

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790807

研究課題名(和文) 腎線維症におけるトルライクレセプター4の役割と治療意義に関する研究

研究課題名(英文) The role of TLR4 in the pathogenesis of renal fibrosis and the possible effect of blocking TLR4 signal

研究代表者

宮田 仁美 (MIYATA HITOMI)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：80529751

研究成果の概要(和文)：

TLR4は、最近肝線維化に関与していることが示され、水腎症モデルマウスにおける腎線維化にも関与しているのではないかと仮定し研究をすすめた。野生型、欠損、低発現マウスに分けて、片側尿管結紮にて水腎症マウスを誘導し血行動態的な変化、ならびに組織学的、分子生物学的な変化について比較を行った。欠損マウスならび低発現マウスにおいては、線維化の進行が有為に遅れたがその作用は早期に限られた。

研究成果の概要(英文)：

We hypothesized that TLR4 might be involved in the development of UO induced renal injury, which has been reported that it plays a role in the pathogenesis of liver fibrosis. The current study was performed using wild type, deficient, (TLR4 knock out mice) and HEJ(TLR4 defective) mice which were inducted UUO. We compared these groups using parameters such as microcirculation, histological and molecular biological methods The results suggested that TLR4 would be related with the early phase of renal fibrosis induced by UO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、腎臓内科学

キーワード：腎臓病、腎線維化、TLR4、IVFM

1. 研究開始当初の背景

現在末期腎不全で透析療法を受けている患者は日本で25万人以上にのぼり、医療経済を圧迫していることは論をもたない。腎不全の原因は多様であるが、腎間質の線維化が、腎予後を規定する最も重要な因子の一つであることはよく知られており、腎間質線維化

進展の病態解明および新たな治療ターゲットの開発が急務である。特に水腎症で生じた腎不全においては尿逆流による腎内圧上昇、血液還流の低下、低酸素状態の持続により renin-angiotensin system の活性化ならびに、reactive oxygen species (ROS) の産生が促進される。それらによりマクロファージ、

リンパ球など炎症性細胞が腎内へ動員され、その浸潤細胞などから TGF- β , TNF α などの炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカインの産生促進がおこり細胞外基質の増生を促す。腎臓における炎症は、病態の改善がない限りアポトーシス（細胞死）がすすみ、細胞外基質が蓄積し線維化が進む(Klahr, *Kidney Int* 23:414-429;1983)。

一方、最近 細菌や、ウイルスの合成成分を認識するレセプターとして Toll like receptor(TLR)が発見された。そのうちエンドトキシン(LPS)の受容体として知られる TLR4 は、敗血症などの感染病態のみならず、移植腎、虚血腎のような非感染症の病態にも関与していることが示されるようになった。更に LPS 以外に heat shock protein などの急性期タンパクが TLR4 伝達経路を通じて NF κ B や MAPK を活性化することが報告された。さらに、炎症治癒過程で出現するフィブロネクチン、フィブリノーゲンや、ヒアルロン酸などの細胞外基質がリガンドとなることもわかってきた(Akira S, *Nat Rev Immunol* 4: 499-511; 2004)。また Seki らは、肝線維化進展に TLR4 が関与すると報告した (*Nat Med* 13(11): 1324-32; 2007)。TLR 4 は腎臓では、マクロファージやリンパ球などの浸潤細胞だけでなく、尿管上皮細胞、血管平滑筋細胞、メサンギウム細胞にも発現が認められており(Hans-Jachin, *J Am Soc Nephrol*. 15(1): 854-867;2004)、腎線維症の病態に強く関わりとされる angiotensin や hypoxa inducible factor(HIF)で TLR 4 細胞内経路が活性化されることから(Wolf G, *J Am Soc Nephrol* 17(6)' 158-93;2007, Vadum V, *FEBS letters* 582: 319-326; 2008)、腎線維症の進展にも TLR 4 の関与が強く予想される。本研究では、TLR 4 を介した新たな腎間質線維化進展のメカニズムを明らかにするとともに抗

TLR4 抗体治療効果を含め検証する。

水腎症で生じた腎不全においては尿逆流による腎内圧上昇、血液還流の低下、低酸素状態の持続により renin-angiotensin system の活性化ならびに、reactive oxygen species (ROS) の産生が促進される。それらにより炎症性細胞が腎内へ動員される。その浸潤細胞などから TGF- β , TNF α などの炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカインの産生促進がおこり細胞外基質の増生を促す。腎臓における炎症は、病態の改善がない限りアポトーシス（細胞死）がすすみ、細胞外基質が蓄積し線維化が進む。

