

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461218

研究課題名(和文) 上皮-間葉連関に着目したLPA1-MRTF-SRFシグナルの腎線維化にはたす意義

研究課題名(英文) Involvement of LPA1-MRTF-SRF in renal fibrosis

研究代表者

坂井 宣彦 (SAKAI, NORIHIKO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：60377421

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)：線維化は臓器障害に対する過度の創傷治癒反応，すなわち細胞外基質沈着と細胞外基質産生能を有する細胞の集積を特徴とする．しかし，これら過度の創傷治癒反応をもたらす分子生物学的基盤は完全には同定されていない．本研究では，これら過度の創傷治癒反応をもたらす分子生物学的基盤として、脂質メディエーターの一つであるリゾホスファチジン酸(LPA)およびその受容体LPA1シグナルに着目し、上皮間葉連関を介した臓器線維化にはたす意義の解明を試みた．その結果、尿細管上皮細胞でのLPA-LPA1シグナルが線維芽細胞の増殖や分化を誘導することで、腎線維化進展に寄与することを明らかにし、この知見を論文化した。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is characterized by the expansion of the fibroblast pool, but the mechanisms driving it remain to be fully clarified. We found that lysophosphatidic acid (LPA) and its receptor (LPA1) signaling drives fibroblast proliferation and activation during the development of renal fibrosis by inducing connective tissue growth factor (CTGF). Unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced increases in renal collagen were significantly attenuated in LPA1-deficient mice (LPA1^{-/-}) as compared to LPA1-sufficient mice (LPA^{+/+}), as was the accumulations of fibroblasts. CTGF was detected mainly in tubular epithelial cells, and its levels were suppressed in LPA1^{-/-}. LPA-LPA1 signaling directly induced CTGF expression by primary proximal tubular epithelial cells (PTECs). PTEC-derived CTGF mediated renal fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. These results suggest that targeting LPA-LPA1 signaling could be a therapeutic strategy for renal fibrosis.

研究分野：腎臓内科

キーワード：線維化 腎臓

1. 研究開始当初の背景

線維化は、多くの慢性疾患において臓器不全をもたらす共通機序であるが、いまだその治療は確立されておらず、線維化機序の解明は重要である。なかでも、本邦における末期腎不全による慢性透析患者は 30 万人を超え、この透析患者の増加は医学的、社会的ならびに医療経済上大きな問題となっている。末期腎不全の予備軍として慢性腎臓病(CKD)が注目されているが、この CKD が進展し腎不全に至る過程において、各種腎疾患はその病因を問わず、腎線維化という共通のプロセスをとることを特徴とする。以上より腎線維化進展機序の解明は、CKD 進展に対する新規治療法確立につながる治療の標的として重要である。線維化は臓器障害に対する過度の創傷治癒反応、すなわち細胞外基質沈着と細胞外基質産生能を有する細胞の集積を特徴とする。しかし、これら過度の創傷治癒反応をもたらす分子生物学的基盤は完全には同定されていない。

2. 研究の目的

リゾフォスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)は、脂質メディエーターのひとつであり、そのシグナルは G タンパク質共役型受容体である少なくとも 6 種類の LPA 受容体(LPA₁₋₆)により伝達される。これら LPA 受容体を介したシグナル伝達によって、LPA は細胞収縮、遊走、遺伝子発現を含む多くの細胞活動を制御する。これまで LPA-LPA₁ シグナルが線維芽細胞の遊走・集積を制御することで肺線維化に寄与し、治療標的経路となることが報告されている。申請者は腹膜線維化機序において、LPA-LPA₁ シグナルが腹膜中皮細胞の connective tissue growth factor(CTGF) 発現を介する中皮-間葉連関を制御することで腹膜線維化機序に寄与することを明らかにした(Sakai, et al., FASEB J 2013)。本研究では、これら過度の創傷治癒反応をもたらす分子生物学的基盤として、LPA およびその受容体 LPA₁ シグナルに着目し、上皮間葉連関を介した臓器線維化にはたす意義の解明を試みた。

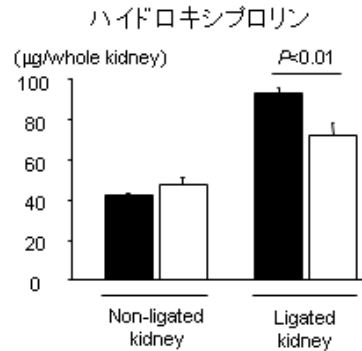
3. 研究の方法

組織中の線維芽細胞を同定するため、LPA₁ 受容体欠損マウス(LPA₁^{-/-})および対照マウス(LPA₁^{+/+})を I 型プロコラーゲンプロモーター下で green fluorescent protein (GFP)を発現する Col-GFP マウスと交配させ、LPA₁^{-/-}Col-GFP および LPA₁^{+/+}Col-GFP を作成した。このマウスに一側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction; UUO)にて腎線維化モデルを作成し、UUO10 日目に屠殺し、腎組織を採取した。また近位尿管上皮細胞(PTEC)を LPA 刺激し、線維化惹起分子である connective tissue growth factor (CTGF)発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎線維化定量の検討結果

