

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11186

研究課題名(和文)腎に発現するTRPチャネルの温熱プレコンディショニングに対する役割

研究課題名(英文)Role of renally expressed TRP channels in thermal preconditioning

研究代表者

岩下 佳弘 (Iwashita, Yoshihiro)

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：70623510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス実験でcisplatin投与前の温熱プレコンディショニングが尿管傷害を軽減する効果が確認され、そのメカニズムを解明するため、熱受容体TRPV4とシャペロン蛋白質HSP27に焦点を当てた研究を行った。ラットの近位尿管細胞でTRPV4を阻害またはHSP27をノックダウンすることで、温熱プレコンディショニング後のcisplatin曝露による細胞傷害、炎症、アポトーシスの影響を評価した。結果、TRPV4の活性がHSP27の誘導を介して細胞保護に寄与していることが示された。これにより、TRPV4とHSP27が温熱プレコンディショニングによる腎細胞保護の鍵因子であ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

この研究は、温熱プレコンディショニングが薬剤誘発性の腎傷害を軽減する可能性を示している。特に、温熱療法がTRPV4とHSP27の活性化を通じて腎臓保護のメカニズムを強化することが明らかになり、腎臓リハビリテーションにおける新たなアプローチとしての潜在性が示された。今後さらなる研究が必要であるが、薬剤投与前の予防的介入として温熱療法を組み込むことで、薬剤による副作用を軽減できる可能性がある。これは患者のQOL向上に貢献し、医療現場での非薬物療法の選択肢を広げることに繋がる。

研究成果の概要(英文)：After confirming the protective effects of thermal preconditioning(TP) against cisplatin-induced tubular injury in a rat model, we focused on the thermoreceptor TRPV4 and the chaperone protein HSP27 to elucidate the underlying mechanism. By pharmacologically inhibiting TRPV4 or knocking down HSP27 in rat proximal tubular cells, we assessed the impact on cell injury, inflammation, and apoptosis following cisplatin exposure after TP. Our findings indicate that TRPV4 activity enhances cytoprotection through the induction of HSP27, suggesting that TRPV4 and HSP27 play critical roles in protecting renal cells via TP.

研究分野：腎臓リハビリテーション

キーワード：tubular injury cisplatin thermal preconditioning TRPV4 HSP27

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 28 年度第 4 回診療報酬調査専門組織・DPC 評価分科会資料によればシスプラチンは癌疾患の約 84% で使用されるほど汎用性の高い抗癌剤である。その一方で重大な副作用が知られており、薬剤性腎障害の約 16% がシスプラチンを主体とした抗腫瘍薬による発症である(薬剤性腎障害診療ガイドライン, 日腎会誌, 2016)。そのため、容量依存性に急性腎障害を生じるため使用量は制限されている(Kuhlmann MK, et al. Nephrol Dial Transplant, 1997)。

申請者らはマウスを用いた実験でシスプラチン注射前の温熱プレコンディショニングがシスプラチン誘発性腎障害を有意に軽減することを確認した(図 1)。この結果は、温熱プレコンディショニングの実施から約 6 時間後にシスプラチンを注射した場合に認められたが、温熱プレコンディショニングの実施から 2~3 時間後にシスプラチンを注射した場合には認められなかった。温熱プレコンディショニングの実施タイミングによって効果が変わるという点も大変興味深い。まず、単回介入の MSTP による作用機序は何なのか解明することが、従来からの温熱治療の使い方のブレイクスルーにつながる可能性があり、新たな活用を探索する重要な基礎知見となる。

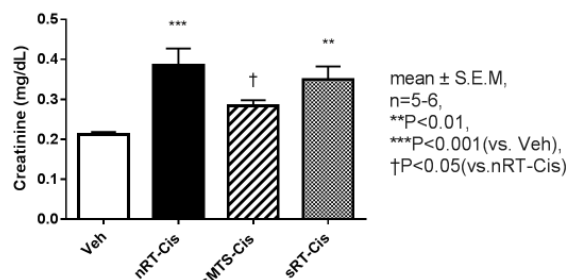


図1.シスプラチン誘発性腎障害へのMTS前処置による抑制

2. 研究の目的

これまでの研究において、腎組織に発現する熱受容蛋白質である TRP channel が温熱プレコンディショニングの実施によるシスプラチン誘発性腎障害の軽減との関係については解明されていない。申請者らは動物および細胞実験により、MSTP によるシスプラチン誘発性腎障害の軽減機序の解明に向けて、温熱刺激による HSP 発現、酸化ストレス、炎症、Apoptosis 等に対する TRP channel の役割を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

