

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790945

研究課題名（和文） 急性腎障害におけるトロンビン切断型オステオポンチンの役割と抑制効果の解明

研究課題名（英文） The role of thrombin cleaved osteopontin in ischemic reperfusion renal injury models

研究代表者

入田 純 (Irita Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師（病院教員）

研究者番号：00423442

研究成果の概要（和文）：虚血再灌流モデルを用いた急性腎障害において，炎症性サイトカインであるオステオポンチン（OPN）の役割を解明することが本研究の目的である．結果 OPN 欠損マウス群では，野生型マウス群と比較して，虚血再灌流による腎障害は有意に軽減していた．さらに OPN 欠損マウスでは，急性腎障害時に増加するアポトーシスが有意に抑制された．また私たちは初めてトロンビンによって切断された OPN の発現を本モデルにおいて確認した．以上より，急性腎障害の病態形成に OPN が深く関与しており，OPN を制御することが腎保護効果をもたらす可能性が示唆された．

研究成果の概要（英文）：Osteopontin (OPN) has been implicated in the pathology of several renal conditions. The aim of the present study was to clarify the roles of OPN in acute renal injury into either wild type (WT) or OPN knockout mice (OPN^{-/-}). We used ischemia-reperfusion models to exaggerate acute renal injury. We demonstrated for the first time that thrombin cleaved OPN was expressed in acute kidney injury models. These results indicate OPN is a promoter of ischemia-induced apoptosis in the kidney and suggest that inhibition of OPN may be a potential therapeutic target for prevention of acute renal injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：急性腎障害、オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスであるオステオポンチン (OPN) は、炎症性サイトカインとしての機能を有し、腫瘍転移、関節リウマチ、劇症肝炎、動脈硬化、腎線維化などに深く関与している。OPN の分子構造中の GRGDS 配列は・v・1を含む少なくとも6つのインテグリンや CD44 と会合する。このように複数の異なる細胞膜受容体と会合することで、OPN は炎症、細胞接着など多様な作用を示す。さらに、OPN は組織にてトロンビンにより切断されるが、トロンビンで切断された N 末端側 OPN が、SVVYGLR 配列を介して (マウスでは SLAYGLR 配列)、・9・1 または・4・1 インテグリンとの会合を可能とする。このように、OPN はトロンビンにより切断されることで新たな作用を発現することが可能である。このトロンビン切断型 OPN は、関節リウマチや劇症肝炎の炎症惹起に重要であることが報告されている。

急性腎障害 (AKI) は虚血、腎毒性物質や感染症などにて発症し、生存率 50%前後と、その予後は極めて不良である。虚血、腎毒性物質による AKI は、病理学的には尿細管壊死や間質の浮腫を認め、その病態生理には血液凝固系の活性化や炎症が重要な役割を果たしている。その中でトロンビンが腎虚血モデルでの腎障害の進展に深く関与しており、さらに最近、血漿 OPN 濃度が AKI 患者の予後規定因子でかつバイオマーカーとなりうるとした報告がされた。これらの結果から、血液凝固系の活性化と炎症性変化を認める虚血性 AKI において、トロンビン切断型 OPN が腎障害進展に促進的に働くことが推測できる。

2. 研究の目的

以上から腎障害時における OPN の働きは徐々に明らかになりつつあるが、腎疾患にお

けるトロンビン切断型 OPN の役割は全く不明である。特に AKI は生命予後を規定する因子であり、その病態形成の背景に OPN 活性化や炎症性変化及び血液凝固異常があることが推測される。そこで本研究の目的は、虚血/再還流モデルでの AKI 進展におけるトロンビン切断型 OPN の役割とその抑制効果を解明することである。

3. 研究の方法

虚血性 AKI モデルマウスにおける N 末端側切断型 OPN の関与の検討

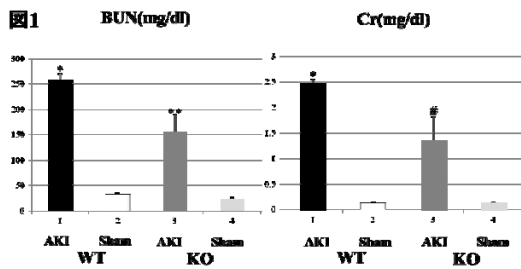
虚血/再還流による AKI モデル作製のため、C57BL/6 マウスの右腎摘出 2 週間後、左腎動脈にマイクロクリップを用いて 20 分クランプする。再還流後、48 時間経過した時点で以下の実験を行う。血清尿素窒素及びクレアチニン測定のため下大静脈から採血を行い、さらに腎臓を摘出し、腎重量を測定後、切片をホルマリン固定または凍結保存する。採尿はメタボリックゲージ内で行う。保存した腎の組織学的検討 (基本染色、免疫組織染色、PCR 法、Western blot 法) を行う。

