

令和元年6月13日現在

機関番号：13401
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2015～2018
課題番号：15H04836
研究課題名(和文) 間質病変の進展抑制におけるFSP1を介したポドサイトー尿細管上皮細胞連関の重要性

研究課題名(英文) Podocyte-tubular epithelial cell interaction plays a role to prevent tubular injury

研究代表者
岩野 正之 (Iwano, Masayuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：20275324
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト活動性糸球体腎炎では、ポドサイトがFSP1を強発現するようになる。そこで、腎障害における分泌型FSP1の生物活性を培養細胞とマウスモデルで検討した。分泌型FSP1はNrf2活性化を介し、尿細管上皮細胞(TEC)でのHO-1、SOD、チオレドキシンの産生を誘導し、TECに対し抗酸化作用および抗アポトーシス作用を有することが明らかとなった。リコンビナントFSP1はシスプラチン腎症における尿細管障害を改善した。また、ポドサイト特異的にFSP1を過剰発現させた遺伝子改変マウスでも、シスプラチン腎症における尿細管障害を改善したことから、ポドサイトー尿細管上皮細胞連関の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKIは生命予後を著明に低下させる重要な病態である。しかし現在のところAKIに対する有効な予防薬および治療薬が存在しないため、世界中で精力的に研究が行われている。分泌型FSP1は、抗炎症作用、抗アポトーシス作用および抗酸化作用を併せ持つことから、AKI新規治療薬として有望である。増加の一途を辿る透析患者数に歯止めをかけるために、腎臓病領域における新薬開発は喫緊の課題である。本研究は、創薬に直結する意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：In human active glomerulonephritis, fibroblast specific protein 1 (FSP1) was highly expressed in podocytes. In this study, we investigated biological effects of FSP1 which can be excreted from podocytes in vitro and in vivo. Recombinant FSP1 (rFSP1) induced HO-1, SOD, and thioredoxin expression in tubular epithelial cells (TEC) via Nrf2 activation and rFSP1 exerted antioxidant effects and anti-apoptotic effects on TEC. rFSP1 could ameliorate acute tubular injury in cisplatin nephrotoxicity. In transgenic mice in which FSP1 was specifically expressed in podocytes, tubular injury in cisplatin nephrotoxicity was also ameliorated, which suggests podocyte-TEC interaction.

研究分野：腎臓内科

キーワード：FSP1 ポドサイト 尿細管上皮細胞 Nrf2 抗酸化作用 急性腎障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast specific protein 1 (FSP1)は多様な生物活性を有することが示されている。われわれは種々の糸球体疾患において、糸球体障害の進展とともにポドサイトでのFSP1の発現亢進が認められ、分泌型FSP1が尿中に検出されることを報告している。ポドサイトからの生理活性物質の多くは尿細管腔に分泌されることは容易に推測可能であるにも関わらず、ポドサイトと尿細管上皮細胞間における細胞間コミュニケーションに関する研究は皆無である。

FSP1は種々の癌細胞からも分泌されるが、エクソソーム内に移行して分泌されることが報告されている。われわれは線維芽細胞においても、分泌型FSP1は主にエクソソーム分画にあることを確認した。エクソソームは新たなバイオマーカーとなり得ると同時に、新たな細胞間コミュニケーションツールとしても注目されている。

2. 研究の目的

急性腎障害(AKI)は、生命予後、疾患重症化や医療費高額化に直結する重要な病態だが、有効な治療法が存在しない。分泌型FSP1は、強力な免疫抑制作用、抗アポトーシス作用および抗酸化作用を併せ持つことから、AKI新規治療薬として有望である。本研究では分泌型FSP1のAKI治療薬としての可能性、FSP1含有エクソソームの臨床的意義および生体内におけるFSP1を介したポドサイト-尿細管上皮細胞連関の存在を検討する。

