

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09283

研究課題名(和文) 高血圧性腎障害における血管周細胞の NF-kB シグナルの役割解明

研究課題名(英文) The role of NF-kB signal of pericytes in hypertensive renal injury

研究代表者

中川 直樹 (NAKAGAWA, Naoki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10451460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の高血圧有病者数は約4300万人と推定され、高血圧性臓器合併症は増加の一途を辿っており、その病態進展の抑制は極めて重要な課題である。毛細血管は、血管内皮細胞と血管周細胞(Pericytes:PCs)から構築されているが、我々はPCsにおける転写因子NF-kBシグナルに注目し、PCsマーカーであるCollagen 1a1陽性細胞特異的にNF-kBシグナルを過剰発現するマウスの作製に成功した。高血圧モデルとしてアンジオテンシンII負荷による心・腎組織障害を評価したところ、腎線維化には有意差は認めなかったが、心臓の冠動脈周囲の線維化には有意差を認め、NF-kBシグナルの重要性を確認できた。

研究成果の概要(英文)：The number of hypertensive patients in Japan is estimated to be around 43 million. Therefore, the suppression of hypertensive organ damages are an extremely important issue. Capillary vessels are constructed from vascular endothelial cells and pericytes (Pericytes: PCs). Thus, we focused on the transcription factor NF-kB signaling in PCs and succeeded the production of mice which overexpressed NF-kB signaling in Collagen 1a1 positive PCs. We used angiotensin II load models as a hypertension model and found that no significant differences in kidney fibrosis between controls and NF-kB overexpressing mice, but a significant difference was observed in the fibrosis around the coronary artery of the heart between two groups. Finally, we confirmed the importance of NF-kB signaling in the fibrosis in hypertensive organ damages.

研究分野：腎臓内科

キーワード：線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における高血圧有病者数は現在約4300万人と推定されている。高血圧性心肥大・心不全、および高血圧性腎硬化症による透析導入は増加の一途を辿っており、その病態進展の抑制は極めて重要な課題である。

(2) 毛細血管は、血管内皮細胞と血管周細胞(Pericytes: PCs)から構築されており、PCsは脆弱な内皮管腔の外側を囲み、毛細血管としての構造維持のほか、自ら平滑筋細胞へ分化し血管成熟化にも関与する。

これまで我々は、時間的・空間的に遺伝子発現を制御できる Cre/LoxP システムを用いて、PCs 特異的遺伝子改変マウスで慢性腎臓病の病態進展における PCs の役割を明らかにしてきた【Nakagawa N, et al. *Kidney Int.* 87:1125-40, 2015, Nakagawa N, Duffield JS. *Curr Pathobiol Rep.* 1(3), 2013】。

高血圧を惹起するアンジオテンシン II (ATII) は昇圧作用のみならず局所での酸化ストレスを亢進させる。NF- $\kappa$ B は ATII の下流に位置する転写因子で、炎症性サイトカインなどを誘導し、各種病態において血管新生を抑制し、間質の線維化を促進することが知られているが、PCs における細胞特異的な役割については不明である。

2. 研究の目的

我々はPCs 特異的に NF- $\kappa$ B シグナルを条件的にノックアウト及び過剰発現させることで、高血圧性心腎連関における NF- $\kappa$ B シグナルの役割を解明し、慢性心不全及び慢性腎臓病の新規治療への応用を模索することを目的にした(図1)。

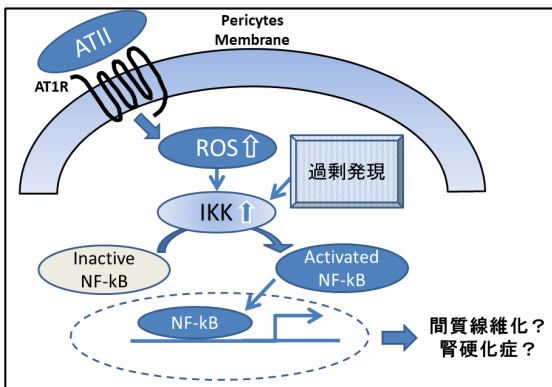


図1 細胞特異的 NF- $\kappa$ B シグナルからみる高血圧性腎障害における PCs の役割

3. 研究の方法

(1) PCs マーカーとして Collagen 1a1 (Col1a1) 遺伝子のプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスと、

NF- $\kappa$ B シグナル伝達系において中心的役割を担うことが知られている ikkb を過剰発現するマウスを交配させることで、PCs 特異的 NF- $\kappa$ B シグナル過剰発現マウスを作製し、in vivo での ATII 負荷における心・腎機能および組織障害を評価した(図2)。