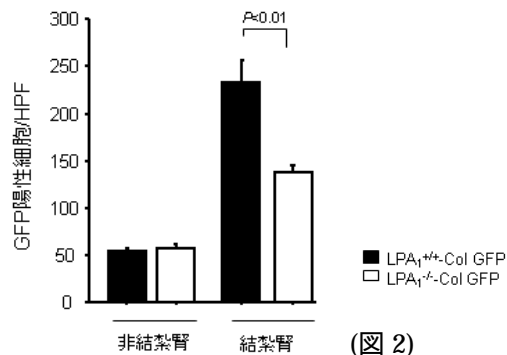
UUO 後の腎内ハイドロキシプロリン量および腎内 I 型プロコラーゲン発現量は LPA^{-/-}Col GFP 群で LPA^{+/+}Col GFP 群に比し低値となった(図 1)。



(図 1)

(2) 線維芽細胞の検討結果

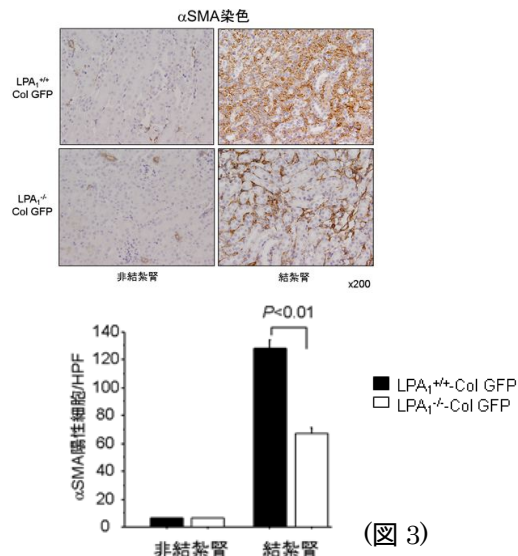
線維芽細胞を検討するため GFP 染色を行った。UUO により腎内 GFP 陽性細胞数は増加した。しかし、UUO 後の腎内 GFP 陽性細胞数は LPA^{-/-}Col GFP 群で LPA^{+/+}Col GFP 群に比し低値となった(図 2)。



(図 2)

(3) 筋線維芽細胞の検討結果

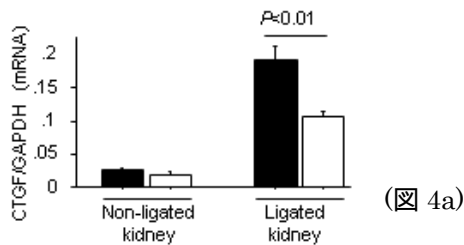
筋線維芽細胞を検討するため αSMA 染色を行った。UUO により腎内 αSMA 陽性細胞数は増加した。しかし、UUO 後の腎内 αSMA 陽性細胞数は LPA^{-/-}Col GFP 群で LPA^{+/+}Col GFP 群に比し低値となった(図 3)。



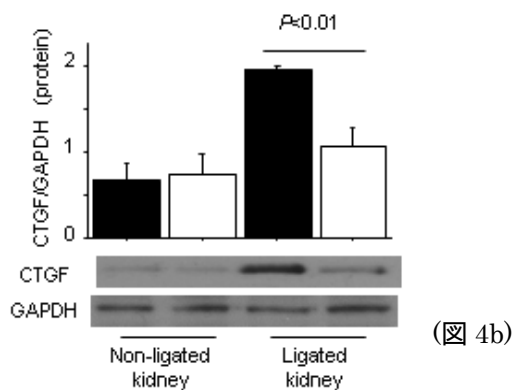
(図 3)

(4) CTGF 発現の検討結果

また尿細管上皮細胞や間質細胞で発現を認めた connective tissue growth factor (CTGF)発現は、LPA₁^{-/-}Col-GFP 群において抑制された(図 4a-b)。



(図 4a)



(図 4b)

(5) 近位尿細管上皮細胞における CTGF 発現機構の検討結果

マウス培養近位尿細管上皮細胞(mPTEC)を用いたところ、LPA は LPA₁ 依存性に CTGF 発現を増強することを認めた。さらに、LPA-LPA₁ シグナル依存性に転写因子 myocardin-related transcription factor (MRTF)-A/B と serum response factor (SRF)を介して CTGF を上清中に分泌することを見出した。この上清中 CTGF を用いて、マウス培養腎線維芽細胞(mRFB)を刺激し、RFB の細胞増殖や α SMA 発現を検討した。その結果、mPTEC 由来 CTGF は mRFB の増殖や α SMA 発現を誘導することが明らかとなった。以上より、PTEC での MRTF-SRF を介する LPA-LPA₁ シグナルが線維芽細胞の増殖や分化を誘導することで、腎線維化進展に寄与することを明らかにし、この知見を論文文化した。

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 11 件)

Sakai N, Chun J, Duffield JS, Lagares D, Wada T, Luster AD, Tager AM: Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates pro-fibrotic epithelial

cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney Int* 91: 628-641, 2017 査読有

