

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860626

研究課題名(和文) TRPV4を標的とした抗炎症作用による腎臓病新規治療の開発

研究課題名(英文) Research for developing a novel therapy for renal diseases targeting TRPV4

研究代表者

川上 貴久 (Kawakami, Takahisa)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10722093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の集合管細胞に発現しているTRPV4は炎症促進作用を有しており、この分子が現在決定的治療のない慢性腎臓病の新規治療の対象となる可能性を検証した。マウス集合管培養細胞の系において、TRPV4作動薬は炎症を惹起し、さらに、LPSやdamage-associated molecular pattern刺激による炎症惹起をTRPV4阻害薬は抑制した。一方、腎の無菌性炎症・線維化モデルにおいて、TRPV4ノックアウトマウス腎は、モデル・術後日数によって炎症の抑制・亢進双方が認められた。以上より、腎疾患の種類や病期に応じてTRPV4を治療対象として臨床応用する基盤となる研究結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：TRPV4, which is expressed in renal collecting duct cells, has pro-inflammatory effects. This molecule was investigated as a novel therapeutic target for chronic kidney disease, for which no decisive therapy exists now. In murine cultured collecting duct cells, TRPV4 agonists induced inflammation, whereas TRPV4 inhibitors suppressed inflammation provoked by lipopolysaccharide and damage-associated molecular pattern. In murine kidney aseptic inflammation and fibrosis models, TRPV4 knockout mouse kidney show both promoted and suppressed inflammation, according to different models and postoperative days. In summary, these results laid the foundation to target TRPV4 for a novel therapy of renal diseases.

研究分野：腎臓病学

キーワード：TRPV4 炎症 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) とは、様々な原疾患によって腎臓の障害が慢性的に持続する病態である。その多くは腎機能障害を伴い、それがある閾値を超えると不可逆的に進行し、透析・腎移植などの腎代替療法が必要となる末期腎不全に到る。現在日本では腎代替療法の大半が透析であり、年間約 4 万人の患者が透析導入され、総透析患者数は 30 万人を超える。その費用は一人年間 500 万円程度であり、膨大な医療費を必要としている。腎代替療法に到る前の CKD でも冠動脈疾患などの心血管疾患を伴うリスクが高いことが知られており、CKD が心血管疾患の原因になると考えられている。このように CKD は患者・社会双方にとって顕著な負担となっているが、現在 CKD に対する決定的治療はなく、その研究・治療法の開発が急務である。

腎機能障害を伴う CKD は、尿細管間質病変を特徴とし、それが腎機能低下と高い相関を示すことから、この病変が CKD 治療の有望な標的となっている。病理学的には、尿細管の変性・萎縮、間質の炎症細胞増加、線維化などが認められる。これらが起こる機序は複雑に絡み合い不明な点も多いが、機能的に主体となる上皮細胞である尿細管細胞の傷害が中心となり、それが炎症細胞増加や線維化を誘導し、それらがさらなる尿細管傷害をもたらすという悪循環を来すと考えられている。しかし、尿細管細胞傷害が炎症細胞増多や線維化に波及する分子生物学的機序はあまり明らかになっていない。

そこで研究代表者は、Transient Receptor Potential (TRP) スーパーファミリーの一つである TRPV4 に着目した。この分子群は様々な細胞外・細胞内環境を感知して活性化される非選択的陽イオンチャネルである。TRPV4 は腎臓では尿細管の一部である集合管の細胞に主に発現しており、伸展などの物

理的刺激や浸透圧刺激で活性化され、主に Ca^{2+} イオンが細胞外から細胞内に流入することで生物学的作用をもたらす。最近、Cell 誌で脂肪細胞の TRPV4 が炎症性サイトカイン・ケモカイン (以下サイトカインで統一) 産生を亢進させる作用を有することが報告された (Cell. 151:96-110, 2012)。腎集合管細胞においても TRPV4 が炎症性サイトカイン産生を促進する作用を持つ可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎集合管細胞の TRPV4 が同細胞における炎症性サイトカイン発現を促進し、炎症細胞増加・線維化悪化を介して、腎傷害を増悪させる作用を有するかを検証し、TRPV4 阻害薬が炎症抑制作用を介し CKD 進行を抑制する有効な治療薬となりうるか、その有用性の基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) マウス集合管培養細胞である mIMCD-3 において、TRPV4 への介入としてその作動薬や阻害薬を、炎症惹起の端緒となる pattern-associated molecular pattern (PAMP) 受容体刺激としては、リポ多糖 (LPS) や damage-associated molecular pattern (DAMP) としての壊死させた細胞の抽出液を用い炎症性サイトカインの発現を qRT-PCR を用い解析した。

(2) TRPV4 ノックアウトマウスを用い、腎の無菌性炎症・線維化モデルである片側尿管結紮モデルや片側虚血再灌流モデルを作成し、炎症や線維化などについて解析した。

4. 研究成果

(1) mIMCD-3 を TRPV4 作動薬である GSK1016790A で刺激したところ、炎症性サイトカインである CCL2, CCL5, CXCL2,

IL-6 の発現が用量依存性に増加した。この効果は刺激 3 時間後から 24 時間後まで認められた。別の作動薬である 4 α -Phorbol 12,13-didecanoate で刺激しても同様の結果を認めた。これらのことから、TRPV4 は集合管細胞において炎症性サイトカインの発現を増加させることが確認できた。