全長型 OPN 及び N 末端側トロンビン切断型 OPN TG マウスの作製、機能的・形態的解析

C57BL/6 マウスをドナー及びレシピエントとして、CAG プロモーターを利用し、その下流に OPNcDNA、さらに SV40 由来 poly(A) テイルを連結した融合遺伝子を作製し、マイクロインジェクション法にてマウスに導入する。導入遺伝子の解析には PCR 法を用いて、F1 トランスジェニックマウスを樹立する。N 末端側トロンビン切断型 OPN 過剰発現による腎を中心とした形態的变化 (遺伝子発現は PCR 法、タンパク発現は Western blot 法、その他免疫染色法や PAS 染色などの一般染色) を野生型と比較して検討する。

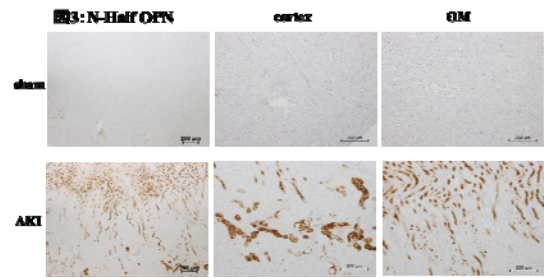
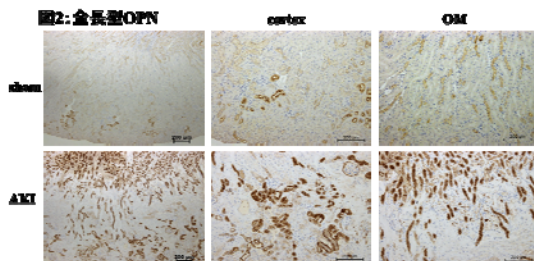
4. 研究成果

AKI モデル作成後、血清 BUN・Cr を測定し腎障害の程度を評価したところ、WT-AKI マウスで著明な血清 BUN・Cr の上昇を認めた。またこれらの腎障害は OPN KO マウスにおいては、虚血再灌流後においても有意に抑制されていた (図 1)。

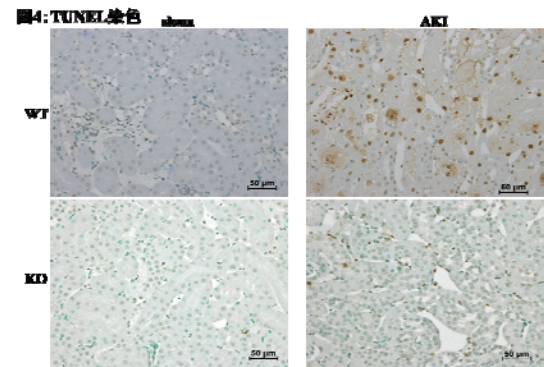


H&E 染色にて組織学的検討を行ったところ、WT-AKI マウスでは、主に腎髄質において広範囲に組織病変が観察され、尿細管壊死、尿細管拡張などの AKI における特徴ある病理所見を認めた。またこれらの組織学的変化についても OPN KO-AKI マウスにおいては、著明に抑制されていた。

Western blot 解析では、WT-AKI マウスにおいて、全長型 OPN の発現増加を認めた。興味深いごとに N-Half OPN 特異抗体を用いた Western blot 解析では、WT-AKI マウスで、N-Half OPN タンパクの発現増加を認めた。免疫組織染色では全長型 OPN (図 2) 及び N-Half OPN (図 3) とともに腎髄質外層の尿細管中心にその局在を認め、WT-sham マウスと比較して、その蛋白発現は著明に増加していた。



