

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591182

研究課題名(和文) 老化が慢性腎臓病の発症・進展に及ぼす影響と機序の解明

研究課題名(英文) Role of p53 in Chronic Kidney Disease

研究代表者

浜野 有記 (Hamano, Yuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90396680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：p53欠損マウスおよび野生型マウスに半月体形成性糸球体腎炎を誘導することにより、腎疾患における老化関連因子p53の役割を検討した。p53欠損マウスでは腎炎の誘導による腎障害の悪化が、野生型マウスよりみられた。糸球体内における細胞増殖や細胞外基質の増加が、p53欠損マウスの腎障害の悪化に関与していた。野生型マウスに内因性p53の阻害薬を投与する実験においてもコントロール群と比較して腎障害の悪化がみられ、p53の腎保護的な役割が明らかとなった。さらに、細胞周期G1/S期に関与するサイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)の活性化がp53欠損マウスの腎障害の悪化に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis (GN) was induced in p53-null (KO) and wild-type (WT) mice. In the experiment to test the effect of pharmacological inhibition of p53, WT mice were administered pifithrin-alpha with the injection of anti-mouse GBM serum. Serum creatinine levels (Scr) were significantly elevated in nephritic KO mice compared with nephritic WT mice. In the kidney of nephritic KO mice, glomerular and interstitial cells were proliferated with extracellular matrix expansion. The proliferative change in the nephritic KO mice was accompanied by the activation of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2). Similarly, the pharmacological inhibition of p53 in nephritic WT mice led to the increased cell proliferation and CDK2 activation, which were completely reversed by roscovitine, a selective CDK2 inhibitor. These findings indicate that endogenous p53 inhibits the excessive proliferative responses and regulates extracellular matrix homeostasis during anti-GBM GN.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：p53 Anti-GBM Disease CDK2

1. 研究開始当初の背景

p53は細胞増殖・アポトーシス・細胞老化において重要な役割を担うことが知られている。細胞ストレスやDNA損傷に伴うp53の活性化は、細胞周期停止・細胞のアポトーシスや老化の誘導をもたらす。さらに、p53は低酸素・炎症・放射線照射などにおいても活性化される。p53は癌抑制遺伝子としても知られ、その欠損や変異は放射線や化学療法による癌アポトーシスの誘導を抑えるため、治療抵抗性の原因となる。

腎臓病における内因性p53の役割に関しては、尿細管間質障害モデルである腎虚血モデル・アリストロキア酸腎症モデル・シスプラチン腎症モデルにおいて、尿細管アポトーシスの誘導から腎機能の悪化をもたらすことが報告されている(1-3)。

2. 研究の目的

本研究において、糸球体の炎症を主体とした免疫複合体型糸球体腎炎におけるp53の役割を明らかにする。その代表である加速型馬杉腎炎モデルは、半月体形成や間質線維化に伴う不可逆性急性および慢性腎障害をもたらすことが知られている。この腎障害においても他の腎疾患と同様に、p53がアポトーシスの誘導に伴う腎機能悪化に繋がるかどうか検討する。

3. 研究の方法

本研究では、米国 Jackson Laboratory より購入した C57BL/6J マウス由来の p53 欠損マウス (KO) および野生型マウス (WT) を用いた。すべての実験は、千葉大学における動物実験・遺伝子組換え実験審査委員会より承認されている。

それぞれのマウスに 250 μ g の正常ウサギ IgG を完全 Freund adjuvant とともに皮下投与し、5 および 6 日後に計 300 又は 500

μ L のマウス糸球体基底膜に対する抗体を含むウサギ血清を静脈投与した。抗血清の投与7、12日後に血液・尿・腎組織を採取し、以下の解析を行なった。

腎機能検査として血清クレアチニン (Scr) を測定、尿蛋白量として尿中アルブミン/クレアチニン比を用いた。腎組織はホルマリン固定・パラフィン包埋後に periodic acid-Schiff (PAS) ・ periodic acid-methenamine-silver (PAM) ・ マッソントリクローム ・ hematoxylin and eosin (HE) 染色を行なった。それらの標本を顕微鏡にて観察し、半月体を伴う糸球体の割合、糸球体の細胞数、障害された尿細管の割合、間質における線維化領域の割合を定量化した。

腎組織の凍結切片を用いて細胞アポトーシスおよび細胞増殖を検討した。アポトーシスが生じた細胞核は、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 法により検出、定量化した。腎組織における細胞増殖は、以下に示すような 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 法を用いた。BrdU (30 mg/kg) をマウスの静脈内に投与し、1時間に BrdU に対する抗体にて検出、定量化した。

