

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860190

研究課題名(和文)急性腎障害におけるp21活性化および細胞老化の意義

研究課題名(英文)role of p21 activation and senescence on acute kidney injury

研究代表者

中野 大介(Nakano, Daisuke)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性腎障害における細胞周期調節因子p21活性化および細胞老化の意義について検討した。p21はプレコンディショニングなどの処置に伴い、一過性に速やかに誘導される。これにより、腎近位尿細管が一時的なG1期における細胞周期停止状態になる。この機構は一週間以内に解除される。これによりDNA修復機構が活性化され、続く急性腎障害に対して、保護的に働いていることが示された。一方で、Nrf2やHIF-1、autophagy誘導あるいはミトコンドリア活性化など、細胞周期調節作用とは独立した細胞質内における保護作用を示唆するデータは得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of p21 in acute kidney injury and ischemic preconditioning (IPC). Mice lacking p21 (p21-KO) and wild-type mice underwent renal ischemia followed by reperfusion (I/R). I/R increased p21 expression in the kidneys. The acute kidney injury was worse in p21-KO mice than in wild-type mice. The results suggest that p21 confers tolerance to I/R injury. IPC attenuated I/R injury in wild-type mice, but not in p21-KO mice. IPC decreased the number of proliferating tubular cells before I/R and increased it at 24 h after I/R in the kidney of wild-type mice. In p21-KO mice, IPC did not change the number of proliferating cells before I/R, and decreased it after I/R. IPC increased renal p21 expression and the number of cells in the G1 phase of the cell cycle before I/R. In conclusion, renal p21 is essential for the beneficial effects of renal IPC.

研究分野：薬理学

キーワード：急性腎障害 細胞周期 p21

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害による致死率は約 30%と言われており、その致死率減少が最優先課題となっている。その発症はほとんどが医学的処置（手術、薬剤投与、感染等）中に伴うもの、すなわち院内における発症であるにも関わらず、依然として、高い致死率が報告されている。その原因として、1) 医療レベル全体の向上に伴い、高齢者や重症患者など複合的な因子を持ち、かつ易感染性の患者に対しても、侵襲的な手術を行うケースが増えてきたこと、2) 輸液および透析という 2 大緊急処置に加わる、新たな予防・治療法が確立されないこと、などが挙げられる。これに対する取り組みとして、発症の可能性のある患者に対する予防的処置の確立、早期発見法の開発、そして、予後を改善する治療法の開発が行われているが、実用に至っているものは、発症マーカーが数例あるのみである。

申請者らは実験開始当初までに腎臓において細胞周期調節因子 p21 を介した腎細胞老化（生存しているが、有糸分裂を停止した状態）が、慢性的な腎障害の進展に寄与している可能性を報告している（Fan et al. *Endocrinology* 2011, Nakano et al. *Am J Hypertens* 2012, Kitada et al. *CEPP* 2012, Kitada et al. *J Diabetes Comp* 2014）。一般に、悪性腫瘍細胞における p21 活性化 / 細胞老化は抗癌現象であると言われているが、体細胞、特に腎細胞において、これらが善であるか、悪であるかは、全くと言っていいほど解明されておらず、申請者らによる業績（Fan et al. 2011）が、*in vivo* 腎における p21 活性化 / 細胞老化が、腎機能にまで影響を与えている可能性を示した最初の知見であった。さらに p21 活性化 / 細胞老化の役割を更に解明するために、申請者を研究責任者として、平成 23-24 年度文科省科学研究費課題「糖尿病性腎症における尿細管 p21 活性化の意義」、香川大学平成 24 年度若手研究「生きた動物の臓器内における細胞老化検出方法の開発」が採択され、さらに詳細な機序を解明することが出来た。一方で、上記 2 研究計画を含む、これまでの申請者の研究は、慢性的な腎障害進行における p21 活性化 / 細胞老化の役割を調べるためのもので、その急性腎障害における役割については焦点を当てていなかった。

