

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461208

研究課題名(和文)急性腎障害に対する糖代謝の制御を介した尿細管部位特異的な治療を目指して

研究課題名(英文) Management of acute kidney injury in consideration of site specificity of renal tubule through the regulation of glucose metabolism

研究代表者

藤野 貴行 (Fujino, Takayuki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70322914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：P53に対する核酸治療のphase I臨床試験が開心術および移植腎に対する作用をみる目的で行われた。この試験は2010年に終了し、詳細は不明であるが、良好な安全性が示されている。siRNA治療は現在は静脈投与であるが、経動脈投与に関しては明らかではない。経動脈的にカテーテルを用いて投与を行うことは、副作用を減少させる目的では有用である。このように、本研究では、p53に対するshRNAを経動脈的に投与を行い、尿細管障害を軽減し、腎機能改善するかどうかを検討した。

研究成果の概要(英文)：These potential therapeutic opportunities utilizing RNAi in vivo are just now being recognized injected from vein, however, the effects of RNAi in vivo injected from renal artery is not well known. It is useful clinically to deliver the vector locally through trans-aortic catheter to reduce adverse effect of siRNA therapy. Therefore, we chose inhibition of p53 expression following ischemia-reperfusion injury(IR) injected from renal artery as a means to test the efficacy of siRNA in vivo in reducing tubular cell injury and improving renal function.

研究分野：腎臓病学

キーワード：虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流は多くの組織における障害に関連し、死亡や有病率とも関連する。

さまざまな細胞内シグナルの活性化が、虚血・再灌流障害に関連している。アポトーシスはAKIの病態において中心的な役割を果たす。虚血・再灌流障害における尿細管アポトーシスに対する有効な治療は認められない。腎虚血再灌流障害におけるp53の役割についても多くの報告が認められる。

p53によるアポトーシスは転写における役割とBCI2 familyとのinteractionによるミトコンドリアでの役割である。

P53に対するsiRNAの治療のphase I臨床試験が開心術および移植腎に対する作用をみる目的で行われた。この試験は2010年に終了し、詳細は不明であるが、良好な安全性が示されている。siRNA治療は現在は静脈投与であるが、経動脈投与に関しては明らかではない。経動脈的にカテーテルを用いて投与を行うことは、副作用を減少させる目的では有用である。このように、本研究では、p53に対するshRNAを経動脈的に投与を行い、尿細管障害を軽減し、腎機能改善するかどうかを検討した。

Beta-cateninは細胞骨格への効果と、Wnt signalingにおける核転写での役割について重要である。接着斑では、βカテニンがカドヘリンとactinをつなぎ合わせ、細胞の生存に関連する。βカテニンは核内に入り、アポトーシス抑制や細胞生存を促進する転写を亢進する。P53のmutationによりbeta-catenin accumulationが報告されている。P53とbeta-cateninとの直接作用も示され、鏡面的関係が報告されている。

GSK3betaは虚血再灌流障害で注目されており、GSK-3betaはさまざまなアポトーシス促進因子にリン酸化され、mPTP openingの閾値はGSK3betaの不活性化により上昇し、GSK3betaの抑制薬は心筋虚血再灌流障害を抑制する。

p53とGSKβの関連はミトコンドリアでも明らかになっており、p53のアポトーシスに対するGSK-3betaの作用も明らかである。P53はGSK3betaの活性化を直接行うことが知られている。P53がGSK3betaと直接結合して、活性化に関与する。核内のGSK3betaもp53依存する可能性もある。GSK3betaの阻害はp53に関連したapoptosisの阻害を可能にして、早期にはミトコンドリア、後期には転写に関連する。これらの結果からp53に対するsiRNAのIR障害におけるbeta catenin, GSK-3betaレベルへの作用を検討した。

2. 研究の目的

腎虚血再灌流障害 (IR) における p53 の機能についても報告されている。虚血・再灌流障害 (IR) の in vivo における尿細管細胞のアポトーシスにおける p53 の作用は必ずしも明らかではない。p53 に対する siRNA による核酸治療は静脈投与にて行われ有効性が報告されているが全身投与による副作用などが問題になる。経動脈的に p53 siRNA を投与した場合に IR による腎障害に対する効果を検討した。

