

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16249

研究課題名（和文）尿細管特異的Nrf2欠損による腎間質線維化増強作用に関する研究

研究課題名（英文）Fundamental research on the influence of tubule-specific Nrf2 deletion on renal interstitial fibrosis

研究代表者

菱田 英里華（Hishida, Erika）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80742494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では尿細管特異的Nrf2欠損マウス(Nrf2f/f; Pax8cre/+)を用いて片側尿細管結紮(UUO)モデルとアデニン腎症モデルを作製し、腎障害への経時的な影響を解析した。UUO day 14でのMicroarray解析では、Nrf2f/f; Pax8cre/+群で尿細管トランスポーター(ex. Slc5a2, Slc9a3, Slc4a4, Slc12a1)やKl (Klotho) mRNA、Lrp2 (Megalin)発現などの発現が低下した。以上より、尿細管特異的Nrf2欠損は腎障害の早期段階で近位尿細管障害に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、尿細管特異的Nrf2欠損の腎間質障害への関与について新たな知見が得られた。慢性腎臓病は日本人の約1480万人が罹患している国民病であり、透析患者数も未だ34万人と多く、日本の保険医療財政を圧迫していることから、腎疾患の発症・進展予防対策は喫緊の課題である。慢性腎臓病の治療薬は近年進歩しているものの、残余リスクは未だ存在する。本研究に基づくNrf2およびその下流遺伝子を標的とした治療法の開発は、慢性腎臓病の克服や透析患者数の減少、生命予後の改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, unilateral ureteral obstruction (UUO) and adenine nephropathy models were created using tubule-specific Nrf2-deficient mice (Nrf2f/f; Pax8cre/+), and the temporal effects on renal impairment were analyzed. Microarray analysis at UUO day 14 revealed decreased expression of tubular transporters (e.g., Slc5a2, Slc9a3, Slc4a4, Slc12a1), Kl (Klotho mRNA), and Lrp2 (Megalin) expression in the Nrf2f/f; Pax8cre/+ group. These findings suggest that tubule-specific Nrf2 deficiency contributes to the proximal tubular damage at an early stage of renal impairment.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：Keap1-Nrf2系 尿細管間質障害 近位尿細管 腎間質線維化

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)の病期が進行すると、最終的には末期腎不全に至るが、CKDの基礎疾患の種類を問わず、その final common pathway として尿細管間質の線維化(fibrosis)が重要であることはよく知られている。臨床的に進行した CKD の病期を逆行させるのは極めて難しいと考えられている。しかし 2011 年に発表された BEAM trial (N Engl J Med 2011; 365:327-336) において Bardoxolone methyl (C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid (CDDO-Me)) が糖尿病性腎症患者の推定糸球体濾過率を上昇させると報告された。

図1

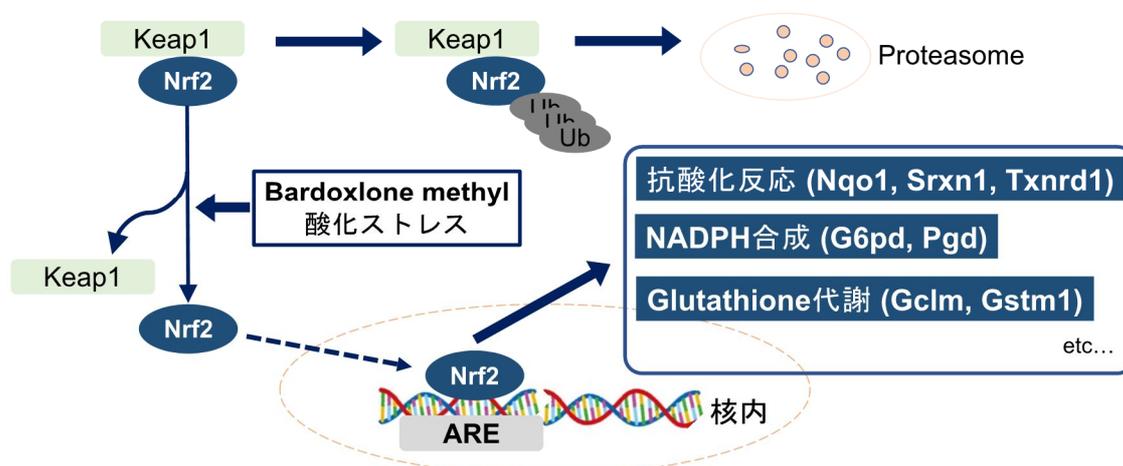


図1の様な機序で CDDO-Me は、同系統の Triterpenoid である CDDO-imidazole (im) と同じように Nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf)2-KEAP1 系を活性化させることが知られている。定常状態では Nrf2 は Keap1 と結合し、ユビキチン化されてプロテアソームで分解されるが、CDDO-Me 刺激で Nrf2 は Keap1 から分離して核内に移行し、superoxide dismutase, catalase, hemo-oxygenase 1, glutathione reductase など抗酸化作用を持つ酵素の転写を促す。また Keap1 が NF- $\kappa$ B の上位キナーゼである IKK を抑制すると考えられており、これによっても炎症が抑制されると考えられている。

