

令和元年6月20日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15047

研究課題名(和文) システムバイオロジーを用いた腎肝クロストーク発症経路の解明

研究課題名(英文) A study on the pathway causing renohepatic crosstalk using systems biology

研究代表者

池田 正浩 (Ikeda, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60281218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多臓器不全の中でも、急性腎障害と肝障害が合併した場合(腎肝クロストーク)の予後は非常に悪く、その対策は医学・獣医学両領域における焦眉の課題である。本研究では、アレイやオミクステクノロジーにpathway抽出などを組み合わせることによってモデル動物を解析し、腎肝クロストークの特異的な治療ターゲットを提案することを目的として実施した。その結果、CSF2とadrenomedullin (AM)の2つの治療ターゲット候補分子を見出すことに成功した。今後この成果などに基づいて、腎肝クロストークの発症メカニズムの理解が進み、その対策が向上して行くことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎不全と肝不全とが合併した場合(腎肝クロストーク)の致死率は高く、その対策は、医学・獣医学両領域において大きな問題となっている。本研究では、モデル動物を用いて検討した結果、この腎肝クロストークの特異的な治療ターゲット候補分子を見出すことに成功した。今後今回の成果などに基づいて、腎肝クロストーク病態の理解が進み、その治療法などが向上して行くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Multi-organ failure is a progressive condition, involving the combined failure of the kidney, liver, and lung, and an effect of acute kidney injury on liver dysfunction (renohepatic crosstalk) has received considerable attention due to the increased risk of poor outcome. In order to propose a specific therapeutic target, in this study we employed experimental models of renohepatic crosstalk and analyzed liver genes and proteins with array and omics technologies, combined with pathway analysis. As a result, we succeeded in finding two novel therapeutic target candidates, CSF2 and adrenomedullin (AM). We anticipate that our present findings will lead to the progress of the understanding of the mechanisms underlying the renohepatic crosstalk, and the development of a pharmacological intervention against this disease condition.

研究分野：獣医腎薬理学, 獣医腎臓病学

キーワード：腎肝クロストーク 多臓器不全 システムバイオロジー 腎虚血再灌流障害

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

## 1 . 研究開始当初の背景

複数の臓器が短時間のうちに障害される疾患を多臓器不全という . 急性腎不全は多臓器不全の一部として発症することが多く , 単独発症での死亡率は 12% , 他の臓器不全が一つ合併すると 38% , 2 つ以上の臓器不全が合併すると実に 70% 以上に上ることが報告されている . そしてこの死因に関するオッズ比は , 肝不全で 6.3 と著しく高かった ( 文献 ) . 獣医領域に目を転じると , 多臓器不全を発症した場合の死亡率が 70% , そしてこの死亡に関する肝不全のオッズ比も 1.9 と高い値が報告されている ( 文献 ) . したがって , 多臓器不全 , 中でも急性腎不全と肝不全とが合併した場合の予後は非常に悪く , その対策は , 医学・獣医学両領域における焦眉の課題と言える . 最近では , 急性腎不全後に肝不全が併発する多臓器不全を腎肝クロストークと呼ぶことが提唱されている ( 文献 ) .

これまでに実験モデルにおいて , インターロイキン 6 ( IL-6 ) や IL-17A などいくつかのサイトカインが腎肝クロストークにおける肝病態形成に關与する可能性が報告されている ( 文献 ) . しかし過去のものはいずれも個別の分子に着目した研究に留まっており , 発症経路を浮き彫りにできていない . そのために , バイオマーカーや特異的な治療薬の開発は進んでいない .

近年 , アレイやオミクステクノロジーのデータに pathway 解析の手法などを組み合わせること ( システムバイオロジー ) によって , 様々な疾患の病態発症機序の理解が飛躍的に進むことが期待されている ( 文献 ) . そこでこの研究技術を応用すれば , 医学・獣医学両領域で問題となっている腎肝クロストークに対して , その発症経路を捉えて , 特異的な治療ターゲットを提案できるのではないかと考えて , 本研究を着想した .

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は , 我々が確立してきたアレイやオミクステクノロジーに , pathway 解析の手法などを組み合わせてモデル動物を解析することにより , 腎肝クロストークにおける肝障害形成経路を明確にして , それに基づく特異的な治療薬ターゲットを提案することである .