熱刺激による HSP の誘導は TRP channel の関与が示唆されているが、TRP channel を介した HSP 発現に至る経路の解明には至っていない(Hsu WL, et al. Biophysics, 2015)。申請者らが用いる熱強度は直腸温を 39-40 に上昇させる。この温度帯で活性化する可能性のある熱受容体としては TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPM2 が考えられる。腎臓尿細管細胞には TRPV1, TRPV4 の発現が認められており、主たるターゲットになると考えられる。ラット腎近位尿細管上皮細胞(NRK52E)を用いて、TRPV1、または TRPV4 チャンネルを薬理的に阻害し 39-40 の温熱刺激を行い、腎保護との関連が示唆されている HSP、炎症、Apoptosis 等の関連遺伝子や蛋白質の発現変動を解析した。

TRPV1/V4 阻害剤の添加: NRK52E に対して温熱刺激の 30 分前に TRPV1 阻害剤(AMG9810)、TRPV4 阻害剤(HC-067047)をそれぞれ添加する。通常の培地のまま培養した NRK52E をコントロールとする。

尿細管細胞に対する温熱刺激の実施: 恒温器で培地温度を 39.5-40.0 に調節し、30 分間、温熱刺激する。培地温度調節はステンレス容器に入った滅菌水を 39.5-40.0 まで加温し、そこに培養シャーレを浸して加温する。温熱刺激後は 37.0 に設定している恒温器にて、6 時間培養を行い mRNA および蛋白質の回収を行う。コントロールは 37.0 に温度を保った恒温器で培養する。

最終評価: 温熱刺激から 6 時間後に mRNA および蛋白質 (HSP、酸化ストレス、炎症、Apoptosis 等に関わる分子)を回収して評価する。PCR、ウエスタンブロッティングにより遺伝子発現やタンパク質発現の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 温熱プレコンディショニングのタイミングによる細胞生存率の変化

シスプラチン添加による NRK52E 細胞の生存率はコントロールに比して有意に低下した($p < 0.001$)。シスプラチン添加と温熱刺激を同時に実施しても、温熱刺激の効果はほぼ得られず、細胞生存率の有意に低下した($p < 0.01$ vs. control)。シスプラチン添加の 6 時間前の温熱プレコンディショニングは有意に細胞生存率を高めた($p < 0.001$ vs. cis)。尿細管傷害マーカーである KIM-1 mRNA の発現においても同様の結果であった。

(2) TRPV4 薬理的阻害による温熱プレコンディショニングの細胞保護効果の減少

シスプラチン添加による NRK52E 細胞の生存率の有意な低下は、温熱プレコンディショニングを行うことで 100% を維持した。しかしながら、HC067047 により TRPV4 を阻害することに

よって、その効果はキャンセルされた。KIM-1mRNA の発現においても同様の結果であった。

シスプラチンの添加は、NRK52E 細胞のアポトーシス経路の活性を示す Cleaved-caspase3 の有意に増加させた($p < 0.001$ vs. control)。温熱プレコンディショニングは Cleaved-caspase3 を有意に半減させた($p < 0.01$ vs. cis)。これに対して、HC067047 による TRPV4 阻害はシスプラチン添加と同程度の Cleaved-caspase3 の増加が認められた(ns. vs. Cis)。

(3)TRPV4 阻害による HSP27 発現の減少

温熱プレコンディショニングは NRK52E 細胞の Hsp27 発現を有意に増加させた($p < 0.0001$ vs. control)。温熱プレコンディショニングを行わずに HC067047 のみを添加しただけでは Hsp27 の発現に差は認められなかったが、HC067047 添加後に温熱プレコンディショニングを行っても Hsp27 の増加は認められなかった(ns. vs. control)。

TRPV4 をノックダウンは、コントロールに認められた Hsp27mRNA の発現を有意に低下させた($p < 0.01$ vs. control)。温熱プレコンディショニングによる Hsp27mRNA の増加は TRPV4 のノックダウンさせた NRK52E 細胞では発現の増加が認められなかった(ns. vs. control, $p < 0.001$ vs. NC+TP)

我々の温熱プレコンディショニングに用いた熱強度と刺激時間は、Hsp70 の発現を増強させることはなく、TRPV4 の薬理的阻害やノックダウンによってもコントロールとの差は認められなかった。