一方、最近 細菌や、ウイルスの合成成分を認識するレセプターとして Toll like receptor(TLR)が発見された。そのうちエンドトキシン(LPS)の受容体として知られる TLR4 は、敗血症などの感染病態のみならず、移植腎、虚血腎のような非感染症の病態にも関与していることが示されるようになった。更に LPS 以外に heat shock protein などの急性期タンパクが TLR4 伝達経路を通じて NF κ B や MAPK を活性化することが報告された。TLR 4 は腎臓では、マクロファージやリンパ球などの浸潤細胞だけでなく、尿管上皮細胞、血管平滑筋細胞、メサンギウム細胞にも発現が認められており(Hans-Jachin, *J Am Soc Nephrol*. 15(1): 854-867;2004)、腎線維症の病態に強く関わりとされる angiotensin や hypoxa inducible factor(HIF)で TLR 4 細胞内経路が活性化されることから(Wolf G, *J Am Soc Nephrol* 17(6)' 158-93;2007, Vadum V, *FEBS letters* 582: 319-326; 2008)、腎線維症の進展にも TLR 4 の関与が強く予想される。

2. 研究の目的

TLR 4 を介した新たな腎間質線維化進展のメカニズムを IVFM を用いた手法、組織学的、

分子細胞学的な変化を検証する明らかにする。本研究では、生体蛍光顕微鏡観察(IVFM)の手法を用い、片腎尿管結紮した水腎症モデルマウスの腎臓を血行動態的な変化を観察する生体蛍光顕微鏡を用いたシステムを確立しこれについても比較検討する。

3. 研究の方法

まず、野生型 (BL6) マウス、TLR4 欠損マウス、自然発症 TLR4 低発現マウス (HEJ) に片側尿管結紮を施し水腎症モデルを作る。A. 野生型 UUO マウスの腎線維化進行と TLR4 の発現との関連性の解析

1. 組織学的な変化の観察 UUO マウスから腎臓の組織を経時的に取り出しパラフィン切片作成、ならびに凍結切片にて観察した。(1) 線維化は経時的に進行した。(2) TLR4 の発現量を免疫染色法を用いて観察する。(3) 免疫染色法を用いてマクロファージ細胞や、樹状細胞の炎症性細胞の浸潤ならびに α smooth muscle actin(SMA) などの線維化関連タンパクの発現部位や発現強度についても観察する。

2. 線維化関連タンパクの検討 UUO マウスから腎臓の組織を経時的に取り出し 液体窒素で凍結させ-80 度に保存し、そのサンプルを用い凍結組織からタンパクを抽出し 1 型コラーゲン(Sircol collagen assay kit 使用)、 α smooth muscle actin(SMA), など Western blot 解析により腎線維化に関連するタンパク質発現量を調べる。

3. TLR4 シグナル伝達で活性化される因子の評価 ゲルシフトアッセイ (EMSA) により活性化 NF- κ B などの核内タンパク質の発現量を調べる

4. 生体蛍光顕微鏡(IVFM)の手法を用い、水腎症の進展に伴う血行動態的な変化について検察し、TLR4 欠損マウス群との比較を行う。

4. 研究成果

まずは、片側尿管閉塞(UUO)モデルマウスを用いて最長 14 日の観察を行った。組織においては線維化が進行し TLR4 の発現は増加した。特に浸潤細胞の中に TLR4 陽性細胞が多くみられた。また IVFM で観察したところ、24 時間後有意に perfusion の低下をみたが、TLR4 欠損マウスでは保たれている傾向が見られた。線維化進行に伴うコラーゲンの発現や浸潤細胞数が TLR4 低発現マウスでは有意に低かった。しかしながらその差は早期(7日)にとどまり 14 日目には認められなくなった。また TLR4 欠損マウスにとおいて下流域にあるとされる NF κ B の活性も早期に低下していることが確認され少なくとも早期の段階で TLR4 は関与していることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

2009 年

第 5 2 回日本腎臓学会学術総会 1st June 2009, in 横浜 神奈川県

渡部仁美、深津敦司、Das Rahul、Antony Wheatley

生体蛍光顕微鏡による水腎症マウスにおける血行動態ならびに構造的変化の観察

世界腎臓学会 on 26th May 2009, in Milan Italy

Hitomi Watanabe, Atsushi Fukatsu, Rahul Das and Antony Wheatley

Hemodynamic and structural changes to the renal microcirculation following unilateral ureteral obstruction(UUO) in the mouse

2010

第 1 7 回ヨーロッパ腎臓学会 in Munich Germany on 27th June 2010

Hitomi Miyata-Watanabe,^{1,2} April Xu-Holland,² Atsushi Fukatsu,¹ Antony Wheatley

The possible effect of Toll-like receptor 4 on the early stage of renal fibrosis

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田仁美 (MIYATA HITOMI)

京都大学・医学研究科 医員

研究者番号：80529751