## 3 . 研究の方法

腎肝クロストークのモデルマウスを作製 ( 腎虚血再灌流 ( IR ) あるいは腎摘出 ( BNx ) による肝障害動物 ) して時間経過とともに肝を採材した . 採材した肝から遺伝子もしくはタンパク質を抽出し , 抽出した遺伝子についてはアレイ解析を , タンパク質についてはプロテオーム解析を実施した . その後 , 得られた情報に基づいて pathway 解析を行い , 発症経路候補を抽出した . 抽出後 , 2 つのモデル ( IR および BNx による肝障害動物 ) における重複性などに配慮しつつ , さらに個別分子の過去の報告などを参照しながら , 経路を構成している分子の中から , 治療ターゲット候補の選別を行った . 選別後には , 薬理的 , または分子生物学的手法を用いて , *in vivo* および *in vitro* の実験により , 治療薬シーズの妥当性を判定した .

## 4 . 研究成果

すべての検討において , あらかじめ血漿中のクレアチニン濃度 , 尿素窒素濃度 , -GTP , AST , ALT などの値を測定して , 腎肝クロストークが生じていることを確認してから , 以下の実験を行った .

### ( 1 ) 免疫系のアレイ解析

腎障害および肝障害において , 免疫細胞が障害の増悪あるいは軽減に關与することが報告されている ( 文献 ) . そこで , 免疫系に着目して検討を行った . IR および BNx による肝障害動物から , それぞれの処置 24 時間後に肝を採材し , RNA を抽出した . その後 , 抽出した RNA

を用いて PCR アレイを行った。PCR 解析の結果から、偽手術群と比較して発現量が変化していた遺伝子を選別して経路分析を行った。その結果、変化している可能性が高い上位 5 位の canonical 経路などに基づいて、図 1 に示される分子経路を抽出した。遺伝子がアップレギュレートしていたものを赤、ダウンレギュレートしていたものを緑でそれぞれ示している。また、変化が大きいものほど濃い色になっている。IR および BNx 両モデルの共通経路としては、“Communication between Innate and Adaptive Immune Cells”、“Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells”、“T Helper Cell Differentiation”、“Role of Cytokine in Mediating Communication between Immune Cells”が選択された。また両モデルにおいて、コロニー刺激因子 2 (CSF2) および IL-6 が共通して増加していた。

以上のことから、腎肝クロストークを防ぐためには CSF2 や IL-6, T 細胞をターゲットにした治療が有効である可能性が考えられた。

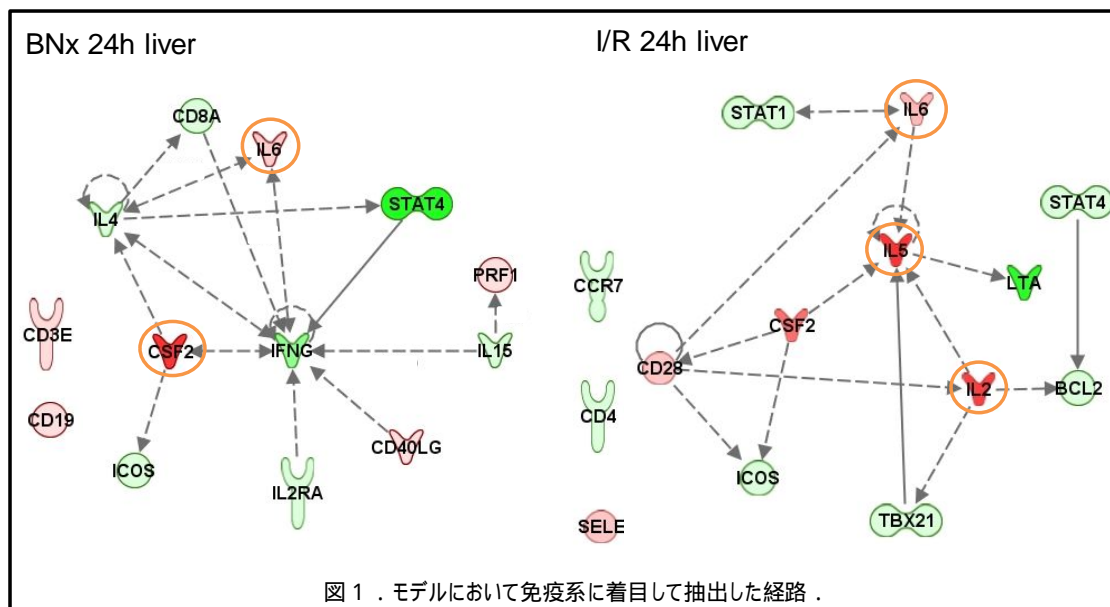


図 1 . モデルにおいて免疫系に着目して抽出した経路 .