急性腎障害はその病態として、急激な腎機能低下と尿量の減少がみられるが、これに伴う共通病理として近位尿細管細胞障害が広く認識されている。急性腎障害から回復した患者においては、致死的障害を受けた近位尿細管細胞が取り除かれ、新たに分裂・増殖した尿細管細胞が置き換わることにより、尿細管が再生される。この尿細管再生が急性腎障害における回復・良好な予後のキーポイントであると考えられている。したがって、急性腎障害において、尿細管が細胞老化を起こしていると、細胞増殖が進まないため、再生の妨げになると考えられる。事実、

teromerase や p16 (p21 とは別経路で細胞周期を止める因子) のノックアウト (KO) マウスでは急性腎障害が軽減されると報告されており (Braun ら、2012、*JASN*)、細胞老化は急性腎障害に対して負の影響をもたらすと考えられる。しかしながら、申請者らによる p21 欠損マウスを用いた予備検討では、虚血性急性腎障害は逆に増悪するとの結果を得ていた。さらに、短時間虚血により虚血耐性を獲得させる虚血プレコンディショニング (ischemic preconditioning; IPC) においても p21 が必須の働きをしているとの結果も得ていた。したがって、急性腎障害においては p21 活性化は細胞老化に直結せず、急性腎障害に対する腎保護機構において不可欠の役割を担っているのではないかと考えられた。

このような、他の細胞周期調節因子とは異なる p21 の腎保護作用について、申請者は以下の 3 つの仮説を考えた： 核内における細胞周期調節因子としての作用とは独立して、細胞保護性タンパク質と相互作用をすることにより、抗急性腎障害作用を呈している。特に、予備実験において抗酸化遺伝子の発現変化が顕著であったことから、環境ストレスに応じて抗酸化因子の発現を促す転写因子 Nrf2 との関わりを疑っている。急性腎障害に対して、生存細胞の細胞周期を一時的に停止させ、その障害を回復させることにより、死細胞数を最小限に抑制する。さらに、これは極めて重要な点であるが、急性腎障害は高齢者や様々な疾患背景を持つ患者で起こりうる病態であり、それらの患者は発症前に既に p21 発現に変化が生じていると考えられることである。このような臨床の状態に則した基礎実験は (p21 関係の検討に関わらず) 全くと言っていいほど行われておらず、発症前の p21 発現が予後に影響するか、速やかに検討する必要がある。以上のことから、急性腎障害における p21 の関わりを解明するために、本計画は立案された。

2. 研究の目的

急性腎障害における細胞周期調節因子 p21 活性化および細胞老化の意義について検討する目的で、以下に細分化された点を検討する。

核内における細胞周期調節因子としての作用とは独立して、細胞保護性タンパク質と相互作用をすることにより、抗急性腎障害作用を呈しているか、急性腎障害に対して、生存細胞の細胞周期を一時的に停止させ、その障害を回復させることにより、死細胞数を最小限に抑制するか、p21 が既に腎内で活性化している病態における急性腎障害の重症度を検討し、さらに p21 経路の薬理的誘導による急性腎不全治療が可能であるかを検討した。

3. 研究の方法

実験は主にマウスを用いた *in vivo* 実験によ

り行われた。6週齢の雄性 p21-KO マウスおよびその野生型に片腎摘を施し、10日間の回復期間を設けた。その後、残存腎を露出し、非侵襲性クレンメにより腎動静脈を30-45分閉じることにより虚血モデルを作製した。クレンメを開放し、再灌流後18、24、72および120時間後に血漿および腎組織を採取した。血漿は血中尿素窒素測定に、腎組織は mRNA 発現測定、たんぱく質発現測定、病理組織学的検討に供した。IPC は予め腎動静脈を5分間 x4 サイクルにてクランプし、15分間の回復時間の後に虚血処置を行うプロトコルにより行った。遠隔 IPC (RIPC) は下肢大腿動静脈を剥離し、同様のプロトコルにより、あるいは微修正を加えた上で行った。