3. 研究の方法

(1) リコンビナントFSP1 (rFSP1)の尿細管上皮細胞株に対する生物活性の検討

尿細管上皮細胞株であるmProxにシスプラチン添加後、rFSP1の抗アポトーシス効果を、Cleaved-Caspase 3発現量とBax/Bcl2比のウェスタンブロットによる検討、およびAnnexinVアッセイキットを用いたFACS解析で検討した。次に、rFSP1の抗酸化作用をROSアッセイキットで検討した。さらに、rFSP1の抗酸化作用にNrf2活性化が関与するかを検討した。Nrf2活性化はrFSP1添加によるNrf2の核内移動で確認した。Nrf2活性化により誘導されるheme oxygenase 1 (Hmx1, HO-1), superoxide dismutase 3 (SOD3), thioredoxin 1 (Txn1) mRNA発現をreal-time PCRで検討した。

(2) rFSP1による急性腎障害抑制効果

シスプラチン腎症モデルを用いて、rFSP1が急性腎障害抑制効果を有するか検討した。rFSP1投与群と対照群における腎機能、腎病理における尿細管障害スコア、およびTUNEL陽性細胞数を比較した。

(3) ポドサイト特異的にFSP1を過剰発現する遺伝子改変マウス(FSP1.TG)における検討

FSP1.TGマウスとコントロールマウス(Wild)にシスプラチン腎症を作製し、腎機能、腎病理における尿細管障害スコア、およびTUNEL陽性細胞数を比較した。

(4) 患者尿におけるFSP1含有エクソソームに関する検討

当院で腎生検を実施した腎炎患者37例の尿検体を採取し、抽出キットでエクソソームを精製した。2重免疫電顕で、ポドサイトマーカーであるポドカリキシンとFSP1がエクソソーム内に共存するかを検討した。さらに、ELISA法でエクソソーム中FSP1含有量を測定し、半月体形成率などの病理パラメーターとの関連を検討した。

4. 研究成果

(1) rFSP1の抗アポトーシス効果

mProxにvehicle (DMSO)、シスプラチン(25 μ M)、シスプラチン(25 μ M)とrFSP-1 (10 μ M)の処置を24時間行った(各群、n=3)。その後、細胞を回収し、細胞破碎液を調整し

た後、イムノプロット法にて各群の cleaved caspase 3/ β -actin を測定した。シスプラチン添加で cleaved caspase 3 の発現が上昇するが、FSP-1 の添加は cleaved caspase 3 の発現上昇を有意に抑制することが明らかとなった (図 1A)。mProx に vehicle (DMSO)、シスプラチン(25 μ M)、シスプラチン(25 μ M)と rFSP-1 (10 μ M)の処置を 24 時間行った(各群、n=3)。その後、細胞を回収し、細胞破碎液を調整した後、イムノプロット法にて Bax/Bcl 比を検討した。シスプラチン添加により上昇した Bax/Bcl 比は、rFSP-1 の添加により有意に低下した(図 1B)。mProx に vehicle (DMSO)、シスプラチン(25 μ M)、シスプラチン(25 μ M)と rFSP-1 (10 μ M)の処置を 24 時間行った(各群、n=3)。その後、AnnexinV アッセイを用いた FACS 解析でアポトーシス細胞数を検討した。シスプラチン添加により有意に増加したアポトーシスを呈する細胞数は、rFSP1 の添加により有意に減少した(図 1C)。

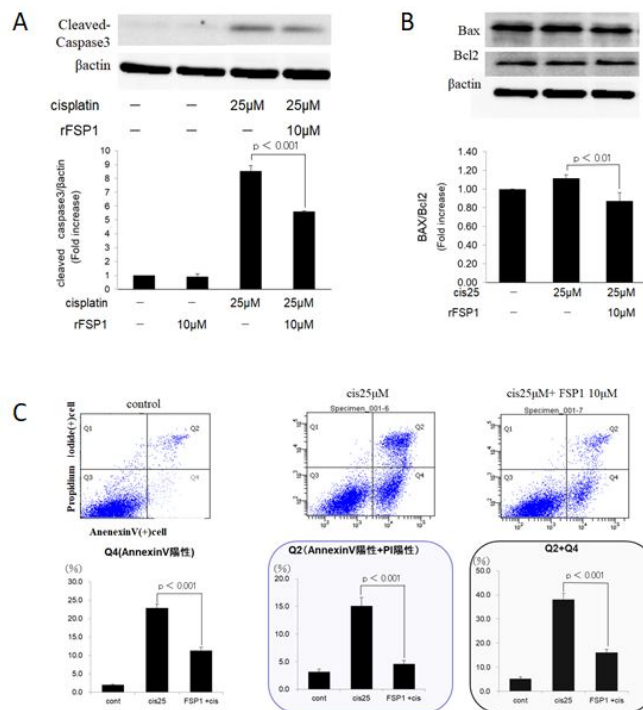


図 1A . r FSP1 による Cleaved-Caspase3 の発現抑制 B . r FSP1 による Bax/Bcl 比の低下 C . r FSP1 によるアポトーシスの抑制

