

令和元年6月4日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09626

研究課題名(和文) 急性腎障害後の尿細管細胞を介した慢性腎臓病重症化機序の解明とその抑制療法の開発

研究課題名(英文) Pathogenesis and treatment of tubular epithelium-mediated AKI to CKD transition

研究代表者

岡田 浩一 (Okada, Hiromasa)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60233342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシスを抑制するp35と線維化を促進するCCN2を尿細管細胞で発現/欠損する遺伝子改変マウスを用いてAKIモデルを作成した。アポトーシス抑制により急性期障害は軽減したが、慢性期線維化は進展した。一方、アポトーシスを抑制しCCN2を欠損させると急性期障害は軽減したが、CCN2欠損のみの場合より線維化が増悪した。本来、アポトーシスによって排除されるべき障害尿細管細胞が存続すると、線維化促進因子を産生する可能性が示唆される。この障害尿細管細胞はG2/M期に休止して線維化促進因子を分泌する。我々は細胞周期レポーターマウスを用いてこの細胞群を単離した。今後、網羅的な遺伝子発現の検索を実施する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKDは全国で1300万人を超えると推定され、末期腎不全のハイリスク病態である。CKDから末期腎不全への経過は一律ではなく、持続的な腎機能障害の進展に加え、AKIの重積による階段状重症化により末期腎不全へ至る。よってCKD重症化の抑制には、AKIからCKDへの進展機序を明らかにする必要がある。本研究の成果から、AKIによる障害尿細管細胞がCKDへの進展を中継し、アポトーシス抑制によるAKI予防処置では障害尿細管細胞が存続し、CKDへの進展抑制が不十分であることが明らかとなった。今後の治療戦略としては、アポトーシス抑制以上のAKI予防策の開発に加え、CKD進展抑制療法を併用する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The acute kidney injury (AKI) model was constructed using genetically modified mice that express and lack p35 suppressing apoptosis and CCN2 inducing fibrosis, respectively, in the tubular epithelial cells. Apoptosis suppression alleviated AKI but not chronic fibrosis in the kidney. On the other hand, suppressing apoptosis and deleting CCN2 alleviated the AKI, but fibrosis progressed more than deleting CCN2 alone. The survival of impaired tubular cells to be eliminated by apoptosis was supposed to promote fibrosis by excreting profibrotic factors. The damaged tubular cells were found to arrest in the G2 / M phase and secrete profibrotic factors. We successfully isolated this cell population using cell cycle reporter mice. We will conduct comprehensive gene expression analysis by using this cell population in the future.

研究分野：腎臓病学

キーワード：急性腎障害 慢性腎臓病 腎線維化 アポトーシス カスパーゼ CCN2 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)から末期腎不全への経過は一律ではなく、原疾患(糖尿病、腎炎、高血圧・加齢など)の病態に起因する持続的な腎機能障害の進展に加え、増悪因子の負荷(脱水・虚血、感染、薬剤・造影剤など)による進展速度の加速、言い換えれば急性腎障害(AKI)イベントの重積による階段状重症化により末期腎不全へ至ると考えられる。よって透析予防戦略の構築上、二つの介入法、すなわちCKD進展抑制と重症化抑制が考案でき、本研究では後者のための基盤データの取得を目的とする。急性腎障害モデルの尿細管上皮細胞がTwist1やSnail1などの間葉系形質転換に関わる転写因子の誘導により細胞周期のG2/M期に休止し、線維化促進性の形質を獲得することが報告されており(Yang L, et al. Nat Med 2010, Lovisa, et al. Nat Med 2015)、我々も虚血再灌流(IRI)障害後、腎線維化に前駆してG2/M期に休止状態となる尿細管上皮細胞を予備実験において確認した。またこれらの細胞からのTGF- β 1やCCN2過剰分泌が線維化に関与する可能性、さらに細胞増殖刺激が線維化抑制効果を示すことなどが報告されている。ただしこれまでに報告された臨床研究において、AKI患者への増殖因子投与の有効性は認められていない。この障害腎におけるG2/M休止期の尿細管上皮細胞の病的形質を網羅的に検討した報告はなく、至適治療標的を同定する上でもこの情報は重要なものとする。そこで今回、我々は理研脳研究センター宮脇敦司博士の協力のもと、細胞周期に対応して異なる蛍光を発するレポーターマウス(Fucci2aR;Mort RL, et al. Cell Cycle 2014)を用いて、IRI後にin vivoでG2/M休止期にある尿細管上皮細胞をFACSを用いて単離し、遺伝子発現アレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行い、主に線維化促進因子発現などの病的形質を明らかにする。