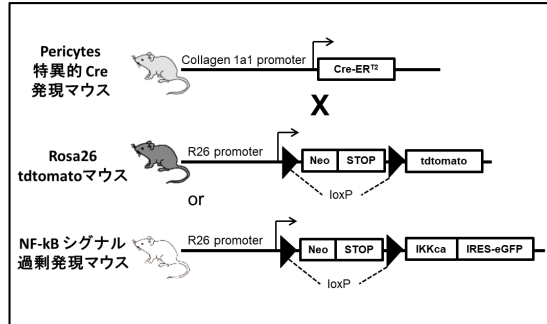


図2 PCs 特異的 NF- $\kappa$ B シグナル遺伝子改変マウスの作成

Col1a1 プロモーターはマウス collagen type I alpha 1 ゲノムのプロモーター領域、loxP は Cre により触媒される特定の DNA 配列、Cre は loxP 配列に対する DNA 組換え酵素で、Cre/loxP システムは細胞特異的遺伝子改変モデルを作成する際に汎用されているシステムである。Ikkb はセリンスレオニンタンパク質キナーゼであり、転写因子 NF- $\kappa$ B 複合体の阻害剤である I- $\kappa$ B タンパク質をリン酸化する。Rosa26 はほぼ全ての細胞に発現のみられる遺伝子座、Neo はネオマイシン耐性遺伝子、tdTomato は赤色蛍光タンパクである。beta-globin poly A は beta-globin 遺伝子の 3'末端に polyA 配列が組み込まれたもので、導入したい遺伝子をほぼ全身性に過剰発現させることができる。

(2) 高血圧性腎障害を惹起するモデルとして確立されているアンジオテンシン II 持続静注 (1500 ng/kg/min) を以下の PCs 特異的 NF- $\kappa$ B シグナル過剰発現 マウスに2週間および4週間行い、病態形成前と同様、生理学的、生化学的、病理学的に詳細に評価し、NF- $\kappa$ B シグナルの役割を解明する。タモキシフェン(1mg/日)はアンジオテンシン II 投与1週間前より5日間、連日投与した(図3)。

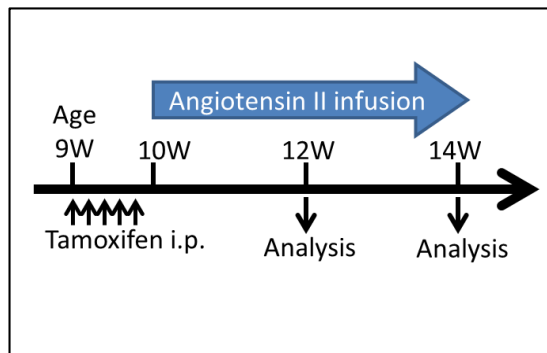


図3 アンジオテンシン II 投与プロトコール

(3) 以下の項目につき評価した。  
 Control マウス: Col1a1-CreER+; IKKca flox/+  
 PCs 特異的 ikbkb 過剰発現マウス: Col1a1-CreER+; IKKca flox/flox  
 生理学的評価: 体重、血圧 (tail-cuff)  
 生化学的評価: 血尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、アルブミン尿、尿中電解質  
 病理学的評価: PAS、PAM、Masson-Trichrome 染色による系球体・尿管・間質線維化、各種免疫染色: Col1a1 および PDGFR (PCs)、CD31 (ECs)

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では、血管周細胞 (Pericytes: PCs) 特異的に、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子である NF- $\kappa$ B シグナルを過剰発現させることで、アンジオテンシン II 負荷モデルにおける血管周細胞の NF- $\kappa$ B シグナルの役割を解明し、高血圧性心・腎障害の新規治療への応用を目指すことを目的とした。

PCs マーカーである Col1a1 遺伝子のプロモーター制御下で タモキシフェン誘導により Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Col1a1CreER マウス) そのプロモーター活性を調べる目的で、ROSA26-tdtomato マウスを交配・繁殖に成功した。そして、Col1a1CreER; tdtomato マウスにタモキシフェンを投与し、Col1a1 陽性細胞が、心臓および腎臓の血管周囲に存在することを明らかにした (図 3)。



図 3 血管周細胞周囲の Col1a1 陽性細胞 (赤)

(2) さらに、Col1a1CreER マウスと、NF- $\kappa$ B シグナル伝達系において中心的役割を担うことが知られている ikbkb をコンディショナリに過剰発現するマウスと掛け合わせることで、時間的・空間的に PCs 特異的に NF- $\kappa$ B シグナルを過剰発現したマウスの病態モデルを解析することにし、交配・繁殖に成功した。

(3) Col1a1CreER; ikbkb 過剰発現マウスにおいて、高血圧性腎障害を惹起するモデルとして確立されているアンジオテンシン II 負荷 + 食塩負荷を用いて、心・腎機能および心・腎組織障害の解析を進めたが、体重・血圧・腎機能・アルブミン尿・腎臓の間質線維化に関しては、コントロールマウス群と

Col1a1CreER; ikbkb 過剰発現マウス群に有意な差は認めなかった。

心臓の組織障害は Col1a1CreER; ikbkb 過剰発現マウスにおいて、コントロールマウス群に比べ、Col1a1CreER; ikbkb 過剰発現マウス群で、冠動脈周囲の線維化が有意に増悪していた (図 2A および 2B: タモキシフェン処置後コントロール群  $0.45 \pm 0.08$ 、過剰発現群  $0.71 \pm 0.05$ 、 $P < 0.05$ )。