しかし、臨床的に CDDO-Me が糖尿病性腎症患者の GFR を回復させた機序を説明するのは困難である。尿細管特異的な Keap1 knock out マウスを使った腎虚血再灌流障害( IRI) の検討 (Kidney Int 2017;91:387-401) では、尿細管における Nrf2-Keap1 系の活性化が、尿細管細胞の障害・細胞死を抑制することが示された。この報告では、間質線維化も抑制されているが、その機序については明示されていない。したがって腎尿細管細胞の Nrf2-Keap1 系活性化が間質線維化抑制に必要なのかは不明であり、現状ではどの細胞の Nrf2-Keap1 系の活性化が重要なのかは未解明である。先行研究においては、間質線維化を促進するのは障害された尿細管細胞が産生する TGF $\beta$ 、PDGF、CTGF、Wnt、Hedgehog、等が fibroblast から myofibroblast への形質転換や線維化促進を促すことが示されている。また間質線維化の進行にともない peritubular capillary (PTC) の密度が低下するため、PTC 減少による尿細管

周囲の hypoxia や oxidative stress が何らかの影響を与えている可能性も考えられる (Kidney Int 2017;92:558-568)。したがって CDDO-Me の作用が Nrf2 の転写活性上昇を介すると仮定した場合、尿細管に作用して pro-fibrotic factor を抑制する因子の産生を促す、血管内皮細胞に作用し、peritubular capillary (PTC)の減少を抑制して、間質の hypoxia を改善する、の2つの作用のどちらかであると考えられる。この2つの可能性について詳細を検討した研究はない。

一方、BEAM trial の後に実施された BEACON trial (N Engl J Med 2013; 369:2492-2503) において CDDO-Me 投与群で心不全が有意に増加したこと、BEAM, BEACON の両 Trial とともにアルブミン尿が増加すること、CDDO-Me の代謝産物で Nrf2 活性化作用があるものの幾つかが肝障害や糸球体硬化を惹起すること (Am J Physiol Renal Physiol 304:F808-819, 2013) が示されている。臨床応用を考えた場合、CDDO-Me の Nrf2 活性化以外の非特異的な作用をなるべく排除すると同時に、腎間質線維化抑制以外の Nrf2 の作用を可能な限り避けたい。そのためには Nrf2 の下流で抗間質線維化を司っている因子を特定することが必須であり、その責任因子を明確化することは今後の創薬を目指す上でも重要である。

## 2. 研究の目的

尿細管特異的 Nrf2 欠損、血管内皮特異的 Nrf2 欠損のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、腎尿細管間質線維化における抗酸化因子 Nrf2 とその下流の抗間質線維化を司っている因子の役割を解析する。

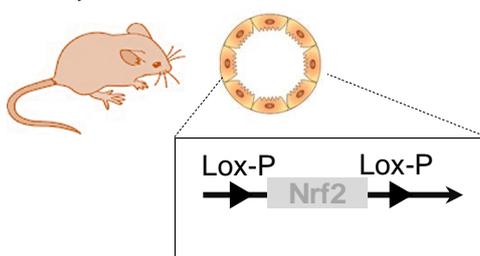
## 3. 研究の方法

創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援の下、群馬大学畑田教授と共同で、図3のように Nfe2l2 (Nrf2) 遺伝子の Exon5 を挟み込むように flox 配列を挿入した遺伝子改変マウスを作成した。また尿細管特異的な Pax8-Cre マウスおよび血管内皮特異的な Tie2-Cre マウスと交配し、Pax8-Cre/flox-Nrf2 および Tie2-Cre/flox-Nrf2、2種類の conditional knock out (CKO) マウスを作出した (図2)。それぞれ、尿細管特異的および血管内皮特異的に Nrf2 を欠損する。これらコンディショナルノックアウトマウスを用いて、以下の2つの腎間質線維化モデルの解析を進めた。

