

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860677

研究課題名(和文)慢性腎臓病の進展を担う細胞間クロストークの解明

研究課題名(英文) Exploring the crosstalk between resident fibroblasts and tubular epithelial cells in the kidney

研究代表者

井口 卓 (IGUCHI, TAKU)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30644504

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)：我々は遺伝子工学的手法とジフテリア毒素とを用いて「線維芽細胞」および「尿細管上皮細胞」からのクロストークが担う役割を解析した結果、両者が相互に働きかけ恒常性を維持している可能性が示唆された。また細胞間クロストークを担う鍵因子候補を見出し、外因性にそのシグナルを増強することで腎障害が軽減することを明らかにした。加えて近位尿細管特異的な障害の程度と広がりに応じて、線維芽細胞を含む様々な腎構成細胞に影響を与え、慢性腎臓病進展の原因となり得ることを見出した。本研究成果は急性腎障害から慢性腎臓病進展への病態理解のみならず、新たな治療薬開発にも有用なツールになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To analyze the function of fibroblasts and proximal tubular epithelial cells in the kidney, we utilized Cre recombination and diphtheria toxin receptor (DTR) system. DT administration for the mice expressing DTR in fibroblasts triggered the expression of tubular injury markers, as well as the proliferation of proximal tubule cells. To search for the molecules supporting tubular cells, we performed microarray analysis and identified several signaling pathways down-regulated by DT administration.

Meanwhile, DT administration for the mice DTR expressing in proximal tubular cells caused severe proximal tubule-specific injury associated with interstitial fibrosis. Mild proximal tubule injury from a single injection of low-dose DT triggered reversible fibrosis, whereas repeated mild injuries caused sustained interstitial fibrosis.

These results support the existence of crosstalk between fibroblasts and tubular cells, and the signaling pathways may be the target for new therapeutics.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 細胞間クロストーク

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) は近年爆発的な増加を続け、我が国の罹患者が 1300 万人を超える新たな国民病である。その原因疾患によらず CKD が進行するにつれて、腎臓は「線維化」をきたし、線維化の進行は機能的・構造的回復を困難にする。しかしながら、現在までに線維化に対する有効な治療法および治療薬は確立されていない。その理由は、線維化を引き起こす細胞の由来ですら統一した見解がないことに代表されるように、腎臓の線維化に関する知見が他臓器と比べて不十分であることにほかならない。

一方で、腎臓は赤血球産生に必須のホルモンであるエリスロポエチン (EPO) を産生分泌する内分泌器官としての側面を持つ。CKD が進行すると腎臓における EPO 産生が不十分になり、「腎性貧血」を呈する。EPO 産生細胞は腎臓の間質に存在するというのが共通認識であるが、その性質には不明な点が多く、CKD でなぜ EPO 分泌が不十分になり、腎性貧血を呈するのかについても統一した見解はない。

こうした背景の中、我々は「線維化」と「腎性貧血」に関する 1 報の論文を発表した (Asada N et al. JCI, 2011)。神経系 Cre マウス (P0-Cre マウス) と indicator マウスを用いた lineage tracing の手法を用いて、腎臓の線維芽細胞の約 98% が神経堤由来であり、この細胞こそが EPO 産生細胞であることを見出した。加えて、病態時には大量の細胞外マトリックスを産生する悪玉線維芽細胞に形質転換し線維化を引き起こすこと、さらにはその形質転換の過程で EPO 産生能が著しく低下し腎性貧血の引き金となることを世界で初めて報告した。すなわち、線維化と腎性貧血の原因はただ 1 種類の細胞の形質転換によるのである。しかしながら、「なぜ」「どのようにして」線維芽細胞が悪玉線維芽細胞に形質転換するのかは不明であり、その謎を解明することが治療薬開発の大きな一歩である。

この謎を解く一つの手がかりとして、腎臓の構成細胞の一種である尿細管上皮細胞と線維芽細胞との関係性に注目した。その理由として、腎臓病ではその原因によらず、必ず尿細管上皮が障害を受けることが挙げられる。加えて、尿細管上皮障害の程度が腎予後と相関すること、尿細管上皮障害が線維化に先行して認められ、障害を受けた尿細管の周囲に特に悪玉線維芽細胞が多く見られることなどから、これら細胞の相互作用と線維化および腎障害との関係性に着目した。

2. 研究の目的

上記の背景から、「線維芽細胞」と「尿細管上皮細胞」に注目し、これらの細胞の相互作用、すなわち細胞間クロストークが CKD の病態形成・進展に重要な役割を担うという仮説を立て、研究計画を立案した。

まず *in vivo* における解析として、線維芽細胞または尿細管上皮細胞特異的に、任意の時期にそれぞれの細胞でのタンパク合成を停止する。その結果、線維芽細胞あるいは尿細管上皮細胞に由来する細胞同士のクロストークが遮断されることになる。このシステムを用いて丹念に解析することで、(1)細胞間クロストークが「尿細管障害」および「線維化」にどのように影響するかを明らかにすること、(2)細胞間クロストークの制御機構の一端を明らかにすることができると考えた。

