデルを作成し TXN タンパク質の発現量を検討する。尿細管内 TRX 枯渇がレドックス感受性 G2/M 制御因子 Cdc25C を介して G2/M 停止に関連するか調べる。TRX 還元酵素阻害と TRX siRNA で培養尿細管細胞の G2/M 停止が起こることを確認済みである。In vivo にて尿細管内 TRX 量に応じた G2/M 停止が起こるか調べるためにマウスに 10 分虚血(軽症 AKI モデル)、30 分虚血(重症 AKI モデル)を施し再灌流障害後の血清、尿、腎組織を採取して、尿細管内 TRX 枯渇の程度によって G2/M 停止マーカー p-Histone H3 を経時的に観察する。phospho-Cdc25C を測定して活性を定量することで G2/M 停止が Cdc25C を介していることを確認する。TRX 枯渇による Cdc25C のリン酸化が 14-3-3 タンパクとの結合を促進し、Cdc25C の核外への隔離に関係しているか免疫沈降と免疫染色で調べる。

### 4. 研究成果

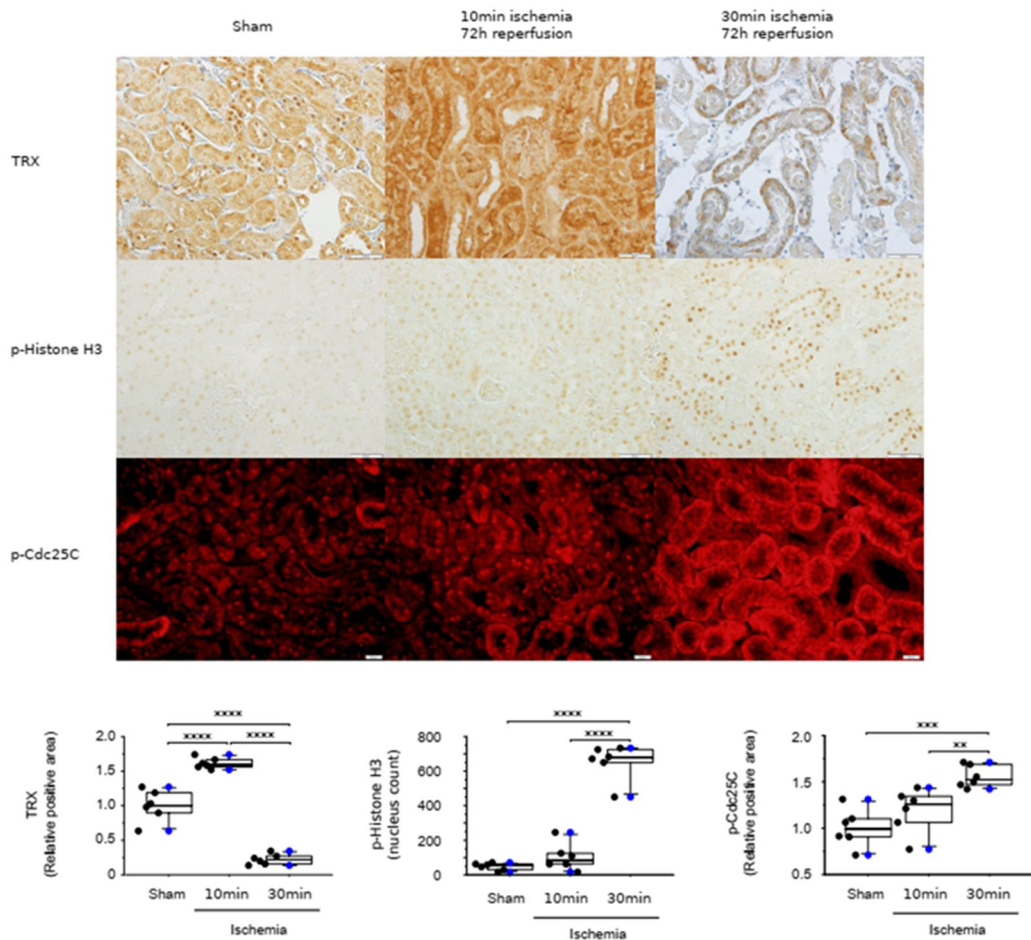
マウスの軽症 AKI モデルと重症 AKI モデルを作成し TXN タンパク質の発現量を検討した。どちらのマウスも再還流後に尿細管内 TXN タンパク質は減少するが、軽症マウスでは、再灌流の 12 時間目に腎臓内 TXN mRNA の発現上昇を認め、腎臓内 TXN タンパク質の枯渇は急速に回復するのに対して、重症マウスでは AKI の重症度に応じて TXN の尿中排泄が多く、mRNA 合成が起こらず、腎尿細管細胞内で TXN の枯渇が遷延することが分かった(図 1)。