図2

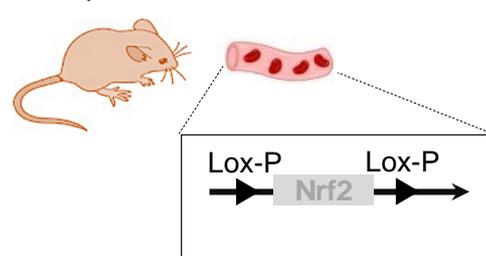
### 尿細管特異的Nrf2欠損マウス

$Nrf2^{f/f}; Pax8^{Cre/+}$



### 血管内皮特異的Nrf2欠損マウス

$Nrf2^{f/f}; Tie2^{Cre/+}$



#### (1) Adenine 腎症モデル

C57BL/6 マウスや尿細管/血管内皮特異的 Nrf2 欠損マウスに 0.2%アデニン含有の餌を投与し、腎間質線維化モデルを作製した。投与後 1, 2, 3, 4, 8 週間のタイミングでそれぞれ屠殺して腎組織や血清を採取しリアルタイム PCR や Microarray 解析で腎組織中の mRNA を評価、Western Blotting で蛋白発現、血清中の BUN, Creatinine 等の評価を行った。

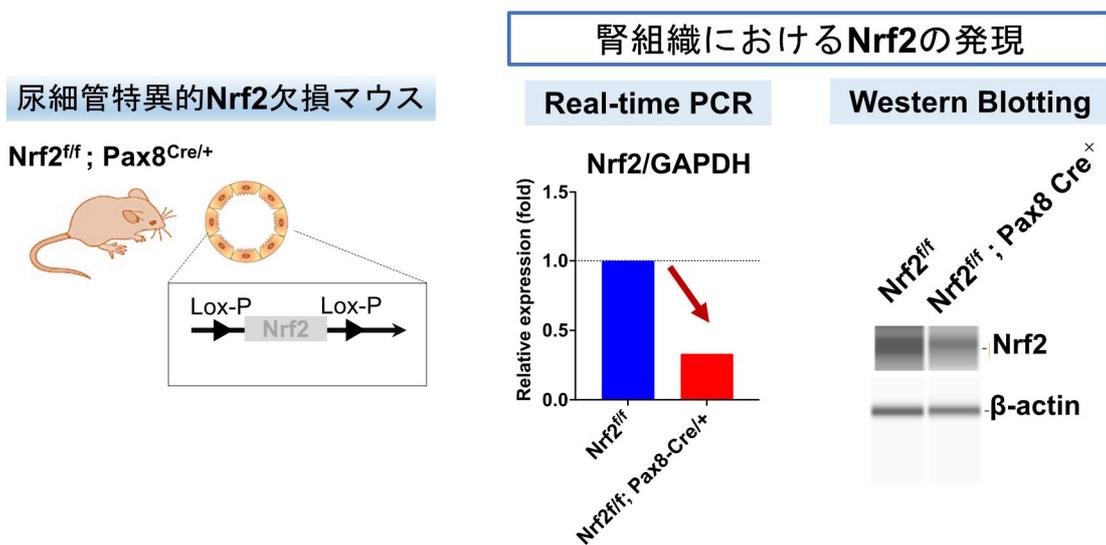
#### (2) 片側尿管結紮モデル

C57BL/6 マウスや尿細管特異的 Nrf2 欠損マウスに片側尿管結紮を行い、3, 7, 14 日目に屠殺して腎組織、血清を採取し、腎組織中の mRNA, 蛋白, 血清中の BUN, Creatinine 等の評価を行った。

### 4. 研究成果

尿細管特異的 Nrf2 欠損マウス(Nrf2<sup>ff</sup>; Pax8<sup>cre/+</sup>)の腎組織において、Western blot および real-time PCR で確かめたところ、Nrf2 の欠損率は RT-PCR で 7 割程度であり、蛋白レベルでも発現が減少していることを確認した (図 3)。