血中尿素窒素は市販のキットにより (UN キット、和光) mRNA は定量性 PCR、たんぱく質は遠心分離により核分画、細胞質分画に分離し、Western blot 法にて測定した。病理組織学的検討として、hematoxylin/eosin 染色により組織形態学的障害を、免疫組織学的手法により p21 および Ki67 を観察した。

In vivo イメージングによる細胞周期および fate-tracing 解析として、2光子レーザー顕微鏡 (FV1000MPE、Olympus) を用いた。この実験には、G1 細胞周期にて赤色蛍光を発する Tg(FucciG1)#596Bsi と、ランダムに青緑黄赤のいずれかの蛍光タンパクを発現する Confetti マウスを用いた。また Fucci 陽性細胞の計測は、酵素法により細胞間結合を分解した後、フローサイトメトリーを用いた。

4. 研究成果

野生型マウスと p21-KO マウスにおいて、急性腎障害の重症度を比較したところ、p21-KO マウスにおいて、劇的に増悪していた。IPC は野生型マウスにおいては急性腎障害の軽減、生存率の向上をもたらした。しかしながら、p21-KO マウスにおいて、IPC による改善効果は消失していた (図1)。

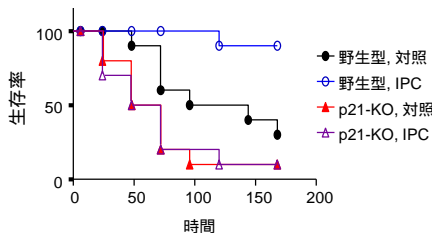


図1. p21-KOマウスにおいて、急性腎障害はより重篤に現れる。虚血性プレコンディショニング (IPC) は野生型において、利益をもたらすが、p21-KOではそれはみられない。

P21 の有無により生じる IPC の保護効果に着目し、そのメカニズムを検討した。目的において、予備検討結果から候補となっていた Nrf2 は、p21 による抗急性腎障害効果に必須の因子ではないことが示された (図2)。

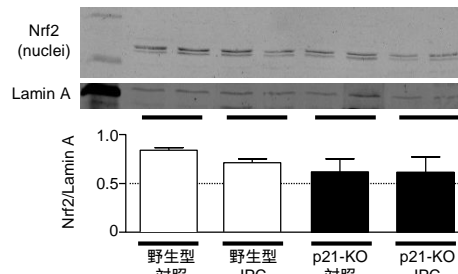


図2. 活性化Nrf2タンパク量はp21-KOマウスで減少傾向にあったが、有意なものではなかった。またIPCによる影響はみられなかった。

また他の候補因子であった HIF-1、autophagy およびミトコンドリア活性に関しても、明確な関与を示すデータは得られなかった。

一方で、仮説 に記した、細胞周期の一時的な停止作用については、その関与を示す強力な証拠が得られた。すなわち、p21 はプレコンディショニングなどの処置に伴い、一過性に速やかに誘導される (図3)。これにより、腎近位尿細管が一時的な G1 期における細胞周期停止状態になる (図4)。これにより DNA 修復機構が活性化され、続く急性腎障害に対して、保護的に働いていることが示された。ここまでの成果は国際腎臓学会の刊行する Kidney International への掲載を得るに至った。Kidney International は腎臓学のトップジャーナルの1つであり、科学への貢献度は大きい。

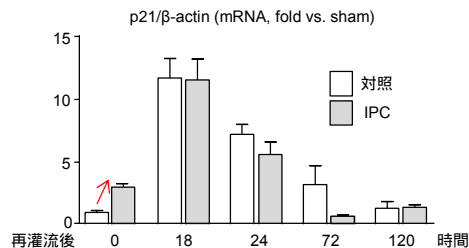


図3. 虚血再灌流によりp21は一過性にその発現が上昇する。IPCを行うことにより、IPC直後(虚血前)に既にp21発現が上昇している。

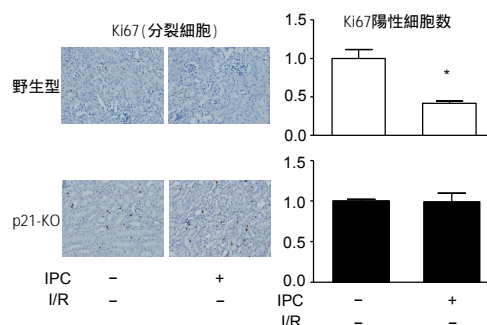


図4. 野生型にて、IPCを施すことにより、虚血開始時の腎臓において分裂細胞数の現象がみられた(上段)。一方で、p21-KOマウスにおいては、IPCによる細胞周期の停止作用はみられなかった。