腎組織における cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) の検出のために、以下の方法を用いた。凍結腎組織より RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。その cDNA をテンプレートとして CDK2 プライマー (forward: GAG TCC CTG TCC GAA CTT ACA CTC A reverse: GTG GAG TAG TAC TTG CAG CCC AGA A) 、 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) プライマー (forward: ATG GGG TGA GGC CGG TGC TG reverse: CTT GAT GTC ATC ATA CTT GG) を用いて、PCR 法を行なった。CDK2 の発現量は GAPDH によって補正した。

統計学的な解析として、2群の比較には、Student t-test または Mann-Whitney test を、3群以上の比較には ANOVA を行ない、必要時には Bonferroni 補正を伴う *t* test を追加した。 *p*-value<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

腎炎を誘導した p 5 3 欠損マウス (KO) および野生型マウス (WT) の糸球体基底膜において、ウサギ IgG、マウス IgG、補体 C3 の沈着に差がみられなかったことから、両群において腎炎は等しく誘導されていた。誘導後 7 日目における尿中アルブミン量 (UAE)、誘導後 7 および 12 日目における血清クレアチニンは、p 5 3 欠損マウスにおいて有意に増加していた (図 1)。p 5 3 の 1 アレルの欠損 (HET) だけでは、腎機能に影響はみられなかった。

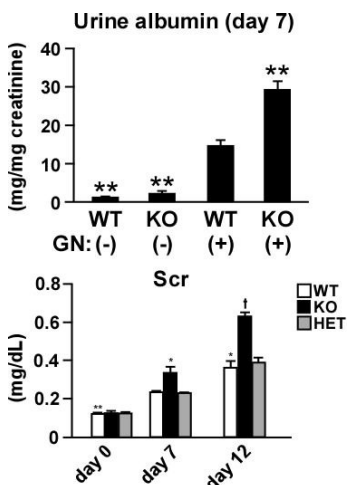


図 1. GN: 加速型馬杉腎炎, ***p*<0.01, compared to WT (+) or WT-day 7, **p*<0.05, compared to WT-day 7, †*p*<0.05, compared to WT-day 12.

誘導 7 日目の p 5 3 欠損マウスの糸球体における病理組織学的検討では、野生型マウスに比べて、半月体形成率や細胞数の増加を認めた。尿細管・間質においても、p 5 3 欠損マウスにおいて、障害された尿細管の増加・間質線維化領域の拡大がみられた (図 2)。

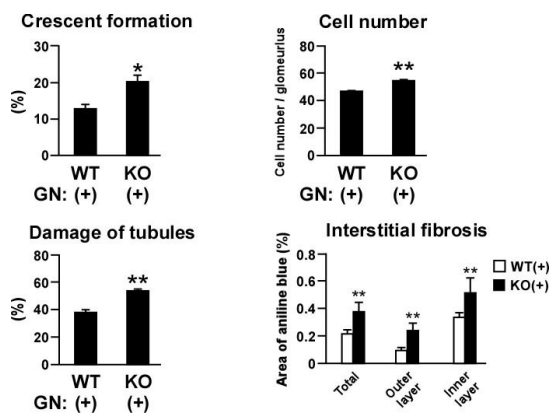


図 2. ***p*<0.01, compared to WT (+), **p*<0.05, compared to WT (+).

p 5 3 欠損マウスにおいてみられた糸球体の細胞数増加が、細胞増殖に依るものかそれとも細胞浸潤に依るものかを調べるために、BrdU 法を行なった。その結果、p 5 3 欠損マウスの糸球体において、増殖を示す BrdU 陽性細胞の増加がみられた。そこで、細胞周期 G1/S 期に関する CDK2 の遺伝子発現を p 5 3 欠損マウスの腎皮質を用いて測定したところ、野生型マウスに比べて有意に増加していた (図 3)。一方、これまで他のモデルにて p 5 3 が関与したアポトーシスは、両群において有意差はみられなかった。

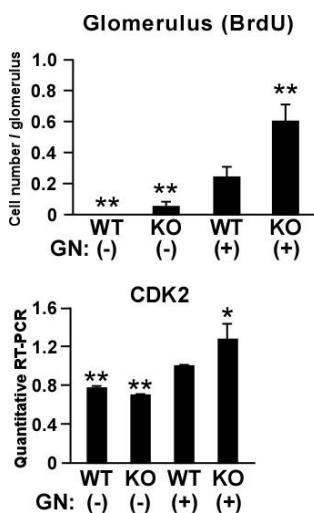


図 3. ***p*<0.01, compared to WT (+), **p*<0.05, compared to WT (+).