図 1



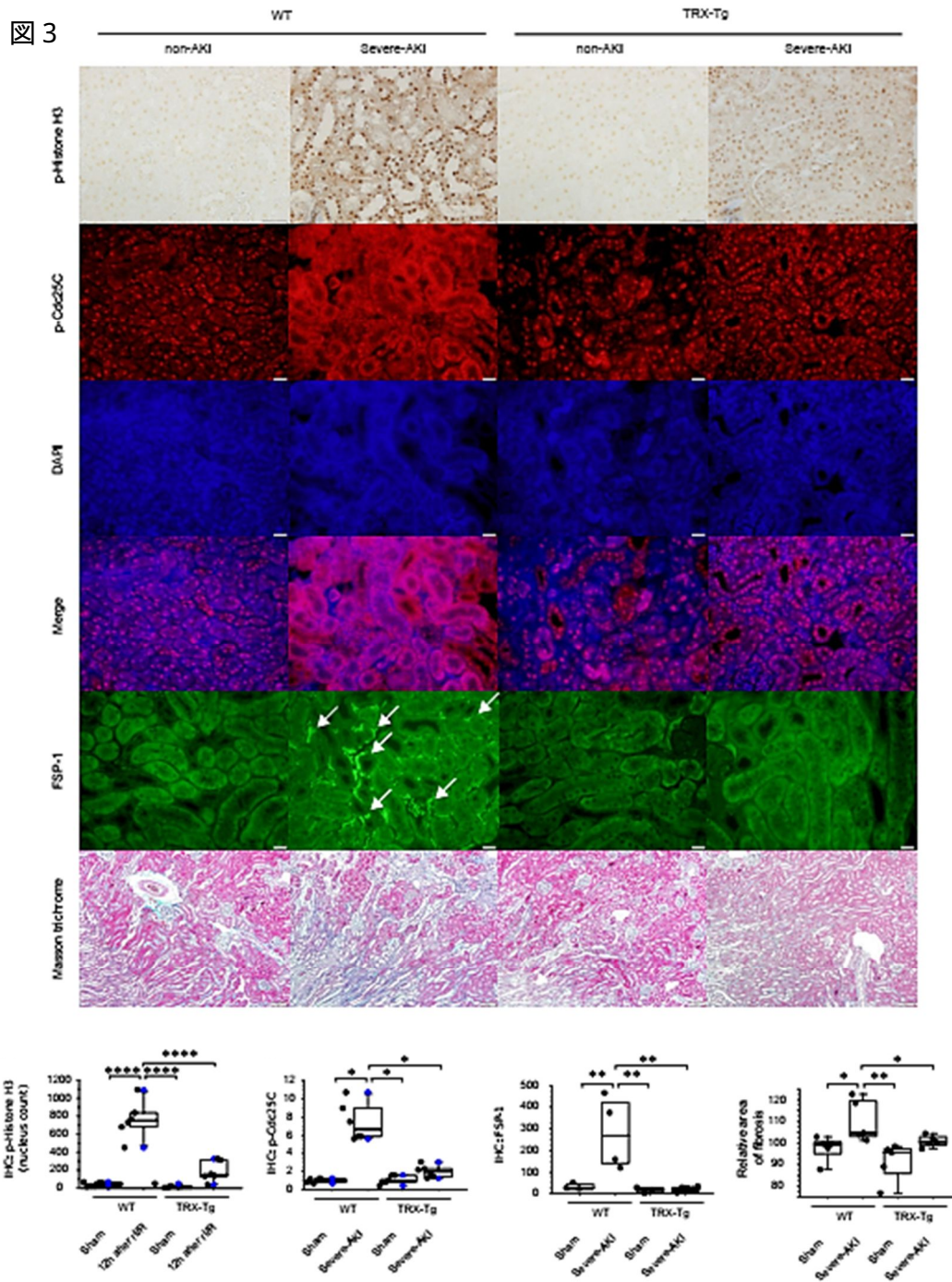
さらに、TXN 枯渇によってレドックス依存的細胞周期制御因子 Cdc25C が不活化しを介して G2/M 細胞周期停止が起こることが分かった (図 2)。

図 2



TXN 枯渇による G2/M 停止が起こる原因をより深く調べるため、ゲノム不安定性への影響を調べた。TXN 遺伝子導入マウスは野生型マウスに比べて、重症 AKI に伴う DNA 二重鎖切断マーカー H2AX の増加、DNA ダメージ応答因子 Ataxiatelangiectasiamutated (ATM) のリン酸化、p53