3. 研究の方法

①Induction of in vivo IR injury

すべての研究は8-12週齢のメスマウスを用いた。ケタミン・キシラジンの腹腔内投与を行った。体温は36-37.5の間に管理した。後腹部より切開を行い、腹部大動脈を右腎動脈分岐尾側と左腎動脈分岐尾側にてクランプを図のように行った。腎静脈はクランプは行わない。この方法では、対側の右腎には梗塞や虚血は認めなかった。虚血時間は以前の報告に一致させた。再灌流の際には視覚的に血流の再開を確認した。Sham手術はクランプ以外を同様に行った。

②腎機能測定

腎機能は再灌流後の採血で測定した。採血は右室穿刺で行った。血液は2時間室温で凝固させ、2000g, 20分間遠心した。クレアチニン

測定キットを用いた。尿細管障害はNGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL in urine (Mouse Lipocalin-2/NGAL Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA).測定をおこなった。ベースラインとsacrifice直後の評価をおこなった。

③組織学的検討

IR 12時間後、腎組織はパラホルマリンで固定を行い、パラフィン包埋を行った。4 μ mの切片を作成した。次に、腎組織を皮質と髄質に分けて、液体窒素で凍結を行った。

ウエスタンとRNAレベルを検討するためのサンプルである。ヘマトキシリンで赤色の部分をNIH imageで面積を測定し、生存した尿細管と表した。免疫染色の抗体は---を用いて、ビオチン化二次抗体、HRP, DAB基質で発色させた。

④アポトーシスの評価

TUNNEL法を用いてapoptosisの評価を行った。Proteinase Kで処理を行う。

DNAのfree 3OH endをTdTを用いて標識した。ビオチン化した核酸が、断片化したDNAに取り込まれ、HRPにてブルーに発色する機構を用いた。400倍で評価を行った。

15視野を測定して平均を算出した。NIH imageにてカウントした。

⑤shRNA sequences, modifications and *in vitro* activity evaluation

shRNAはサンタクルーズ製を用いた。P53, control, copGFPに対するshRNAを含んだプラスミドを用いて検討した。トランスフェクション試薬は、カチオンポリマーを用いて行った。0.33 μ gのshRNAを含んだDNAを、用量の検討のために施行した。Total 100 μ gで3.3 μ gのDNAをN/P比8で行った。3.3 μ gのDNAを100 μ lの5%グルコースに入れる。1 μ lのpolyethreneimineを100 μ lの5%グルコースに入れる。50 μ lずつ混合する。マウスに投与する。p53のshRNAの効果は免疫染色で行った。

⑥Transmission electron microscopy

腎組織を4%パラホルマリンで2時間固定し、LR whiteで包埋した。ダイヤモンドナイフを用いて薄切した。PVFの膜つきグリッドにのせ、染色を行う。X7000で観察、NIH imageにてミトコンドリの表面積を測定した。

⑦RNA isolation, cDNA synthesis, and real time PCR assays.

RNA抽出のためにQuagen kitにてホモジナイズを行った。RNA濃度の測定を行った。cDNAを作成した。Taqman PCRにて定量を行った。

4. 研究成果

①Effects of Expression of p53 and renal function in the kidney after IR

ベースラインではp53蛋白は近位尿細管、メサンギウムに検出され、TALH細胞は低い発現レベルであるが、IR 12時間後にピークを示す発現を示した。次にp53に対するshRNAがp53の過剰発現を減弱するかどうか検討した。

P53 shRNAによる腎機能の改善は、障害が減弱したためか、shRNAによる本来の効果かを検討するために、control plasmidを対象とした。shRNAによるp53発現の減少は、TALH細胞では顕著であるが、近位尿細管、糸球体ではその抑制は明らかではなかった。

②Efficacy of transfection of shRNA plasmid through trans-arterial administration

IR 12時間後にGFRを含んだベクターのトランスフェクション効果も検討した。

Figure 1にはIR12時間後の腎組織に対する抗GFP抗体による染色像を示している。

GFPの染色はTALH細胞に認め、これはTHPやCOX-2などTALH細胞のマーカーと同様の染色を認めた。

③Effect of shRNA of p53 on renal function and NGAL level in urine after ischemia-reperfusion injury

