

令和 2 年 2 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11058

研究課題名(和文) マクロファージの内在性レトロウイルス応答調節と血管保護による多発性嚢胞腎進展抑制

研究課題名(英文) Amelioration of progression of polycystic kidney disease by stabilization of renal vessel disorders and exploration of endogenous retrovirus responses in macrophages

研究代表者

石橋 道男 (Ishibashi, Michio)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40107032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット多発性嚢胞腎モデルに新規イソベンゾフラン低分子化合物NK0070を15週間長期投与し、腎髄質循環に関する下降直動脈がパラフィンPAS染色にて狭窄・拡張病変が軽減され、髄質循環が維持され傍髄質系球体系蹄管腔の拡張から硝子化・硬化にいたる障害が軽減された。下降直動脈の機能温存に重要なpericytes(周細胞)マーカーであるNG2が全周性に発現していた。血管新生、血管保護にかかわるGalectin-3、転写因子HIF-1にくわえ、LTR(Long-terminal Repeat)をもつ内在性レトロウイルスGag遺伝子：RTL1, M1anaの関与につきある結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規イソベンゾフラン低分子化合物、NK0070により血管新生、血管保護にかかわるpericytes とGalectin-3、転写因子HIF-1にくわえLTR(Long-terminal Repeat)をもつ内在性レトロウイルスGag遺伝子：RTL1, M1anaの関与を検討した。臓器障害への有用な修復に向かわせる宿主の応答機構としてLTRを有す内在性レトロウイルスの存在と臨床上の意義付けを与え、新規化合物創薬などふくめ新しい修復再生治療の手がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using PCK rat model and the novel isobenzofuranone compound, NK0070, for 15 weeks administration, the morphological findings of PCK kidneys demonstrated the amelioration of narrowing and dilatation of descending vasa recta (DVR) between the outer medulla and the base of papilla, in which narrowing and dilatation of DVR were minimized and NG2 of pericyte marker was stained keeping around DVR. Furthermore, the lesions of glomerular capillary lumen of juxtamedullary glomeruli such as dilatation and hyalinosis was also ameliorated. M1ana of Gag genes of endogenous retrovirus, in addition to TET enzyme and HIF-1, of NK0070-treated PCK rat kidneys were studied.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：polycystic kidney pericyte 内在性レトロウイルス Gag遺伝子 HIF

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

1. 研究開始当初の背景

ヒト内在性レトロウイルス(Endogenous Retrovirus, ERV)の疾患における臨床的意義、役割はまだ定まっていない(GR Young, et al. Bioassay 2013; 35: 794)。LTR (long-terminal repeat)を有す ERV において、LTR は重要で *in silico* 研究により、多くの炎症関連蛋白との応答領域を有しており、ERV-K 発現における LTR の重要さが示唆される(M Maighera, Douville RN.Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcriptic factors? Retrovirology 2013;10:16)。たとえば、活動性の SLE 患者の CD3+CD4 陽性 T リンパ球の HERV-E の LTR のメチル化レベルは優位に低いとする報告がある (Nakkuntod J, Human Genetics 2013;58: 241)。内在性レトロウイルスについては”junk” genes とみなされていたが、近年の研究で多発性硬化症例の脳血管やマクロファージに ERV の局在がみとめられ病態に何らかの関与が示唆されている (Perron H, Mult Scler 2012; 18: 1721)。われわれの予備研究として、*in vitro*でのラット肺胞マクロファージと腎尿細管細胞株 NRK52E をサイトカイン刺激後に LTR-ERV、Gag 遺伝子、Syncytin-2 遺伝子の mRNA 発現を比べるとマクロファージにおける反応性は顕著であり、マクロファージの LTR-ERV 応答調節と血管保護作用による腎修復の関連が注目され遺伝性疾患である多発性嚢胞腎ラットモデルを用いて研究を開始した。

2. 研究の目的

LTR をもつ内在性レトロウイルス、Endogenous Retrovirus の疾患における臨床的意義、役割はまだ定まっていない。本研究は、第一に、遺伝的な異常をもつ PCK 多発性嚢胞腎の進展抑制における血管保護の重要性と、第二に、血管新生、血管保護にかかわる遺伝子:Galectin-3 と転写因子 HIF-1 にくわえ LTR-ERV の Gag 遺伝子:RTL1, Mlana の関与をあきらかにすることにある。短期の新規イソベンゾフラノン化合物投与と実験で得られた結果を長期投与と実験で確認する。マクロファージ細胞と PCK 腎組織を用い DNA 脱メチル化に関わる酵素添加酵素 (TET, Ten-eleven translocation) の発現動態を測定し、LTR-ERV 遺伝子の mRNA の応答と多発性嚢胞腎の進展抑制における血管保護と LTR-ERV の腎修復再生の関連をあきらかにする。