p 5 3 欠損マウスの一部の胎児において、

腎臓・尿管に先天性異常が認められることが報告されている。特に、p53はウォルフ管からの尿管芽の誘導を含む後腎分化に関与している(4)。本モデルにおける腎障害悪化とp53欠損に伴う先天性異常の関連性を調べるために、野生型マウスを用いて、腎炎誘導時にp53阻害薬であるpifithrin- α を投与する実験を行なった。p53欠損マウスを用いた実験と同様に、p53阻害薬は血清クレアチニンの増加をもたらした(図4)。以上の結果より、加速型馬杉腎炎モデルにおいて、内因性p53は腎機能を保護する役割を担っていることが明らかとなった。

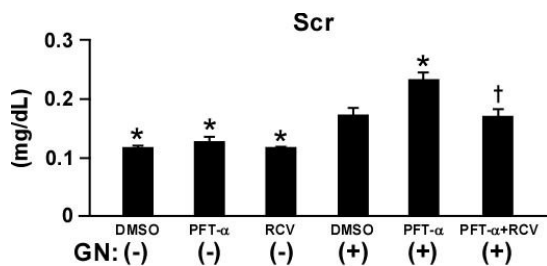


図4. PFT- α : pifithrin- α , RCV: roscovitine, * p <0.05, compared to DMSO (+), † p <0.05, compared to PFT- α (+).

p53欠損マウスと同様にCDK2の遺伝子発現は、pifithrin- α によるp53の阻害により、有意に増加していた(図5)。

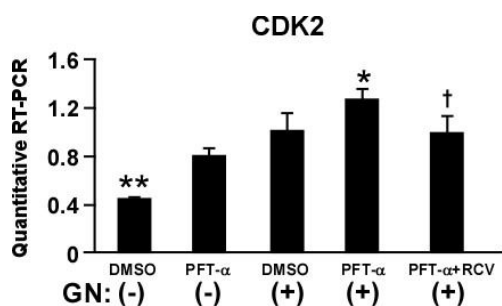


図5. ** p <0.01, compared to DMSO (+), * p <0.05, compared to DMSO (+), † p <0.05, compared to PFT- α (+).

本モデルにおけるCDK2の役割をさらに

検討するために、野生型マウスにpifithrin- α を投与する際に、選択的CDK2阻害薬であるroscovitineを投与し、腎機能に与える影響を検討した。roscovitineの投与により(PFT- α +RCV)、投与しない群(PFT- α)に比べて、有意にCDK2発現量が低下したことから、本モデルにおいてroscovitineがCDK2を阻害していることが示された(図5)。さらに、roscovitineはp53の阻害によって悪化した腎障害を改善させることが明らかとなった(図4)。以上の結果より、p53による腎保護効果は、p53によるCDK2の抑制を介してもたらされていると考えられた。

加速型馬杉腎炎モデルにおいて、内因性p53は、細胞周期の制御を介して炎症反応や細胞外基質の恒常性に関与していることから、p53やCDK2を標的とする薬剤は、免疫複合体型糸球体腎炎に対する有用な治療薬となり得ると考えられる。

1. Fujino, T, Muhib, S, Sato, N, Hasebe, N: Silencing of p53 RNA through transarterial delivery ameliorates renal tubular injury and downregulates GSK-3 β expression after ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Renal physiology*, 305: F1617-1627, 2013.
2. Wei, Q, Dong, G, Yang, T, Megyesi, J, Price, PM, Dong, Z: Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *American journal of physiology Renal physiology*, 293: F1282-1291, 2007.
3. Zhou, L, Fu, P, Huang, XR, Liu, F, Lai, KN, Lan, HY: Activation of p53 promotes renal injury in acute aristolochic acid nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21: 31-41, 2010.
4. Saifudeen, Z, Dipp, S, Stefkova, J, Yao, X, Lookabaugh, S, El-Dahr, SS: p53 regulates metanephric development. *Journal of the*

American Society of Nephrology : JASN, 20:
2328-2337, 2009.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者
には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

浜野有記、木村亮太、宇田川由紀、上田善彦、横須賀收、小川 真

p53 Deficiency Exacerbates
Immune-Medial Glomerulonephritis.

Kidney Week 2011, 2011 年 11 月 12 日, フ
ィラデルフィア、米国

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記すべきことなし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浜野 有記 (Hamano, Yuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 90396680

(2) 研究分担者

小川 真 (Ogawa, Makoto)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号 : 50241956