(2) r FSP1 による抗酸化作用

OxiSelect Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence) (CELL BIOLABS, INC) を用いて、r FSP1 による抗酸化作用を検討した。mProx を 96 穴プレートに播種し、37 °C で 12 時間培養した。PBS で wash 後、DCFH-DA 溶液 (CELL BIOLABS, INC) を添加し 1 時間培養した。PBS で wash 後、細胞培養液のみ(control)、シスプラチン 50 μ M 添加培養液、FSP1 10 μ M 添加培養液、シスプラチン 50 μ M + FSP1 10 μ M 添加培養液、の 4 条件で 1 時間培養後、プレートリーダー(480/530nm)で蛍光強度を測定した。シスプラチン添加により ROS 産生増加を認めるが、rFSP1 の添加により増加した ROS は有意に減少した(図 2A)。rFSP1 の Nrf2 活性化作用を検討する目的で、mProx に rFSP1 10 μ M 添加後 12 時間で核蛋白を抽出後、ウェスタンプロットで Nrf2 発現を検討した。FSP1 添加により核内 Nrf2 発現が増強したことから、r FSP1 による Nrf2 活性化作用が示された。また、rFSP1 10 μ M 添加により、Nrf2 活性化により発現誘導される heme oxygenase 1 (Hox1, HO-1), superoxide dismutase 3 (SOD3), thioredoxin 1 (Txn1)の RNA 発現が有意に亢進していた(図 2B)。

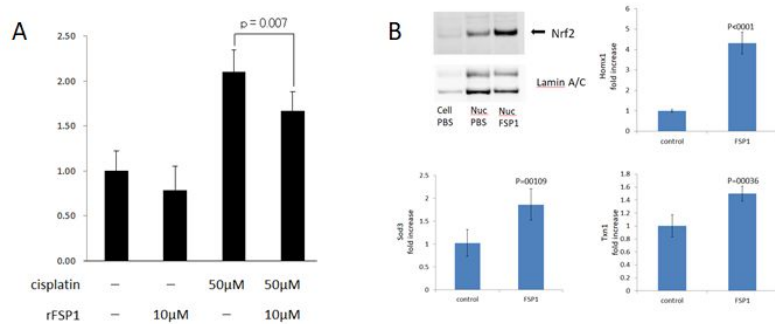


図 2A . rFSP1 の抗酸化作用 B. r FSP1 による Nrf2 活性化作用

(3) rFSP1 投与によるシスプラチン腎症改善効果

シスプラチン 20mg/kg 腹腔内投与の 30 分前に、rFSP1 1mg/マウスあるいは PBS を腹腔内投与し、rFSP1 の急性腎障害発症予防効果を検討した。シスプラチン投与後 72 時間後に、腎組織および血清を採取した。腎組織は PAS 染色を実施し、尿細管障害スコアを検討した。血清クレアチニンと BUN を測定した。さらに、TUNEL 染色により、アポトーシス細胞数を計量した。PBS 投与群と比較し、r FSP1 投与群 では、cisplatin による腎障害が減弱し、アポトーシスも抑制されることが判明した (図 3) 。