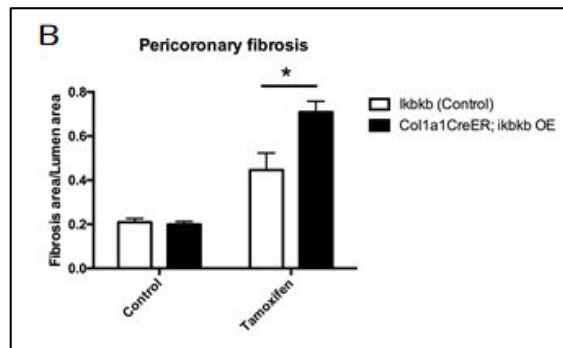
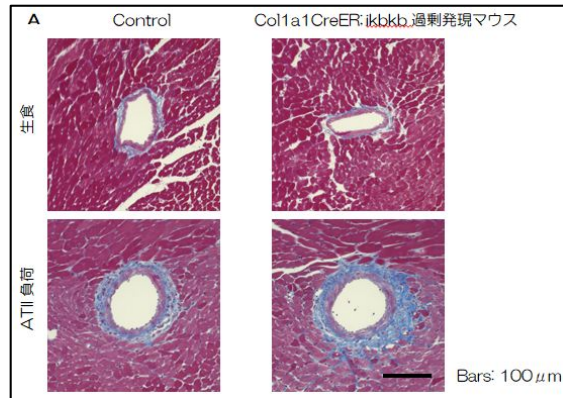
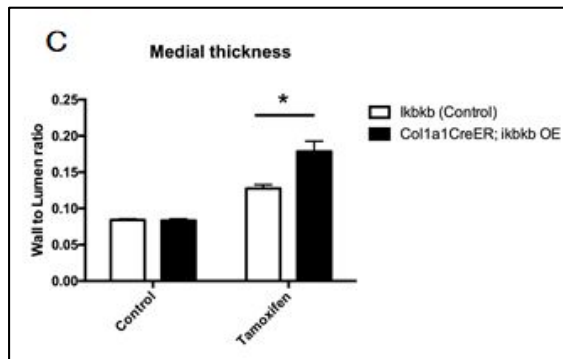


図 2 冠動脈周囲の線維化および血管平滑筋の肥厚

さらに、上記モデルにおいて、コントロールマウスに比べ、Col1a1CreER; ikbkb 過剰発現マウスで、冠動脈の血管平滑筋の肥厚が、有意に増悪していることを明らかにした (図 2A および 2C: タモキシフェン処置後コントロール群  $0.13 \pm 0.01$ 、過剰発現群  $0.18 \pm 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。



これらマウスから、Col1a1 陽性血管周細胞を磁気細胞分離を用いて採取・培養し、

現在 in vitro での解析も進めている。

今後、現在進行中の in vivo、in vitro の解析を推進し、学会発表および論文文化を進めていく予定である。

#### 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5件)

中川 直樹、高血圧性心腎連関における血管周細胞 NF- $\kappa$ B シグナルの役割解明、第30回(平成27年度)寿原記念財団設立30周年記念研究成果報告書、査読無、2017、119-121

Nakagawa N, Barron L, Gomez IG, Johnson BG, Roach AM, Kameoka S, Jack RM, Luper ML Jr, Gharib SA, Duffield JS, Pentraxin-2 suppresses c-Jun/AP-1 signaling to inhibit progressive fibrotic disease, JCI Insight, 査読有、2016、1巻、e87446  
DOI: 10.1172/jci.insight.87446

Gomez IG, Roach AM, Nakagawa N, Amatucci A, Johnson BG, Dunn K, Kelly MC, Karaca G, Zheng TS, Szak S, Peppiatt-Wildman CM, Burkly LC, Duffield JS, TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease, Journal of the American Society of Nephrology, 査読有、27巻、3639-3652  
DOI: 10.1681/ASN.2015111227

Gomez IG, Nakagawa N, Duffield JS, MicroRNAs as novel therapeutic targets to treat kidney injury and fibrosis. , American journal of physiology. Renal physiology, 査読有、2016、310巻、F931-F944  
DOI: 10.1152/ajprenal.00523.2015

Nakagawa N, Xin C, Roach AM, Naiman N, Shankland SJ, Ligresti G, Ren S, Szak S, Gomez IG, Duffield JS, Dicer1 activity in the stromal compartment regulates nephron differentiation and vascular patterning during mammalian kidney organogenesis, Kidney International, 査読有、2015、87巻、1125-1140  
DOI: 10.1038/ki.2014.406

[学会発表](計1件)

中川 直樹、Pathophysiology of cerebro-cardio-renal continuum in patients with chronic kidney disease、ISN Frontiers meeting 2018、2018年2

月23日, Tokyo.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 直樹 (NAKAGAWA, Naoki)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10451460

(2)連携研究者

長谷部 直幸 (HASEBE, Naoyuki)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30192272