CCN2はTGF- β 1により誘導され、その線維化促進作用を中継する分子であり、我々は腎線維化の進展に尿細管上皮細胞が産生するCCN2が重要な役割を果たすこと、特にその第4モジュールが機能中心であることを明らかにし、報告してきた。(J Am Soc Nephrol 2008, 米国腎臓学会 2014)ただしCCN2ノックアウトマウスが胸郭奇形による出生後致死となるため、その決定的な役割をin vivoで実証するには至っていない。(Ivkovic S, et al. Development 2003)そこで我々は、まず研究協力体制にあるUCLAのLyons教授より、conditional CCN2ノックアウトマウス(CCN2^{loxP})の供与を受け(論文未発表)、学内施設にて継代を開始している。そしてこの遺伝子改変マウスと尿細管上皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するGT.Creマウスを交配したF1マウス(GT.Cre;CCN2^{loxP})では、尿細管上皮細胞のみでCCN2発現が欠損することを免疫組織化学にて確認した。また我々はCKDモデルにおいて尿細管上皮細胞におけるカスパーゼ活性化(アポトーシスやインフラマゾームの誘導)の腎線維化への関与が原疾患ごとに異なることを、baculoウイルス由来の汎カスパーゼ阻害蛋白であるp35の発現がCreリコンビナーゼによって組織特異的に誘導されるp35マウスとGT.Creマウスを用いて実証し、報告している。(Kidney Int 2012, Clin Exp Nephrol 2015)これらのマウスを交配してp35もしくはCCN2^{loxP}(コントロール)、GT.Cre;p35、GT.Cre;CCN2^{loxP}およびGT.Cre;p35;CCN2^{loxP}マウスを作成し、尿細管上皮細胞におけるカスパーゼ活性とCCN2発現を抑制することで、IRIモデルの急性期および慢性期病変(線維化)への影響を評価し、各因子のAKIに続発する腎線維化への関与と治療標的としての適性を明らかにする。特にGT.Cre;p35マウスではカスパーゼ活性の抑制により尿細管上皮細胞の急性期障害の軽減が期待されるが、その後続発する線維化への影響については今回新たに検討する。

2. 研究の目的

本研究ではAKIイベントの重積によるCKDの階段状重症化の病態を明らかにすべく、IRIモデルを用いてその腎線維化メカニズムを検討する。まず1)予備実験においてIRIモデル線維化に関与することを確認したCCN2に着目して、conditional CCN2ノックアウトマウスを用いて尿細管上皮細胞特異的にCCN2発現を抑制し、障害尿細管上皮細胞が発現するCCN2の腎線維化促進作用を検討する。その際、p35発現誘導を用いた汎カスパーゼ阻害によるAKI抑制効果と組み合わせることで、AKIとCKDの相互作用についても検討する。また並行して、2)細胞周期レポーターマウスを用いて、IRI後の腎線維化に関与するとされるG2/M期に留まる障害尿細管上皮細胞を単離し、その病的形質変化(特に線維化促進因子発現)を網羅的に検索する。

以上の成果をAKIによるCKDの重症化メカニズムの解明とCCN2を主たる標的とした抑制療法開発のための基盤データとする。

3. 研究の方法

IRIモデルの急性期および慢性期病変(線維化)に関与すると推定されるカスパーゼ活性およびCCN2発現が尿細管上皮細胞特異的に抑制される遺伝子改変マウス(GT.Cre;p35、GT.Cre;CCN2^{loxP}およびGT.Cre;p35;CCN2^{loxP})に一側尿管結紮(UUO)モデルおよびIRIモデルを作成し、両因子の急性尿細管障害および線維化に対する作用を評価する。また並行して尿細管