3. 研究の方法

第一に、PCK ラットへのイソベンゾフラノン誘導体 NK0070 : 30mg/kg/day、皮下注を生後 5 週から 10 週までの 5 週間の短期投与と実験 (5 週令 10 週令まで投与 n=3) で得られた集合管血管内皮細胞の保護効果をさらに、生後 20 週令まで 15 週間の長期投与と実験 (5 週令 20 週令まで投与 n=3) を行い、進展進行がどの程度を軽減できたかを病理形態学的に評価する。第二に、ラット肺胞マクロファージ培養細胞株、NR8383 を用いガンマインターフェロン刺激のもとで、腎血管保護に関わる Galectin-3、HIF-1 そして胎盤などの血管内皮細胞の維持や血管新生に関わる LTR-ERV の Gag 遺伝子;RTL1, Mlana の mRNA 発現、DNA メチル化レベルの応答と同時にその調節に関わる酵素添加酵素 (TETenzymes)の mRNA 発現 を測定することで動態を検討する。そして、PCK ラット腎においては、当初の予定していた DNA メチル化レベルの応答の測定が、予算の不足のため測定が困難になり、mRNA の発現を測定した。第三には、PCK ラット摘出腎を用いてパラフィン標本と凍結切片を用いて免疫染色を実施した。Pericyte マーカーである NG2 抗体(ABIN758501, Antibodies)を用いて血管内皮細胞は CD31 の免疫染色を行った。

4. 研究成果

ラット多発性嚢胞腎モデルに新規イソベンゾフラン低分子化合物 NK0070 を 15 週間長期投与の 20 週令 PCK ラットの腎病変について傍髄質系球体病変と腎髄質循環に關与する下降直動脈 (Descending Vasa Recta, DVR) を HE、PAS パラフィン染色にて觀察評価した。系球体病変として傍髄質系球体係蹄管腔の拡張から硝子化・硬化にいたる所見を対照群にみとめる。NK0070 投与例では (同一の親からの例を対照群と治療群にわけ個体差を最小にする組み合わせで実施した)、腎 outer medulla から乳頭起始部間に DVR をみとめるが、PCK では嚢胞形成過程にて圧排を受けもつとも障害をきたす部位であり DVR の形態的な変化を光顕レベルで評価した。NK0070 投与例では狭窄ならびに拡張が軽減される傾向であった。DVR の狭窄により輸出動脈の循環障害をきたし、系球体係蹄のうち輸出動脈に流入する系球体係蹄管腔の拡張、硝子化像がみられる。一方、輸入動脈血管極の拡張と血管極から系球体係蹄管腔の攣縮、閉塞硬化像もみられた。NK0070 投与例では、DVR の狭窄、拡張が軽減され、系球体係蹄管腔拡張状態が軽減維持され、結果として系球体病変が軽減したと解釈できる。下降直動脈の機能温存に重要な pericytes (周細胞) マーカーである NG2 の染色性も全周性に発現し血管内皮細胞の CD31 マーカーも良く保持された。

LTR-ERV - Gag 遺伝子 Mlana が PCK ラットの腎障害過程にどのような関与があったかについては、PCK ラット腎組織における Mlana mRNA 発現を短期投与群 10 週令と長期投与群 20 週令で比較した。NK0070 短期投与群 10 週令では Mlana mRNA 発現は対照群に比べて増加していたが NK0070 長期投与群 20 週令においては抑制されていた。NK0070 投与例の HIF-1 遺伝子 mRNA は短期投与群 と長期投与群いずれも対照群にくらべ抑制されていた。TET1 と TET3 は、胎児発育時における imprinted genes の発現調節に関わることが示唆されているが (J Kang et al, PNAS USA2015; 112:4236) NK0070 投与 20 週令の PCK ラット腎組織の TET1 と TET3 は抑制されており、LTR-ERV - Gag 遺伝子 Mlana の発現抑制との関連があるかもしれない。PCK ラットの短期 10 週令の腎病変では DVR 障害がつよく、LTR-ERV - Gag 遺伝子 Mlana が血管内皮障害後の修復過程で関与し、NK0070 長期投与 20 週令では投与中における HIF-1 抑制効果、pericyte NG2 の維持、TET 遺伝子制御などの関りにより成熟血管内皮 CD31 の維持をふくめた DVR の血管保護がもたらされた可能性を考察した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1 . 熊本海生航、釘田雅則、吉村文、千原良友、藤本清秀、小島直人、東原英二、長尾静子、石橋道男。

藤田医科大学疾患モデル教育研究施設、奈良県立医科大学医学部泌尿器科、京都薬科大学薬品製造学分野、杏林大学医学部遺伝性腎疾患研究室

NG2 活性化による腎髄質ペリサイト機能温存とラット PCK 多発性嚢胞腎モデルにみられる系球体病変の軽減、

第62回日本腎臓学会学術総会、2019年6月21日、名古屋

2. 石橋道男、釘田雅則、熊本海生航、吉村 文、藤本清秀、東原英二、長尾静子、
奈良県立医科大学泌尿器科、藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究施設、杏林大学医
学部遺伝性腎疾患研究室

多発性嚢胞腎ラットへの低分子化合物NK0070投与によるNG2 pericyte マー
カーの温存と腎病変

第48回日本腎臓学会東部学術大会 2018年10月20日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長尾静子

ローマ字氏名：Nagao Shizuko

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：疾患モデル教育研究施設

職名：教授

研究者番号(8桁)：20183527

(2)研究分担者

研究分担者氏名：東原英二

ローマ字氏名：Higashihara Eiji

所属研究機関名：杏林大学医学部

部局名：遺伝性腎疾患研究室

職名：教授

研究者番号(8桁)：00092312

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。