一方で、細胞内シグナル伝達や介在因子の探索など、より詳細な解析を進めるには、*in vivo* での事象を反映する *in vitro* 解析ツールの構築が必須である。そこで線維芽細胞と尿細管上皮細胞とを用いて、細胞間クロストークを再構築し得る共培養法の最適化を試みる。

これら *in vivo* および *in vitro* での解析から、線維芽細胞-尿細管上皮細胞間クロストークの制御機構を見出し、その鍵因子を同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子工学的手法とジフテリア毒素 (diphtheria toxin: DT) を用いて、「線維芽細胞」と「尿細管上皮細胞」が担う役割を解析した。DT はヒト HB-EGF (hHB-EGF) を受容体として細胞に侵入し、細胞のタンパク質合成を阻害するが、マウス HB-EGF に対する親和性は著しく低い。この特性を利用して、目的の細胞に hHB-EGF を発現させ、任意の時期にジフテリア毒素を投与することで、線維芽細胞および尿細管上皮細胞のタンパク合成を停止し、それぞれの細胞が生体内で担う役割を解析した。

上述のように、P0-Cre マウスを用いたこれまでの解析から、腎臓の線維芽細胞のほぼ全てが神経系由来であることを確認している。そこで、P0-Cre マウスと Cre 存在下に hHB-EGF を発現するマウス (iDTR マウス) とを交配した P0-Cre:iDTR マウスにおいて、hHB-EGF の発現を確認したところ、予想通り線維芽細胞にのみ発現しており、我々の目的に合致していることを確認した。また、ジフテリア毒素はその投与量により、細胞のタンパク合成を停止させるばかりではなく、死滅させる可能性がある。そこでジフテリア毒素の至適用量の探索を実施し、免疫染色、電子顕微鏡での観察から、タンパク合成阻害のみが認められる用量を見出した。また本投与量により線維芽細胞のタンパク合成が停止した結果、線維化マーカーの発現低下がみられ、EPO 発現は著しく低下した。この結果は、

我々の論文報告 (Asada N et al. JCI, 2011) を支持する結果であり、本研究に P0-Cre マウスを用いることの妥当性が確認された。本マウスを用いて、線維芽細胞機能不全による尿細管上皮細胞への影響を免疫染色、定量 PCR 法および Western Blotting 法を用いて評価した。また、「線維芽細胞-尿細管上皮細胞間クロストーク」の鍵因子同定の足掛かりとして、DT 投与/非投与でのマイクロアレイ解析を実施した。

一方、我々は近年、腎臓の近位尿細管特異的に誘導性 Cre を発現するマウス (NDRG1-CreER^{T2} マウス) を作製することに成功した (Endo T et al. J Pathol., 2015)。本マウスを P0-Cre マウスと同様に iDTR マウスと交配させ、NDRG1-CreER^{T2}:iDTR マウスを得た。本マウスに組換えを起こさせる目的で Tamoxifen を充分量投与すると、当初の予想通りに hHB-EGF が近位尿細管上皮細胞にのみ発現していることを確認した。合わせて Tamoxifen を低用量、あるいは少数回投与すると、その用量および頻度に応じて、hHB-EGF 組換え/発現量も変動することを確認した。また、NDRG1-CreER^{T2}:iDTR マウスにおいても、ジフテリア毒素の至適用量の探索を行った上で、近位尿細管上皮細胞特異的なクロストーク遮断/機能不全が尿細管障害および線維芽細胞に及ぼす影響を評価した。

in vitro 解析ツールとして、線維芽細胞と尿細管上皮細胞による (1) 平面での共培養、(2) 有孔性膜を挟んで液性因子交換 (間接的クロストーク) を自由にした共培養、(3) 有孔性膜の底面側に細胞を接着させ、細胞間の直接的クロストークを可能にした共培養の 3 通りを試みた。これら培養法と各種刺激剤を組み合わせ、*in vivo* で得られた結果と比較し、生体内現象の一部を再構築し得るかを評価した。

4. 研究成果

P0-Cre:iDTR マウスに DT を投与した結果、尿細管障害マーカーである Kidney injury molecule 1 (Kim-1) および Neutrophil gelatinase associated lipocalin (Lipocalin-2, NGAL) の mRNA およびタンパクレベルでの上昇を認めた。さらに、皮髄質境界部を中心とした近位尿細管上皮細胞の増殖が誘導された。これらの結果は、線維芽細胞が機能不全に陥り、線維芽細胞から尿細管上皮細胞へのクロストークが遮断されると、定常状態では起こり得ない、尿細管上皮細胞の障害および増殖が惹起されることを示している。すなわち、定常状態においては、線維芽細胞よりもたらされる何らかの因子が、尿細管上皮細胞のメンテナンスを維持している可能性が示唆された。続いて、DT 投与/非投与でのマイクロアレイ解析を実施し、得られた結果より、特に腎臓特異性の高いプローブを抽出してパスウェイ解析を行った。その結果、DT 投与により減弱したシ