上皮細胞が細胞周期に対応して異なる蛍光を発する GT.Cre;Fucci2aR^{Tg/+}マウスに IRI モデルを作成し、急性障害後に尿管上皮細胞の最大多数が G2/M 期に休止している時点の腎組織を用いて当該細胞を FACS を用いて可及的速やかに単離し、抽出 mRNA を用いた遺伝子発現アレイにより網羅的な遺伝子発現解析を行う。そこから AKI 後の CKD 重症化に關与する線維化促進性因子のリストを得る。

4. 研究成果

急性腎障害後の尿管細胞を介した慢性腎臓病重症化機序を明らかにし、その抑制方法を開発するために、以下の検討を行った。

(1) IRIモデル線維化に關与することを確認したCCN2に着目して、GT.Cre;p35 (p35により尿管細胞特異的にカスパーゼ活性が抑制)、GT.Cre;CCN2fx/- (尿管細胞特異的にCCN2発現が抑制)およびGT.Cre;p35;CCN2fx/- (尿管細胞特異的にカスパーゼ活性とCCN2発現が抑制)を作成し、IRIモデルを作成して検討した。p35の発現誘導により急性期(3日目)の尿管障害は野生型に比較し軽減されたが(図1)、慢性期(2週目)の線維化はコントロールと同等に進展した(図2B)。またCCN2の発現抑制により急性期の障害はコントロールと同等であったが(図1)、慢性期の線維化は有意に軽減された(図2C)。p35の発現誘導とCCN2の発現抑制を二重に惹起すると急性期障害は軽減したが(図1)、GT.Cre;CCN2fx/- (CCN2発現抑制のみ)と比較して慢性期線維化は増悪傾向を認めた(図2D)。AKIにおける障害尿管細胞のアポトーシスやカスパーゼを介した炎症応答(インフラマゾーム IL-1 など)を回避させるとCCN2抑制による線維化軽減効果が減弱することが明らかとなり、本来、アポトーシスによって排除されるべき障害尿管細胞が存続し、線維化促進因子を産生する可能性が示唆された。(論文投稿中)