次にp53 siRNAの腎機能に対する効果を検討した。3.3 μ gのshRNAを含んだplasmid、

control, GFP plasmidの注入を行った。ベータスラインのクレアチニン値は0.2 mg/dlから、IRにより3.7へ上昇した。P53 shRNAは血清クレアチニンを1.9 mg/dlへ低下させた。

④P53 shRNAによる尿中NGALレベルの変化

P53 shRNAによる尿中NGALレベルの変化を検討した。NGALは障害を受けた遠位尿管やTALH細胞で発現が上昇し、血清クレアチニンより鋭敏な指標である。また12時間後にピークを示す上昇を示すことが報告されている。IR12時間後に尿中NGALの上昇を認めた。P53 shRNA投与によりこの上昇が抑制された

⑤p53に対するshRNAは組織障害やアポトーシスを縮小する

組織学的検討を行った。髄質外層内帯においてTALH細胞の障害の軽減が認められた。TUNNEL assayにてアポトーシスの程度を定量した。P53に対するshRNAは、髄質外層外帯のapoptosisを減少させた。以前の研究ではp53は近位尿管に多く発現し、これは本研究の結果とも一致していた。アポトーシスは近位尿管にも認められたが、p53に対するshRNAの効果はごく軽度であった。本研究では、shRNA動脈投与による効果は、髄質外層外帯へンレ上行脚に認められた。この部分はIRに伴いp53発現最も変化した部分であり、それに伴う尿管細胞障害軽減効果が最も現れた可能性が考えられる。

⑥電子顕微鏡所見

IR後は、ミトコンドリアの腫大、ミトコンドリア内膜の破壊が生じる。P53 shRNAの投与によりミトコンドリアの腫大やクリスタ構造を保った。これらの結果からは、p53 shRNAによりミトコンドリア腫大を抑制し、アポトーシスを抑制した。

⑦βカテニンとp53発現の鏡面的関係

同じモデルを用いて、βカテニンとp53発現の鏡面的関係の検討を行った。

Beta-cateninの発現は髄質外層内帯で減少していた。P53 shRNA投与により、beta cateninの発現の増加を認めた。これらの結果からは、βカテニンとp53発現は鏡面的関係である可能性が示された。

⑧Involvement of GSK3 beta in p53-mediated down-regulation of beta-catenin.

P53 shRNAによるbeta cateninの増加にGSKbetaが関連するかを検討した。GSKbetaの発現は、IR12時間後に髄質外層外帯で増加していた。この増加はp53 shRNA投与により減少を認めた。GSK3beta mRNAの増加は、p53 shRNAにより低下した。

<引用文献>

1, Heyman SN, et al. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths—the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int.* 2010;**77**, 9–16.

2, Paragas N, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med.* 2011;**17**:216-22.

3. Sadot E, et al. Down-Regulation of beta-Catenin by Activated p53. *Mol Cell Biol.* 2001;**21**:6768-81.

5. 主な発表論文等

1, **Fujino T**, Hasebe N. Alteration of Histone H3K4 Methylation in Glomerular Podocytes Associated with Proteinuria in Patients with Membranous Nephropathy. *BMC Nephrol*, **17**, 179, 2016

[雑誌論文] (計1件)

藤野貴行、長谷部直幸、治療抵抗性高血圧およびコントロール不良高血圧の定義と頻度、*医薬ジャーナル*、査読無、**52**、110–113、2016

〔学会発表〕（計1件）

- ① 藤野貴行、ネフローゼ症候群におけるポ
ドサイトでのヒストン H3K4 トリメチル
化の役割、日本腎臓学会学術集会、2015
年6月（名古屋）

〔図書〕（計1件）

藤野貴行 他、FUJIMEDICAL 出版、脱・
脳卒中の極意、2016、150 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 貴行 (Fujino Takayuki)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：70322914

(2) 研究分担者

長谷部直幸 (Hasebe Naoyuki)
旭川医科大学・大学病院・教授
研究者番号：30192272