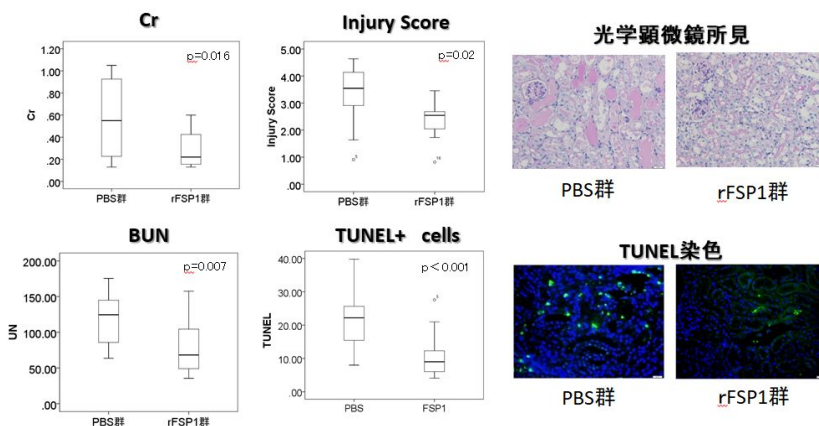


図 3 . rFSP1 投与によるシスプラチン腎症改善効果

(4) ポドサイト特異的 FSP1 発現誘導によるシスプラチン腎症改善効果

ポドサイト特異的に FSP1 を過剰発現させた遺伝子改変マウス (FSP1 TG) とコントロールマウス (Wild) にシスプラチン 20mg/kg を腹腔内投与し、シスプラチン腎症モデルを作製した。シスプラチン投与後 72 時間後に、腎組織および血清を採取した。腎組織は PAS 染色を実施し、尿細管障害スコアを検討した。血清クレアチニンと BUN を測定した。さらに、TUNEL 染色により、アポトーシス細胞数を計量した。ポドサイト特異的 FSP1 発現誘導により、cisplatin による腎障害が減弱し、アポトーシスも抑制されることが判明した (図 4) 。

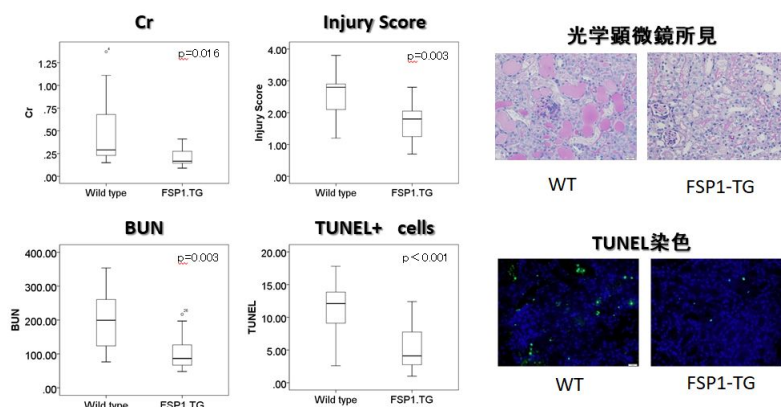


図 4 . ポドサイト特異的 FSP1 発現誘導によるシスプラチン腎症改善効果

(5) 患者尿における FSP1 含有エクソソームに関する検討

当院で腎生検を実施した腎炎患者37例（ANCA関連腎症6例、IgA腎症11例、微小変化型ネフローゼ症候群6例、膜性腎症 11例、ループス腎炎3例）の尿検体を採取し、抽出キットでエクソソームを精製した。60-nm と12-nmのcolloidal goldを用いた2重免疫電顕で、ポドサイトマーカーであるポドカリキシンとFSP1がエクソソーム内に共存することが確認された。さらに、エクソソーム中FSP1含有量を測定し、半月体形成率などの病理パラメーターとの相関が認められた(図5)。

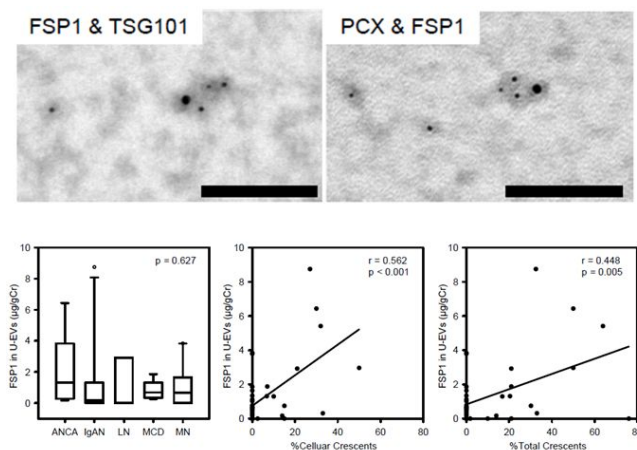


図5. 患者尿中 FSP1 含有エクソソーム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Mikami D, Iwano M, et al. -Hydroxybutyrate, a ketone body, reduces the cytotoxic effect of cisplatin via activation of HDAC5 in human renal cortical epithelial cells. *Life Sci.* 2019 Apr 1;222:125-132. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.008. 査読有