Oshima M, Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Hara A, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Umeda E, Kaneko S, Arai S, Miyazaki T, Wada T: Association of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression with urinary protein and kidney dysfunction. *Clin Exp Nephrol* 21: 35-42, 2017 査読有

Usui J, Yamagata K, Imai E, Okuyama H, Kajiyama H, Kanamori H, Kaneko S, Kono E, Sakai Y, Sakai N, Sakamaki Y, Taniguchi Y, Nakai K, Nishiwaki H, Hirata S, Yamaya H, Tsuruoka S, Terada Y, Yokoyama H, Wada T, Narita I: Clinical practice guideline for drug-induced kidney injury in Japan 2016: digest version. *Clin Exp Nephrol* 20: 827-831, 2016 査読有

Sakai N, Furuichi K, Wada T: Inhibition of NLRP3 inflammasome as a therapeutic intervention in crystal-induced nephropathy. *Kidney Int* 90: 466-468, 2016 査読有

Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T: Effect of Autoantibodies to Erythropoietin Receptor in Systemic Lupus Erythematosus with Biopsy-proven Lupus Nephritis. *J Rheumatol* 43: 1328-1334, 2016 査読有

Kitajima S, Iwata Y, Furuichi K, Sagara A, Shinozaki Y, Toyama T, Sakai N,

Shimizu M, Sakurai T, Kaneko S, Wada T: Messenger RNA expression profile of sleep-related genes in peripheral blood cells in patients with chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol 20: 218-225, 2016 査読有

坂井宣彦, 和田隆志 免疫抑制薬による腎障害 日本腎臓学会誌 58, 1073-1078, 2016 査読有

Sakai N, Wada T: Revisiting inflammation in diabetic nephropathy: the role of the Nlrp3 inflammasome in glomerular resident cells. Kidney Int, 87: 12-14, 2015 査読有

Sakai N, Wada T: T Helper 2 Cytokine Signaling in Bone Marrow-Derived Fibroblasts: A Target for Renal Fibrosis. J Am Soc Nephrol 26: 2896-2898, 2015 査読有

Okumura T, Furuichi K, Higashide T, Sakurai M, Hashimoto S, Shinozaki Y, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Sugiyama K, Kaneko S, Wada T: Association of PAX2 and Other Gene Mutations with the Clinical Manifestations of Renal Coloboma Syndrome. PLoS One 16: e0142843, 2015 査読有

坂井宣彦, 和田隆志 TMA血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy) における血漿交換の意義 日本腎臓学会誌 56, 1082-1089, 2014 査読有

[学会発表](計7件)

坂井宣彦, 和田隆志 臓器線維化進展機序における生理活性脂質の意義 日本腎臓学会総会シンポジウム 2016年6月18日パシ

ィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Miki Nakamura, Norihiko Sakai, Kenneth Lipson, Taito Miyake, Yasutaka Kamikawa, Akihiro Sagara, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada. The inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through the suppression of fibroblast/myofibroblast accumulation. 米国腎臓学会 2016年11月26日シカゴ(米国)

坂井宣彦, 和田隆志 臓器線維化機序におけるリゾフォスファチジン酸の意義 日本臨床分子形態学会総会ワークショップ 2015年9月18日長崎大学(長崎市・長崎県)

坂井宣彦, 和田隆志 腹膜中皮細胞の遊走能および筋線維芽細胞分化にはたす lysophosphatidic acid (LPA)-LPA₁ の意義 日本透析医学会総会口演 2015年6月27日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Norihiko Sakai, Taito Miyake, Yasutaka Kamikawa, Akihiro Sagara, Yasuyuki Shinozaki, Shinji Kitajima, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada. LPA-LPA₁ signaling regulates fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation dependent on epithelial cell-fibroblast interaction 米国腎臓学会 2015年11月7日サンディエゴ(米国)

坂井宣彦, Andrew M. Tager, 和田隆志 マウス腎線維化モデルにおける lysophosphatidic acid (LPA)-LPA₁ の意義 日本腎臓学会総会口演 2014年7月6日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Norihiko Sakai, Takashi Wada, Andrew M. Tager. LPA-LPA₁ signaling directs peritoneal mesothelial cell migration and myofibroblast differentiation in the pathogenesis of peritoneal fibrosis 米国腎臓学会 2014年11月13日フィラデルフィア(米国)

[図書](計3件)

坂井宣彦, 和田隆志 診断と治療社 薬剤性急性間質性腎炎の治療において、副腎皮質ステロイドは有用ですか？ 薬剤性腎障害診療 Q&A 38-39, 2017

坂井宣彦, 和田隆志 診断と治療社 薬剤性腎障害の治療において, 被疑薬の中止は有用ですか? 薬剤性腎障害診療Q&A 36-37, 2017

坂井宣彦, 和田隆志 中外医学社 膠原病日常診療のための検査値のみかた 53-56, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者 坂井 宣彦
(SAKAI NORIHIKO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号: 60377421

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 和田 隆志
(WADA TAKASHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40334784

(4)研究協力者 Andrew M. Tager

研究者番号: なし