グナルパスウェイを複数個見出した。それら候補因子の中から、生体内で生合成されるある因子 X に注目し解析を進めた。まず外因性に因子 X を補充してそのシグナルを増強し、腎障害モデルを作製すると、複数のモデルにおいて腎障害が軽減することが明らかになった。一方で、因子 X を枯渇させ、そのシグナルを減弱させることで腎障害が悪化した。加えて、腎障害時には因子 X 合成の場が、近位尿細管上皮細胞から線維芽細胞にスイッチすることを見出した。

一方、NDRG1-CreER^{T2}:iDTR マウスへの DT 投与により、腎障害が惹起され、腎機能指標である血中尿素窒素およびクレアチニンの上昇が認められた。加えて、線維芽細胞の形質転換に伴う線維化と EPO 産生の低下が認められた。すなわち近位尿細管上皮特異的な機能不全が、腎障害とそれに伴う線維化、腎性貧血の原因となり得る EPO 産生能低下を惹き起こした。また本マウスへの DT 投与は、その用量を調節することで、任意の頻度/強度で尿細管上皮障害を惹き起こすことが可能であった。低用量 DT を単回投与することで、可逆的な尿細管障害と間質の線維化を惹起した一方で、低用量 DT を反復回投与すると広範な間質の線維化のみならず、糸球体硬化までもが認められた。Tamoxifen 投与量/頻度を hHB-EGF 組換えが散発的にみられるよう調節した後に DT 投与を実施したところ、散在する尿細管障害を認めた一方で、間質の線維化は認めなかった。

Preliminary な検討の結果、*in vitro* 解析ツールとして、(2) 有孔性膜を挟んで液性因子交換 (間接的クロストーク) を自由にする共培養法を用いた。まず有孔性膜の上層に線維芽細胞、下層のプレートに尿細管上皮細胞をそれぞれ播種し、別々に培養した。次に尿細管上皮細胞のみに、刺激剤として TGF- β 1 を 24 時間添加し、よく洗浄したのちに、液性因子交換が可能になるように線維芽細胞と 24 時間共培養した。その結果、対照群と比較して線維芽細胞における Col1a1 mRNA 発現が約 1.7 倍、Acta2 (SMA) mRNA 発現が約 3.2 倍に上昇した。さらに、Ccl2, IL6 mRNA 発現もそれぞれ約 5.3 倍、約 8.4 倍上昇が認められた。これらの結果は *in vivo* で認められた現象と同様に、尿細管障害が線維芽細胞の形質転換に伴う線維化を引き起こし得ることを示唆している。加えて、障害を受けた尿細管上皮細胞から分泌された液性因子が、直接的あるいは間接的に線維芽細胞の形質転換を引き起こすトリガーになり得る可能性が示唆された。

本研究では、遺伝子工学的手法と DT とを用いて「線維芽細胞」および「尿細管上皮細胞」からのクロストークが担う役割を解析した。その結果、両者が相互に働きかけ恒常性を維持している可能性が示唆された。線維芽細胞からのクロストークを担う因子として、我々が見出した因子 X が少なくともその役割

の一端を担う可能性が示されており，さらなる解析を進めつつ，論文投稿準備ならびに創薬標的としての妥当性および実現性の検討を進めている．

加えて，NDRG1-CreERT²:iDTR マウスを用いた解析から，近位尿細管障害の程度と広がりに応じて，線維芽細胞を含む様々な腎構成細胞に影響を与え，CKD 進展の原因となり得ることを明らかにした．本マウスモデルによる AKI から CKD への進展は，その病態理解のみならず，新たな CKD 治療薬開発にも有用なツールになると考えられる．

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）

Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, Nakata H, Sato Y, Takase M, Nameta M, Yamamoto T, Economides AN, Kohno K, Haga H, Sharma K, Yanagita M., Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis, Journal of American Society of Nephrology, 査読有，[Epub ahead of print]
doi: 10.1681/ASN.2015060647

〔学会発表〕（計 6 件）

Nakamura J, American Society of Nephrology 2014, Philadelphia, Exploring the Pathophysiological Functions of Resident Fibroblast in the Kidney

中村 仁, 第 57 回(2014)日本腎臓学会総会，横浜，慢性腎臓病における上皮-線維芽細胞相互作用の解明

高折 光司，第 57 回(2014)日本腎臓学会総会，横浜，近位尿細管障害は線維化，遠位尿細管障害およびアルブミン尿を惹起する

Takaori K, American Society of Nephrology 2015, San Diego, Severity, Frequency and Prevalence of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis

中村 仁, 第 58 回(2015)日本腎臓学会総会，名古屋，レチノイドシグナルを介した尿細管上皮-線維芽細胞相互作用の解明

高折 光司，第 58 回(2015)日本腎臓学会総会，名古屋，AKI to CKD Continuum における障害近位尿細管の役割

〔図書〕（該当なし）

〔産業財産権〕（該当なし）

6．研究組織

(1)研究代表者

井口 卓（IGUCHI, Taku）

京都大学・大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター TMK プロジェクト・プロジェクト研究員

研究者番号：30644504