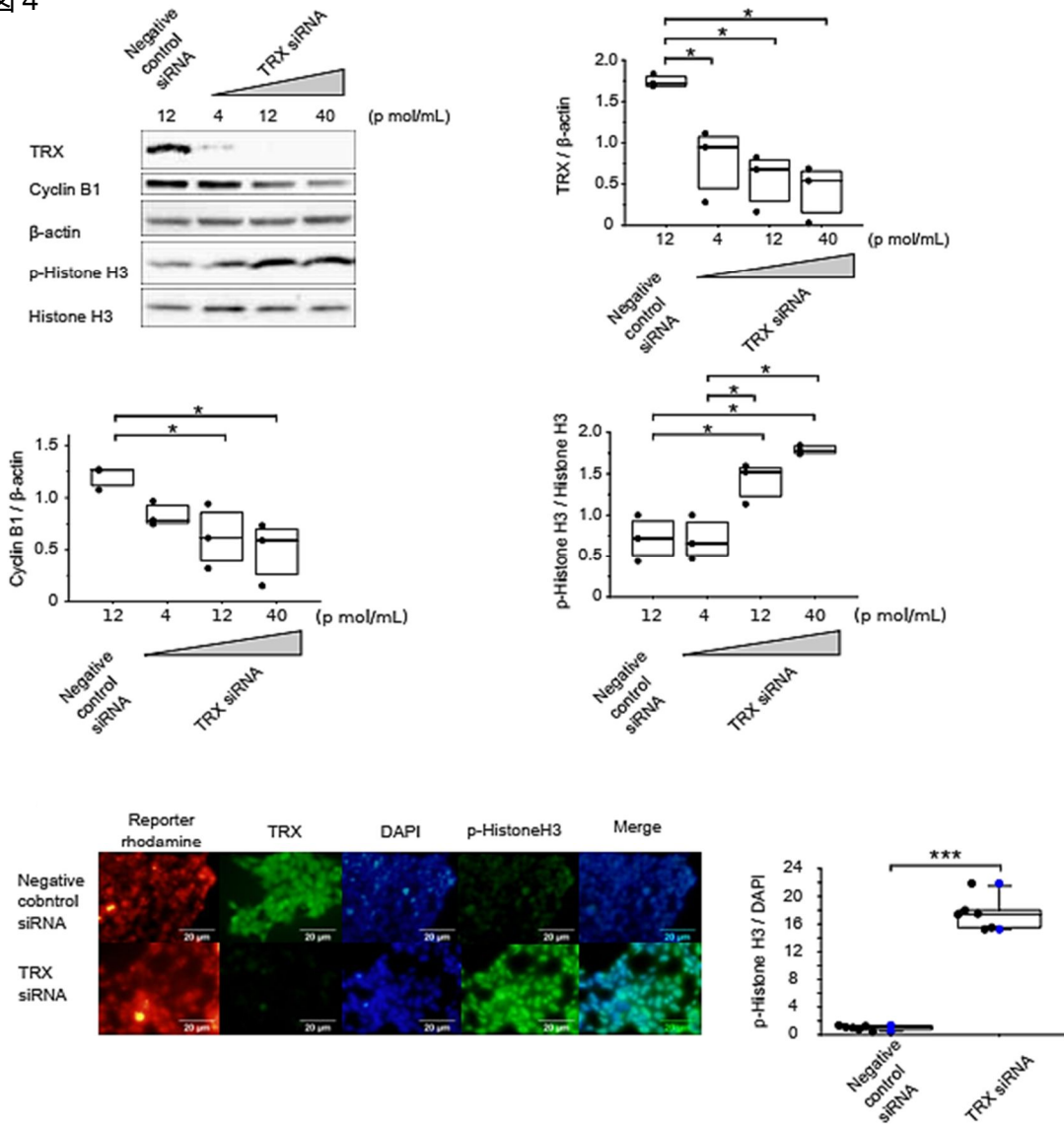
発現量の増加、G2/M 停止マーカー-p-Histone H3、腎間質線維化の増加が抑制された ( 図 3 )



さらに培養腎上皮細胞で TXN をノックダウンすると p53 の発現量が増加し、G2/M 停止が増加し、間質線維化促進因子 TGF mRNA、CTGF mRNA が増加した ( 図 4 )。