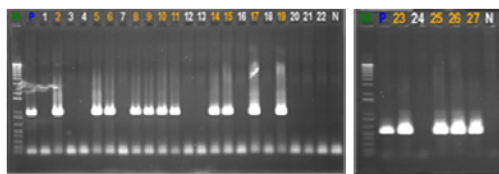
さらに TUNEL 染色法を用いて腎組織におけるアポトーシスを検討したところ、WT-AKI マウスでは WT-sham マウスと比較して、有意に TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。さらに OPN KO-AKI マウスでは、WT-AKI マウスと比較して TUNEL 陽性細胞の有意な減少を認めた (図 4)。



次に全長型 OPN 及び N-Half OPN 過剰発現マウスの作製を行った。C57BL/6 マウスをドナー及びレシピエントとして、CAG プロモーターを利用し、その下流にヒト OPNcDNA またはヒト N-Half OPN cDNA、さらに SV40 由来 poly(A) テイルを連結した融合遺伝子を作製し、マイクロインジェクション法にてマウスに導入した。導入遺伝子の解析には PCR 法を用いたところ、現在得られた 27 ラインのトランスジェニックマウスのうち全長型 OPN については 11 ライン、N-Half OPN は 5 ラインについて transgene の発現を認めた (図 5)。現在ライン間での発現レベル及び発現臓器を Western blot 解析で確認している段階で

ある。今後トランスジェニックマウスの各組織の形態的変化を野生型と比較して検討し、さらに機能的解析として、血圧、血液検査等の評価も並行して行う予定である。

図5



これら申請者の検討から、虚血再灌流マウスを用いた AKI モデルにおいて、腎尿細管を中心に著明な OPN 発現を確認した。また腎組織において、初めて N-Half OPN の発現を AKI モデルで示すことができた。OPN KO マウスでは、虚血再灌流後の腎障害が軽減されており、その機序として、アポトーシスの関与が示唆された。

以上より、生命予後の極めて不良な AKI の病態形成において OPN が深く関与している可能性が示唆された。また N-Half OPN や OPN を測定することで、AKI 患者におけるリスク層別化ができる可能性があり、将来の AKI の治療戦略を確立するうえで大きな意義を持つ研究と期待できる。

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 4 件)

1. Enomoto D, Okura T, Nagao T, Jotoku M, Irita J, Miyoshi KI, Higaki J. Relationship between Renal Hemodynamics and Urinary Type IV Collagen in Patients with Essential Hypertension. Clin Exp Hypertens. 2012. 査読有

2. Nagao T, Okura T, Irita J, Jotoku M, Enomoto D, Desilva VR, Miyoshi K, Kurata M, Matsui Y, Uede T, Higaki J. Osteopontin plays a critical role in interstitial fibrosis but not glomerular sclerosis in diabetic nephropathy. Nephron Extra. 2: 87-103, 2012. 査読有

3. Irita J, Okura T, Jotoku M, Nagao T, Enomoto D, Kurata M, Desilva VR, Miyoshi KI, Matsui Y, Uede T, Denhardt DT, Rittling SR, Higaki J. Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 301:F833-F844, 2011. 査読有

4. Kurata M, Okura T, Irita J, Enomoto D, Nagao T, Jotoku M, Miyoshi KI, Desilva VR, Higaki J. Angiotensin II receptor blockade with valsartan decreases plasma osteopontin levels in patients with essential hypertension. J Hum Hypertens. 25:333-339, 2011. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Jun Irita, Takafumi Okura, Masanori Jotoku, Tomoaki Nagao, Daijiro Enomoto, Ken-ichi Miyoshi, Jitsuo Higaki. Osteopontin Deficiency Attenuates Aldosterone induced Tubulointerstitial Fibrosis, EMT, and Oxidative Stress. The 13th China-Japan Joint Hypertension Symposium, November 4, 2011, Beijing, China.

2. 第 34 回日本高血圧学会総会 (2011 年 10 月)

20-22日：宇都宮)

入田 純、大蔵隆文、長尾知明、城徳昌典、
榎本大次郎、三好賢一、檜垣實男

アルドステロンによる尿細管間質線維化発
症機序ーオステオポンチンと EMT 及び酸化ス
トレスの関連について

[その他]

ホームページ等

[http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.m
ed2/](http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med2/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入田 純 (Irita Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師 (病院教
員)

研究者番号：00423442