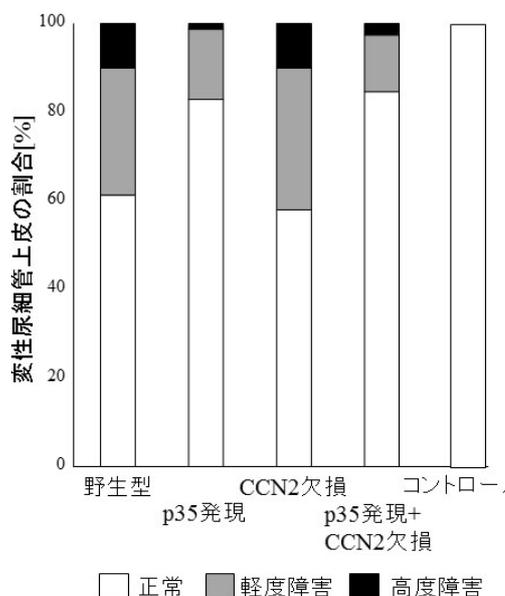


図1. IRIモデル3日目の尿管上皮の障害度

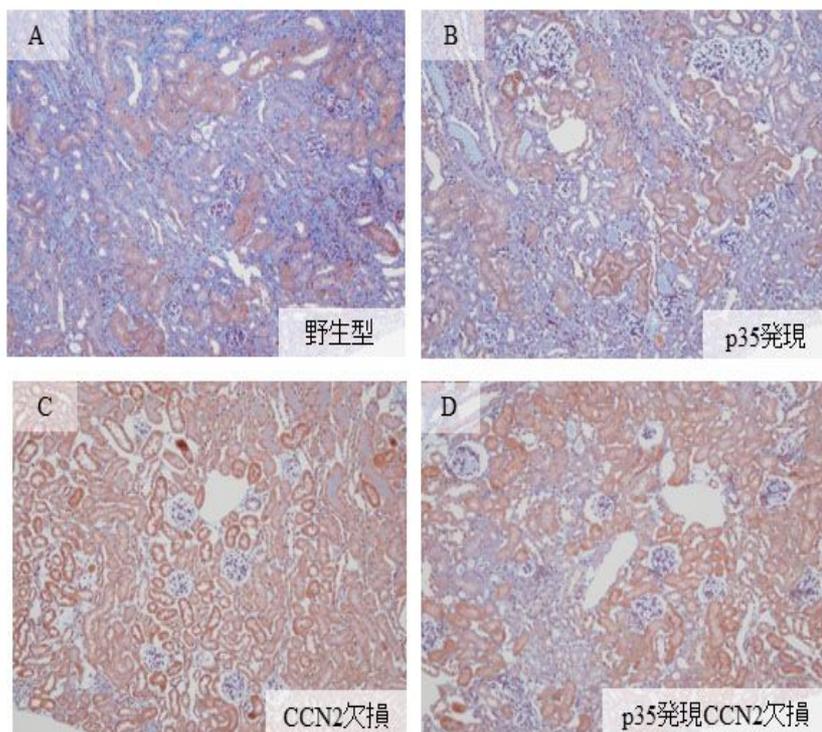


図 2 . IRIモデル2週目の腎間質線維化（マッソントリクローム染色）

(2)(1)の結果を受け、細胞周期レポーターマウスを用いて、IRI後の腎線維化に関与するとされるG2/M期に留まる障害尿細管細胞を単離し、その病的形質変化（特に線維化促進因子発現）を網羅的に検索するため、尿細管細胞が細胞周期に対応して異なる蛍光を発する

GT.Cre;Fucci2aRTg/+マウス（G1/S期：mCherryによる赤色蛍光、S/G2/M期：mVenusによる緑色蛍光）を作出した。UUOおよびIRIモデルを作成したところ、細胞周期の異なる尿細管細胞を検出することが可能であった。腎組織から細胞浮遊液を作成してFACSを実施したところ、G1/S期およびS/G2/M期の細胞を回収することに成功した。今後、後者の尿細管細胞群がS/G2/M期に休止し、線維化促進性形質を発現していることを検証するため、線維化促進性の形質転換に関わる転写因子Snail1およびTwist1の発現亢進を確認の後、cDNA microArrayにより網羅的な遺伝子発現の検索を実施する予定である。そこからAKI後のCKD重症化に関与する線維化促進性因子、即ちCKD重症化を抑制するための治療標的のリストを得ることが期待できる。

5 . 主な発表論文、学会発表等

〔学会発表〕(計4件)

- 1 . 草野武、井上勉、中元秀友、岡田浩一：尿細管上皮細胞のCaspase活性とCCN2発現はAKIからCKDへの移行を修飾する。第59回日本腎臓学会学術総会2016年
- 2 . 天野博明、井上勉、草野武、岡田浩一：Module IV-defected mutant CCN2 knock-in transgenic mice grow and develop normally, but fibrotic properties are attenuated in a number of kidney diseases. The annual meeting of the American Society of Nephrology (国際学会) 2017年
- 3 . 天野博明、井上勉、草野武、岡田浩一：CCN2 module-IV promotes renal fibrosis through activation of the FAK pathway in the tubular epithelium. The annual meeting of the American Society of Nephrology (国際学会) 2018年
- 4 . 天野博明、井上勉、草野武、岡田浩一：初代皮膚線維芽細胞におけるCCN2 module-IVの作用機序について。第61回日本腎臓学会学術総会 2018年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究協力者氏名：井上 勉

ローマ字氏名：(INOUE, Tsutomu)

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30406475

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮脇 敦史

ローマ字氏名：(MIYAWAKI, Atsushi)

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。