上記検討により、腎プレコンディショニングにより p21 が即座に誘導されることが証明された。この誘導・活性化は3日以内に正常化するため、効果の長期的な残存による患者の不利益 (細胞周期の恒久的な停止 = 細胞

老化)を回避しやすいと考えられる。しかしながら、上記プレコンディショニングは腎動脈静脈に対するものであり、臨床応用を考えた際、極めて侵襲的である。そこで遠隔臓器に対する虚血手技により効果を期待する遠隔プレコンディショニング (Remote IPC; RIPC) を続けて行った。しかしながら、麻酔下マウス下肢大腿動脈に対する RIPC は、複数のプロトコルによる検討のいずれでも腎虚血再灌流障害を改善せず、腎臓に対する保護効果は微弱であると考えられた。

また、p21 シグナル活性化近位尿細管細胞がどのように傷害修復に働いているかを検討する目的で、fate-tracing 法による解析を試みた。Confetti マウスの近位尿細管における LoxP 配列切断を目的として、gamma glutamyl transferase-Cre マウスあるいは Phosphoenolpyruvate carboxykinase-Cre マウスの2種類とそれぞれ交配を行った。しかし、これらの近位尿細管特異的 Confetti マウスは1ネフロン中の尿細管細胞群が単一の蛍光色で占められていた。これは尿細管発生・発達が1つの尿細管芽細胞を起源としていることを示唆しており、目的とする fate-tracing への使用は不可能であった。目的の達成には、inducible Cre マウスを作製する必要があり、研究期間中での達成はならなかった。

で挙げた基礎病態の急性腎障害に与える影響だが、実験開始時に他施設から報告があり、重複を避けるために実験は中止した。その報告においては、p21 の発現を恒常的に上昇させるような病態では、急性腎障害は増悪するとの結果であり、おそらく p21 は一時的細胞周期停止ではなく、細胞老化に働いたものと思われる。薬理学的実験として、p21 活性に必要な配列のペプチドを合成し、虚血再灌流後に投与し、虚血再灌流障害からの回復に p21 ペプチドが与える影響を検討した。P21 ペプチドは腎障害に伴う線維化を抑制する傾向にあった。

これらの成果は他施設における追試でも確認されており (Pabla et al. PNAS 2015) 今後の急性腎障害克服のための科学に大きく資するものと思われる。

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 1 件)

1. Nishioka S, Nakano D, Kitada K, Sofue T, Ohsaki H, Moriwaki K, Hara T, Ohmori K, Kohno M, Nishiyama A. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is essential for the beneficial effects of renal ischemic preconditioning on renal

ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int.* 2014 Apr;85(4):871-9.査読あり。

[学会発表](計 2 件)

1. Nishioka S, Nakano D, Kitada K, Ohsaki H, Sofue T, Kohno M, Nishiyama A. P21 is Essential for the Beneficial Effects of Renal Ischemic Preconditioning in Ischemic Acute Kidney Injury. High Blood Pressure Research Conference. (New Orleans, LA, USA). 2013 年 9 月 11 日
2. 西岡聡、中野大介、北田研人、大崎博之、祖父江理、森脇久美子、原大雅、西山成、河野雅和 腎虚血プレコンディショニングにおける p21 の抗酸化酵素群を介した腎保護効果。日本腎臓学会第 56 回学術総会(東京国際フォーラム、東京)2013 年 5 月 10 日

[その他]

ホームページ等

香川大学薬理学講座ホームページ

<http://www.kms.ac.jp/~yakuri/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 大介 (NAKANO, DAISUKE)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524178