### ( 2 ) プロテオーム解析

肝組織を遠心分離によって sup 分画と pellet 分画に分け、それぞれの分画で発現量が変化しているタンパク質を 2D-DIGE + MALDI-TOF-MS 法を用いて同定した。BNx 6 時間の sup 分画では 15 種類、pellet 分画では 5 種類のタンパク質をそれぞれ同定した。BNx 24 時間においては、sup 分画と pellet 分画でそれぞれ 11 種類のタンパク質を同定した。I/R 6 時間では、sup 分画で 10 種類、pellet 分画で 12 種類のタンパク質をそれぞれ同定した。I/R 24 時間では sup 分画で 10 種類、pellet 分画で 17 種類のタンパク質を同定した。しかしながら、重複して有意に変化するタンパク質については、明確な結果を得ることができなかった。

### ( 3 ) 酸素ホメオスタシスに関する因子の検討

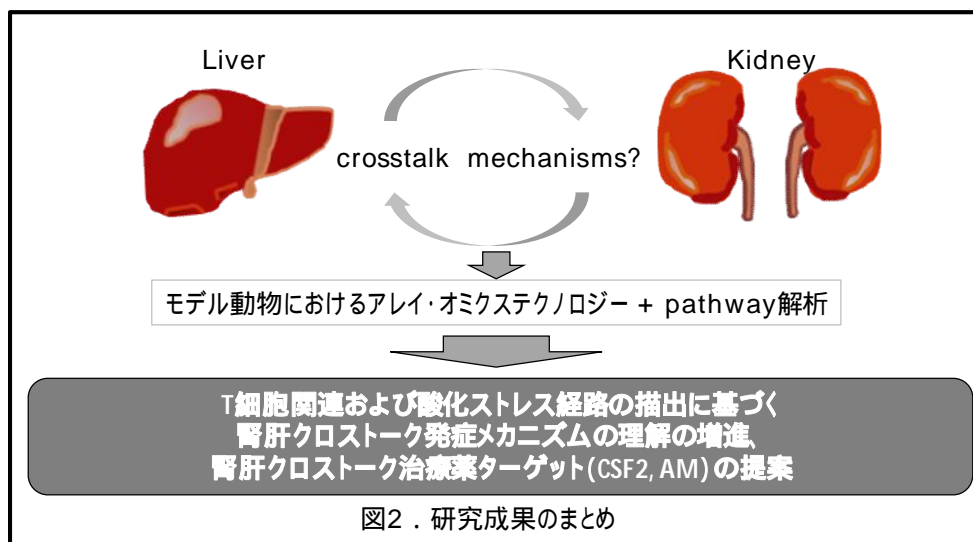
腎障害および肝障害において、低酸素や酸化ストレスなどの酸素ホメオスタシスの障害が関与することが多数報告されている(文献 )。そこで、酸素ホメオスタシス障害に着目して検討を行った。IR および BNx 処置 6 および 24 時間後に肝を採材し、RNA を抽出した。その後、抽出した RNA を用いて PCR アレイおよびリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、それぞれの偽手術群と比較して処置 6 および 24 時間後に両モデルに共通して増加した遺伝子として、アドレノメジュリン( AM )およびインスリン様増殖因子結合タンパク質 1( Igfbp1 )

遺伝子が同定された。また、それぞれにおいて変化した遺伝子を用いて経路分析を行ったところ、共通経路として、”quantity of reactive oxygen species”および、”generation of reactive oxygen species”の2つの経路が抽出された。そして、その経路上に AM がマップされた。

次に、共通経路上にマップされた AM に着目して、治療薬シーズとしての妥当性について調べた。AM はそのホモノックアウトマウスが胎生致死であることが知られている。そこで、ヘテロノックアウトマウスに腎肝クロストークモデルを作製して検討した。その結果、ノックアウトの、障害への明らかな影響は見られなかった。そこで、AM を腎肝クロストークモデルに投与する実験に切り替えて実施したところ、IR あるいは BN<sub>x</sub> による肝障害を AM は有意に抑制した。また、両モデルから肝を採材して遺伝子を抽出後、経路について調べたところ、先に述べた経路が抑えられる結果が得られた。さらに培養肝細胞を用いて、尿毒症物質による細胞障害を AM が抑制できるかどうかについて検討した。その結果、*in vitro* の系でも抑制効果を確認した。