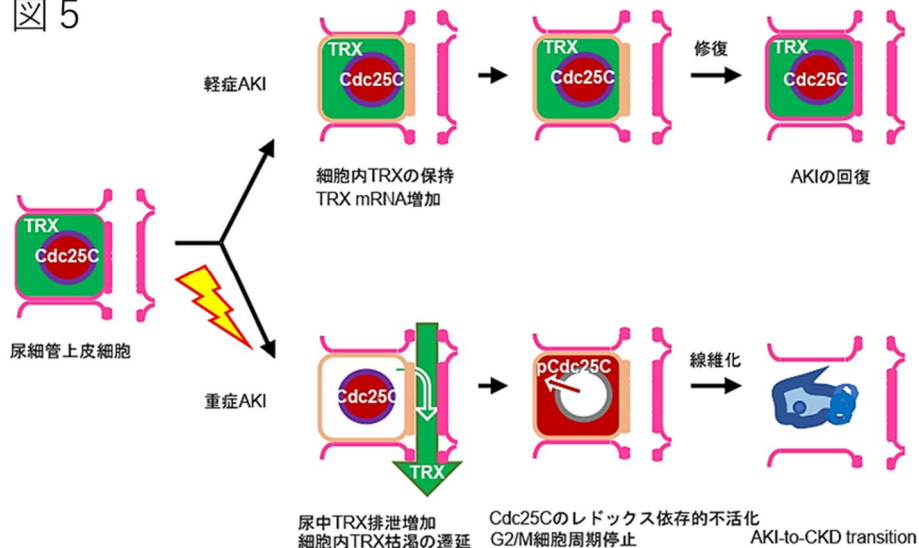


図 4



これらの結果から、重症のAKIでは尿細管内TXNの枯渇によりCdc25Cの不活化に加えてゲノム不安定性が遷延して、H2AXが増加し、p53の発現量が増加し、ATMのリン酸化が増加し、AKIからCKDへの移行を促進することが示唆された。TXNの過剰発現はCdc25Cの不活化、ゲノム不安定性、H2AX増加、p53の増加し、ATMのリン酸化を抑制し、AKIからCKDへの移行を阻止できることがわかった(図5)。

図 5



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 Hara A, Wada T, Muso E, Maruyama S, Kasuno K, Kobayashi S et al.	4. 巻 52
2. 論文標題 Effect of Low-Density Lipoprotein Apheresis on Quality of Life in Patients with Diabetes, Proteinuria, and Hypercholesterolemia.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Purif	6. 最初と最後の頁 373-381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000527900.	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Shimamoto Y, Kasuno K, Iwano M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Intrarenal corpuscular multinucleated giant cells in ANCA-associated vasculitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 197-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-022-02279-w.	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Nishikawa S, Takahashi N, Nishikawa Y, Yokoi S, Morita S, Shimamoto Y, Sakashita S, Nishimori K, Kobayashi M, Fukushima S, Mikami D, Kimura H, Kasuno K, Naiki H, Iwano M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fanconi syndrome in an elderly patient with membranous nephropathy during treatment with the immunosuppressant mizoribine.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CEN Case Rep	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13730-022-00715-0.	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kenji Kasuno, Junji Yodoi, Masayuki Iwano	4. 巻 36
2. 論文標題 Urinary Thioredoxin as a Biomarker of Renal Redox Dysregulation and a Companion Diagnostic to Identify Responders to Redox-Modulating Therapeutics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants and Redox Signal	6. 最初と最後の頁 1051-1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2021.0194	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 -

1. 著者名 Hideki Kimura, Kazuko Kamiyama, Toru Imamoto, Izumi Takeda, Shinya Masunaga, Mamiko Kobayashi, Daisuke Mikami, Naoki Takahashi, Kenji Kasuno, Takeshi Sugaya, Masayuki Iwano	4. 巻 -
2. 論文標題 Fenofibrate reduces cisplatin-induced apoptosis by inhibiting the p53/Puma/Caspase-9 pathway and the MAPK/Caspase-8 pathway rather than by promoting autophagy in murine renal proximal tubular cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics 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) 10.1016/j.bbrep.2022.101237	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西川翔、糟野健司、西森一久、西川雄大、森田紗由、小林麻美子、福島佐知子、高橋直生、木村秀樹、岩野正之
2. 発表標題 急性腎障害の重症度依存的レドックス破綻機序とDNAダメージ応答経路の活性化
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西川翔、糟野健司、西森一久、松田航平、福島佐知子、西川雄大、森田紗由、小林麻美子、三上大輔、高橋直生、木村秀樹、岩野正之
2. 発表標題 急性腎障害によるレドックス制御破綻はゲノム不安定性を誘発して慢性腎臓病への移行を促進する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 糟野健司、横井靖二、島本侑樹、坂下紗弓、西森一久、西川雄大、森田紗由、小林麻美子、三上大輔、福島佐知子、高橋直生、木村秀樹、岩野正之
2. 発表標題 レドックス制御破綻を介した新たなAKI-to-CKD transitionのメカニズム
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山縣邦弘、南学正臣	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 400
3. 書名 腎疾患・透析最新の治療2023-2025	

〔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	岩野 正之  (Iwano Masayuki)  (20275324)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授   (13401)	
研究分担者	高橋 直生  (Takahashi Naoki)  (30377460)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教   (13401)	
研究分担者	三上 大輔  (Mikami Daisuke)  (90464586)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教   (13401)	

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