Morikawa Y, Iwano M, et al. Elevated Levels of Urinary Extracellular Vesicle Fibroblast-Specific Protein 1 in Patients with Active Crescentic Glomerulonephritis. *Nephron.* 2019;141(3):177-187. doi: 10.1159/000495217 査読有

Kobayashi M, Iwano M, et al. A short-chain fatty acid, propionate, enhances the cytotoxic effect of cisplatin by modulating GPR41 signaling pathways in HepG2 cells. *Oncotarget.* 2018 Jul 31;9(59):31342-31354. doi: 10.18632/oncotarget.25809. 査読有

Kagawa T, Iwano M, et al. Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D₃ 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun 2;500(2):275-282. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.058. 査読有

Takahashi N, Iwano M, et al. Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Dec;28(12):3688-3698. doi: 10.1681/ASN.2016101074. 査読有

Kobayashi M, Iwano M, et al. Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF- α -induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr 29;486(2):499-505. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.071 査読有

Shimada A, Iwano M, et al. Serum CETP status is independently associated with reduction rates in LDL-C in pitavastatin-treated diabetic patients and possible involvement of LXR in its association. *Lipids Health Dis.* 2016 Mar 17;15:57. doi: 10.1186/s12944-016-0223-6. 査読有

Nakao M, Iwano M, et al. Dietary phosphate supplementation delays the onset of iron deficiency anemia and affects iron status in rats. *Nutr Res.* 2015 Nov;35(11):1016-24. doi: 10.1016/j.nutres.2015.09.001. 査読有

Kimura N, Iwano M, et al. Renal resistive index correlates with peritubular capillary loss and arteriosclerosis in biopsy tissues from patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2015 Dec;19(6):1114-9. doi: 10.1007/s10157-015-1116-0. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

横井靖二、岩野正ら。シスプラチン腎症改善効果より示唆された分泌型 FSP1 を介したポドサイトー尿細管上皮細胞連関。第 61 回日本腎臓学会学術総会、2018 年 6 月 10 日、朱鷺

メッセ（新潟市）

Kenji Kasuno, Masayuki Iwano, et al. Intracellular Thioredoxin Depletion Triggers Tubular Epithelial G2/M arrest in Acute Kidney Injury. 第 61 回日本腎臓学会学術総会、2018 年 6 月 9 日、朱鷺メッセ（新潟市）

Yukie Morikawa, Masayuki Iwano, et al. Elevated Levels of Urinary Extracellular Vesicle Fibroblast-Specific Protein 1 in Patients with Active Crescentic Glomerulonephritis. Kidney Week 2018、2018 年 10 月 26 日、サンディエゴ コンベンションセンター（サンディエゴ）

Naoki Takahashi, Masayuki Iwano, et al. Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells. Kidney Week 2017、2017 年 11 月 2 日、モリアルコンベンションセンター（ニューオリンズ）

岩野正之 ネフローゼ症候群の発症機序（オーバービュー）。第 47 回日本腎臓学会西部学術大会、2017 年 10 月 14 日、岡山コンベンションセンター（岡山市）

森川幸恵、岩野正之ら。尿中エクソソーム内 FSP1 発現量は、活動性半月体形成性腎炎で増加する。第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月 26 日、仙台国際センター（仙台市）

糟野健司、岩野正之。新規尿中バイオマーカー。第 58 回日本腎臓学会学術総会、2015 年 6 月 5 日、名古屋国際会議場（名古屋市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：抗酸化剤および腎障害処置剤

発明者：岩野正之、横井靖二、木村秀樹

権利者：国立大学法人福井大学

種類：特許

番号：特願 2017-055092

出願年：2017 年

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-n.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/nephrology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松阪 泰二

ローマ字氏名：Matsusaka Taiji

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：50317749

研究分担者氏名：栗原 秀剛

ローマ字氏名：Kurihara Hidetake

所属研究機関名：藍野大学

部局名：医療保健学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：80311976

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。