以上のことから、腎肝クロストークを防ぐ上で、AM が有効である可能性が考えられた。

今回、腎肝クロストークの治療薬ターゲットとして新規性の観点から2種類、すなわち CSF2 と AM を見出すことに成功した。抽出した治療薬ターゲットについて、過去の報告、抽出した経路上のマッピングなどから AM を選択して、薬理効果を調べる実験を行ったところ、*in vivo* および *in vitro* の両方の実験系で、腎肝クロストーク障害を抑制する可能性を見出した。以上から、AM が治療薬シーズとして妥当であることなどが考えられた(図2)。



#### <引用文献>

Schwilk B, Wiedeck H, Stein B, Reinelt H, Treiber H, Bothner U: Epidemiology of acute renal failure and outcome of haemodiafiltration in intensive care. Intensive Care Med 23: 1204-1211, 1997.

Kenney EM, Rozanski EA, Rush JE, deLaforcade-Buress AM, Berg JR, Silverstein DC, Montealegre CD, Jutkowitz LA, Adamantos S, Ovbey DH, Boysen SR, Shaw SP : Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007). J Am Vet Med Assoc 236: 83-87, 2010.

Lane K, Dixon JJ, MacPhee IA, Philips BJ : Renohepatic crosstalk: does acute kidney injury cause liver dysfunction? *Nephrol Dial Transplant* 28: 1634-1647, 2013.

Park SW, Chen SW, Kim M, Brown KM, Kolls JK, D'Agati VD, Lee HT: Cytokines induce small intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy. *Lab Invest* 91: 63-84, 2011.

Chuang HY, Lee E, Liu YT, Lee D, Ideker T. Network-based classification of breast cancer metastasis. *Mol Syst Biol* 3: 140, 2007.

Palm F, Nangaku M, Fasching A, Tanaka T, Nordquist L, Hansell P, Kawakami T, Nishijima F, Fujita: Uremia induces abnormal oxygen consumption in tubules and aggravates chronic hypoxia of the kidney via oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F380-F386, 2010.

Khan HA, Ahmad MZ, Khan JA, Arshad MI. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 16: 245-256, 2017.

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Mikoda N, Sonoda H, Oshikawa-S, Hoshino Y, Matsuzaki T, **Ikeda M**. A bell-shaped pattern of urinary aquaporin-2-bearing extracellular vesicle release in an experimental model of nephronophthisis. *Physiol Rep* 7: e14092, 2019. 査読有

Hoshino Y, Sonoda H, Nishimura R, Mori K, Ishibashi K, **Ikeda M**. Involvement of the NADPH oxidase 2 pathway in renal oxidative stress in Aqp11 <sup>-/-</sup> mice. *Biochem Biophys Rep* 17: 169-176, 2019. 査読有

Asvapromtada S, Sonoda H, Kinouchi M, Oshikawa S, Takahashi S, Hoshino Y, Sinlapadeelerdkul T, Yokota-Ikeda N, Matsuzaki T, **Ikeda M**. Characterization of urinary exosomal release of aquaporin-1 and -2 after renal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F584-F601, 2018. 査読有

### 〔学会発表〕(計3件)

Kaneko, Y., Torisu, S., Sonoda, H., Fuke, N., **Ikeda, M.**, Yamaguchi, R., Mizutani, S., Ong, B.H.E., Yamamoto, S., Naganobu, K.: Hepatopulmonary syndrome secondary to portal vein thrombosis with chronic hepatitis in a dog. 43rd World Small Animal Veterinary Association Congress and 9th FASAVA Congress, Sep. 27, 2019, Singapore.

古賀萌子, 加藤綾華, 園田紘子, 押川さやか, **池田正浩**: 腎小胞体 (ER) ストレスはアミノ酸尿症を引き起こす. 第160回日本獣医学会, 2017年9月13日, 鹿児島.

園田紘子, 仲西友紀, 押川さやか, 樺山智之, **池田正浩**: 尿中細胞外小胞タンパク質測定による腎移植後の腎aquaporin発現量の推定 第9回トランスポーター研究会九州部会, 2016年10月1日, 宮崎.

### 〔図書〕(計1件)

園田紘子・**池田正浩**, 尿中細胞外小胞 (エクソソーム) と腎疾患. *生体の科学* 67: 406-407, 2016.

## 6 . 研究組織

### ( 1 ) 研究分担者

該当なし .

### ( 2 ) 研究協力者

研究協力者氏名 : 園田 紘子

ローマ字氏名 : ( SONODA, Hiroko )

研究協力者氏名 : 押川 さやか

ローマ字氏名 : ( OSHIKAWA, Sayaka )

他

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。