(4) TRPV4 の薬理的阻害による IL-6 の増加

NRK52E 細胞へのシスプラチン添加は、TNF- α や IL-6mRNA の発現を有意に増加させた($p < 0.001$ vs. control)。温熱プレコンディショニングはシスプラチン添加による TNF- α や IL-6mRNA のそれを有意に抑制した($p < 0.01$ vs. cis)。HC067047 による TRPV4 の薬理的阻害は、温熱プレコンディショニングによる IL-6 の発現効果をキャンセルした($p < 0.05$ vs. TP+cis)。しかしながら TNF- α mRNA の発現はキャンセルされなかった(ns. vs. TP+cis)。

(5)Hsp27 のノックダウンによる温熱プレコンディショニングの細胞保護効果の減少

シスプラチン添加による NRK52E 細胞の生存率の有意な低下($p < 0.001$ vs. control)は、温熱プレコンディショニングを行うことで細胞生存率は有意に上昇した($p < 0.01$ vs. cis)。しかしながら、Hsp27 のノックダウンによって、その効果はキャンセルされた(ns. vs. cis, $p < 0.01$ vs. TP+cis)。

(6) Hsp27 のノックダウンによる TNF- α の発現増加

温熱プレコンディショニングはシスプラチン添加による TNF- α の増加を有意に減少させた($p < 0.01$ vs. cis)。Hsp27 をノックダウンさせた NRK52E 細胞においては、温熱プレコンディショニングの効果が得られず、シスプラチンを添加したものと同等の TNF- α の増加が認められた(ns. vs. cis, $p < 0.01$ vs. TP+cis)。その一方で、Hsp27 のノックダウンはシスプラチン添加による IL-6 の増加をコントロールと同レベルまで有意に減少させた(ns. vs. control, $p < 0.001$ vs. cis)。その効果は温熱プレコンディショニングによる IL-6 の発現抑制効果を有意に上回るものであった($p < 0.001$ vs. TP+cis)。

我々は、温熱プレコンディショニングが細胞レベルでシスプラチンによる傷害を軽減させることを確認した。温熱プレコンディショニングが TRPV4-Hsp27 経路を介して細胞保護に作用することを明らかとなった。その効果はアポトーシスの軽減、炎症性サイトカインの発現の軽減にを伴うことが示唆された。

シスプラチンは、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインを増加させ、温熱プレコンディショニングはこれらの増加を軽減した。HC067047 による TRPV4 阻害によって、この効果がキャンセルされると仮定し、IL-6 の発現は想定した結果であったのに対して、TNF- α では温熱プレコンディショニングの効果はキャンセルされず、低い発現レベルが維持された。TRPV4 の阻害が、シスプラチンによる TNF- α の発現を軽減させた可能性がある¹⁾。骨芽細胞を用いた実験において、TNF- α 刺激に伴う IL-6 の増加に Hsp27 の関与が示唆されている²⁾。これは、今回我々が示した Hsp27 のノックダウンによって IL-6mRNA の発現が減少したことを支持していると考えられた。

結論として温熱プレコンディショニングは、尿管細胞保護に寄与し、効果的に障害を軽減できる可能性がある。

引用文献

- 1) Liu W, et.al. TRPV4 antagonist suppresses retinal ganglion cell apoptosis by regulating the activation of CaMKII and TNF- α expression in a chronic ocular hypertension rat model. *Int Immunopharmacol.* 2024 ; 130 : 111811.
- 2) Kato K, et.al. Role of HSP27 in tumor necrosis factor- α -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Int J Mol Med.* 2011 ; 28 (5): 887-893.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田曙、桑原孝成、岩下佳弘、杉本和樹、山田しょう子、飯山準一、向山政志
2. 発表標題 温熱プレコンディショニングによるシスプラチン腎症の軽減効果および熱受容に対するTRPV4の役割
3. 学会等名 第87回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中志穂、前田曙、北島愛都、岩下佳弘、飯山準一
2. 発表標題 温熱プレコンディショニングによるcisplatin尿管細胞傷害に果たすオートファジーの応答
3. 学会等名 第13回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩下佳弘
2. 発表標題 腎障害に及ぼす温熱の分子メカニズム
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本和樹
2. 発表標題 温熱刺激による腎皮質血流量の 変動に対するTRPV4 チャネルの関与
3. 学会等名 第86回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 曙
2. 発表標題 温熱プレコンディショニングによるシスプラチン腎症の軽減効果および熱受容に対するTRPV4の役割
3. 学会等名 第87回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

内部障害リハビリテーション研究室 https://jinreha.jp/index.php

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	桑原 孝成 (Kuwabara Takashige) (00393356)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	飯山 準一 (Iiyama Junichi) (00398299)	熊本保健科学大学・保健科学部・教授 (37409)	

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1件

国際研究集会 World Physiotherapy Congress 2021	開催年 2021年～2021年
---------------------------------------------	--------------------

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