## 図3

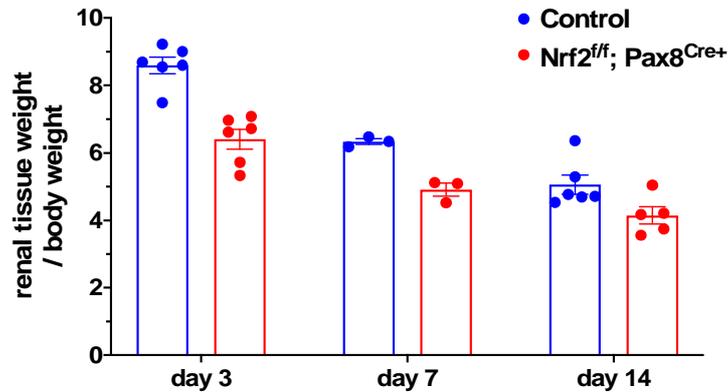


次に、血管内皮特異的 Nrf2 欠損マウス(Nrf2<sup>ff</sup>; Tie2<sup>cre/+</sup>)の初代血管内皮細胞採取を試みた。通常の Wild Type マウスにおいては、Miltenyi Biotec®社の MACS (Magnetic cell sorting 法)を用いて CD31 陽性, CD45 陰性の腎血管内皮細胞の採取を行うことには成功したが、Nrf2<sup>ff</sup>; Tie2<sup>cre/+</sup>マウスの血管内皮細胞は死細胞が多く、一回あたりの採取匹数を 8 匹程度へ増やしても解析に十分な細胞量を採取する事ができなかった。このことから、single cell RNA 解析の手法等を用いないと Nrf2<sup>ff</sup>; Tie2<sup>cre/+</sup>マウスの血管内皮細胞の詳細な解析が困難であると考えられ、今後の研究課題と考えられた。

次に、Nrf2<sup>ff</sup>; Pax8<sup>cre/+</sup>を用いて 1) 片側尿管結紮(UUO)モデル (day 7, 14) 2) アデニン腎症モデル (day 7, 14, 21, 28)を作製し、腎間質線維化への経時的な影響を解析した。Nrf2 下流遺伝子 Nqo1, Gstm1 mRNA 発現はアデニン day 7 で増加、アデニン腎症 day 14, UUO day 7 以降で経時的に減少した。また UUO day 3、アデニン腎症 day 21 時点で Nrf2<sup>ff</sup>;

Pax8<sup>Cre/+</sup>群において腎重量の有意な減少を認めた(図 4)。

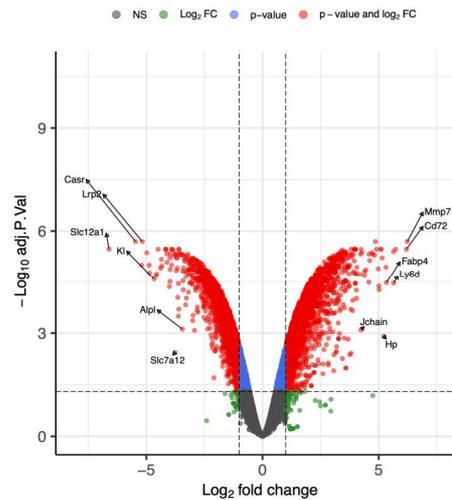
図4 UUOモデル: 結紮側腎臓重量/体重比



さらに、Nrf2 欠損により影響する遺伝子の網羅解析を行うため、UUO day 14 の腎組織 Microarray 解析を施行したところ、Nrf2<sup>f/f</sup>; Pax8<sup>Cre/+</sup>群で尿細管トランスポーター(ex. Slc5a2, Slc9a3, Slc4a4, Slc12a1)やKI (Klotho) mRNA、Lrp2 (Megalin)発現が顕著に低下していた(図 5)。

図5 UUO\_vs\_Pax8\_Cre\_UUO

Volcano plot  
EnhancedVolcano



これらの結果から、各モデルの尿細管トランスポーター発現推移を解析したところ、Ade day 21, UUO day 7 時点で Slc5a2 (SGLT2) mRNA 発現が Nrf2<sup>f/f</sup>; Pax8<sup>Cre/+</sup>群で有意に減少し、腎臓重量/体重比の減少タイミングと一致した。しかし、Slc12a3(NCC)発現は Ade day 7, UUO day 7 で増加し、Nrf2<sup>f/f</sup>; Pax8<sup>Cre/+</sup>群で更に増悪した。一方で、matrix metalloproteinase である Mmp7 mRNA 発現はアデニン腎症 day 21, UUO day 7, 14 時点で Nrf2<sup>f/f</sup>; Pax8<sup>Cre/+</sup>群で増悪したが、線維化マーカー Col1a1, Fn1 や Megalin の発現に有意差は示されなかった。以上より、尿細管特異的 Nrf2 欠損は腎間質障害の比較的早い段階で近位尿細管障害に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菱田 英里華
2. 発表標題 尿細管・血管内皮Nrf2欠損が腎間質線維化に及ぼす影響についての検討
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菱田 英里華
2. 発表標題 腎尿管障害と間質線維化におけるNrf2の細胞特異的な役割
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菱田 英里華
2. 発表標題 尿管特異的Nrf2欠損は腎間質線維化(RIF)の初期段階に近位尿管障害を増悪させる
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------