動物実験モデルとして施行した片側尿管結紮モデルでは集合管を含む尿細管が拡張し、CKD でもしばしば尿細管の拡張が認められるため、集合管細胞の伸展が炎症惹起となるかを検証した。Earle's Balanced Salt Solution の原液 (300 mOsm) と、それを希釈して 200 mOsm とした溶液を用い、前者をコントロールとし、後者による低浸透圧下での細胞伸展による影響を検証した。細胞伸展刺激により、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β の発現は増加したものの、TRPV4 阻害薬である Ruthenium Red を用いてもその増加を抑制することはできず、少なくとも *in vitro* のこの系においては、TRPV4 は関与していなかった。

次に、PAMP 刺激による炎症と TRPV4 の関連を検証するために、LPS 刺激による炎症性サイトカイン発現増加に対する TRPV4 阻害薬である Ruthenium Red の効果を確認したところ、Ruthenium Red により TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1、CCL2、CXCL2 などのサイトカイン発現が抑制された。より生理的な PAMP として培養上皮細胞や培養マクロファージを凍結・融解を繰り返して壊死させたものの抽出液を DAMP として用いて炎症を惹起し、Ruthenium Red を用いて TRPV4 を阻害したところ、LPS のときと同様に炎症性サイトカインの発現上昇を抑制した。これらのことから、TRPV4 阻害が集合管細胞における炎症惹起を抑制する作用があることが示唆された。

(2) 使用する TRPV4 ノックアウト(KO)マウスにおいて TRPV4 発現が消失していること

を、腎臓を検体として用い、qPCR で mRNA レベル、ウェスタンブロットでタンパクレベル、双方で確認できた。また KO マウスの腎臓にベースラインでの異常は認めなかった。次に、野生型マウス腎における TRPV4 の発現部位について二重蛍光免疫染色法で検証し、集合管で陽性となる Dolichos biflorus agglutinin と TRPV4 が腎髄質で共染することを確認し、同細胞で TRPV4 が発現することが示された。

腎臓の炎症における TRPV4 の役割を検証するため、TRPV4 KO マウスを用い、腎の無菌性炎症・線維化モデルである片側尿管結紮モデル(UUO)と片側虚血再灌流モデル(IRI)を作成し、炎症や線維化について継時的に検証した。対照群としては同胞の野生型(WT)マウスを使用した。

UUO は初期 (術後 2 日、6 日) では炎症が起こり、後期 (術後 10 日) では加えて線維化が起こるモデルである。初期において腎臓におけるサイトカイン、腎傷害のマーカーとなる Kim1 の mRNA レベルでの発現に有意差は認めなかった。病理組織における傷害にも差は認められなかった。後期では、代表的な炎症性サイトカインである TNF- α 、線維化で中心的な役割を果たす TGF- β 1 の発現がコントロールに比して KO マウス腎で有意に増加していた。しかし、線維性分子 (Colla1, Col3a1, α -SMA) や Kim1 の発現には差を認めず、組織傷害でも差を認めなかった。これらのことから、TRPV4 が炎症性サイトカイン産生を促進する可能性が示唆されたものの、このモデルにおいては腎傷害や線維化に影響を及ぼすほどの影響は与えないことが示された。

IRI においても、初期 (術後 2 日、8 日) では炎症が起こり、後期 (術後 14 日) では加えて線維化が起こる。初期において腎臓におけるサイトカイン、腎傷害のマーカーとなる Kim1 の mRNA レベルでの発現に有意差

は認めなかった。病理組織における傷害にも差は認められなかった。後期では、炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2, CCL5, CXCL5), 線維化で中心的な役割を果たすサイトカインである TGF- β 1, 線維性分子 (Col1a1, Col3a1, α -SMA), 腎傷害のマーカーとなる Kim1 の全てについて, WT に比して有意に KO マウス腎での発現が上昇していた。組織レベルでも, Picro-Sirius Red 染色において線維化は KO マウスの方が亢進していた。これらのことから, このモデルにおいては, 初期では TRPV4 は炎症に影響を及ぼさず, 後期では炎症・線維化を抑制する作用があることが示唆された。

以上の結果から, TRPV4 は腎疾患において, その原因や病期に応じて炎症や線維化を促進することも抑制することもあることが明らかとなった。今後, その機序の詳細を解明することで, TRPV4 作動薬や拮抗薬を, 腎疾患の種類や病期に応じて臨床応用できる可能性の基盤となる研究結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kawakami T, Mimura I, Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and fibrosis in chronic kidney disease: crossing at pericytes. *Kidney Int Suppl* (2011). 2014 Nov;4(1):107-112.

Kawakami T, Gomez IG, Ren S, Hudkins K, Roach A, Alpers CE, Shankland SJ, D'Agati VD, Duffield JS. Deficient Autophagy Results in Mitochondrial Dysfunction and FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2015 May;26(5):1040-52.

〔学会発表〕(計5件)

川上 貴久, Jeremy Duffield, 南学 正臣 . Cap mesenchyme 由来の腎上皮細胞におけ

るオートファジー欠損は巣状分節性糸球体硬化症を発症させる。第 57 回日本腎臓学会学術総会。2014 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 貴久 (KAWAKAMI, Takahisa)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10722093

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし