

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09686

研究課題名(和文) ヒト腎疾患の発症・進展におけるアクチビンの役割

研究課題名(英文) The role of activin in the development and progression of human kidney diseases

研究代表者

前嶋 明人 (Maeshima, Akito)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70431707

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)：TGF-betaファミリーに属する分化誘導因子アクチビンは、各種腎疾患モデル動物の解析結果から、腎臓の形態形成や腎障害後の尿細管再生、腎線維化に関与することが報告されている。しかし、ヒトでの解析はこれまで行われていない。

本研究の目的は、ヒト腎疾患の発症・進展におけるアクチビンの関与および尿中アクチビンの存在意義を明らかにすることである。本研究で得られた知見により、アクチビンおよびその情報伝達経路を標的とした新規腎疾患治療薬の開発や新規尿中バイオマーカーの探索がさらに発展することを目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトサンプル(腎生検標本、尿)を利用して、過去の基礎研究データをもとに立てた「アクチビンは腎障害の悪化促進因子である」という仮説を検証するものである。本研究の結果、各種ヒト腎疾患におけるアクチビンの重要性が明らかになり、アクチビンやその情報伝達経路を標的とした新たな腎疾患治療薬の開発への第一歩になると思われる。一部の腎疾患患者で尿中アクチビンが検出されており、腎疾患の尿中バイオマーカー開発に大きく貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Activin A regulates kidney development as well as tubular regeneration after injury. However, it remains unknown whether activin A is involved in the development and progression of kidney diseases in human. In the present study, we demonstrated that blockade of activin A action is a promising therapeutic target for the treatment of various kidney diseases and identified activin A as a novel urinary biomarker reflecting renal inflammation and tubular damages.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：アクチビン 腎疾患 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在わが国の透析患者数は約 30 万人に達し、その予備群である慢性腎臓病患者は約 1600 万人(成人の 8 人に 1 人)と推定されている。慢性腎臓病は独立した心血管系イベントのリスク因子であることが判明し、新たな国民病として認識されつつあるが、現時点で病態の進行を抑制する有効な治療法はない。腎疾患モデル動物を用いて、各種腎疾患における様々な増殖因子、サイトカイン、ケモカインの関与が数多く報告されているが、これらの基礎研究で得られた知見は未だ臨床応用に結びついていないのが現状である。

申請者はこれまで「腎臓におけるアクチビンの役割」について解析を行ってきた。アクチビンは、様々な組織において多彩な生理作用を発揮することが知られているが、腎臓での作用は不明であった。

まず、腎臓の形態形成に焦点を当てて研究をスタートした。変異アクチビン受容体を過剰発現する遺伝子改変マウス(Biochem Biophys Res Commun 268: 445-449, 2000)、In Vitro 腎尿細管形成モデル(Kidney Int 58:1511-1522, 2000)、胎生腎を用いた器官培養系(J Am Soc Nephrol 14: 1523-34, 2003)、Wolffian duct 培養システム(J Am Soc Nephrol 18:3147-55, 2007、Dev Biol 295: 473-85, 2006)など様々なシステムを駆使して解析を行い、アクチビンがネフロン形成を抑制的に制御する因子であることを明らかにした(Cytokine Growth Factor Rev 12: 289-298, 2001)。

次に腎疾患の病態におけるアクチビンの役割について検討を進めた。アクチビンにはフォリスタチンと呼ばれる内因性アンタゴニストが存在する。興味深いことに、フォリスタチンは腎尿細管に豊富に存在しているが、腎疾患の病態におけるアクチビン・フォリスタチン系の役割は不明であった。

そこで腎障害モデル動物を用いてアクチビンの発現を検討した結果、正常腎には発現していないが、急性腎障害モデル(J Am Soc Nephrol 12: 1685-1695, 2001、J Am Soc Nephrol 13: 2850-2859, 2002)や腎線維化モデル(J Am Soc Nephrol 15: 91-101, 2004、Biomed Res Int 2014: 376191)の腎臓では、アクチビンの発現が著明に亢進していることが判明した。上記モデルにフォリスタチンを投与してアクチビン作用を中和すると、いずれのモデル動物でも腎障害(尿細管障害、線維化、炎症など)の改善が認められた。アクチビンは培養尿細管細胞の増殖を強力に抑制すること(Kidney Int 62:446-454, 2002)も明らかになり、以上の結果から、アクチビンは腎疾患治療を考慮する上で有力な標的分子であると予想された。

2. 研究の目的

TGF-beta ファミリーに属する分化誘導因子アクチビンは、各種腎疾患モデル動物の解析結果から、腎臓の形態形成や腎障害後の尿細管再生、腎線維化に関与することが報告されている。しかし、ヒトでの解析はこれまで行われていない。

本研究では上記の動物モデルを用いた基礎研究をさらに発展させて、アクチビンがヒト腎疾患の発症・進展に深く関与するかを検証する。また、ヒト腎疾患患者の尿中アクチビンの存在意義を明らかにし、腎疾患の活動性を反映する新規尿中バイオマーカーとして有用であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

「ヒト腎疾患の発症・進展におけるアクチビンの関与」を明らかにするため、ヒト腎生検標本、正常腎組織(摘出腎の残余検体)を用いて、様々なヒト腎疾患におけるアクチビン・フォリスタチン系の関与について解析する。さらに、各種腎疾患患者の尿サンプルを用いて、尿中アクチビン濃度を測定し、腎障害の活動性や予後を鋭敏に反映する新規バイオマーカーとしての可能性を探る。

特にアクチビンの関与が高い腎疾患については、その病態を再現する疾患モデルマウスを作成し、フォリスタチンや可溶性アクチビン受容体による腎障害改善の有無を評価し、アクチビンを標的とした腎疾患の治療戦略の有効性を明らかにする。

4. 研究成果

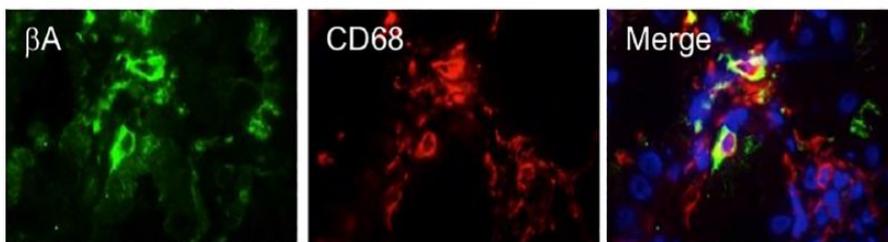
(1)ヒト腎疾患の発症・進展におけるアクチビンの関与

事前に同意の得られた患者の腎生検標本を用いて、各種腎疾患におけるアクチビン、アクチビン受容体、フォリスタチンの発現および局在を免疫染色または In situ hybridization により評価した。

糸球体足細胞(Synaptopodin、WT1)、メサングウム細胞(Vimentin)、近位尿細管(Aquaporin1、LTL)、遠位尿細管(Tamm-Horsfall Protein)、集合管(Aquaporin 2、DBA)、血管内皮(CD31)、血管平滑筋(alpha-SMA)などの各種ネフロンマーカーとアクチビンの 2 重染色を行った結果、ループ腎炎および ANCA 関連腎炎症例の腎生検標本にて近位尿細管にアクチビンの発現を認めた。In situ hybridization でも同様に尿細管にアクチビン mRNA の発現を認めた。さらに、B リンパ球(CD19)、T リンパ球(CD3)、好中球(Gr-1)、マクロファージ(CD68)などの炎症細胞マーカーとの 2 重染色の結果、アクチビンは浸潤マクロファージから産生されていることが判明した。一方、対照コントロールとして用いた正常腎組織(腎腫瘍手術にて摘出された腎臓の残余検体)ではアクチビン蛋白および mRNA の発現を認めなかった。

以上のことから、腎疾患、特に炎症性腎疾患において、アクチビンは近位尿細管および浸潤マクロファージで産生されることが明らかになった。

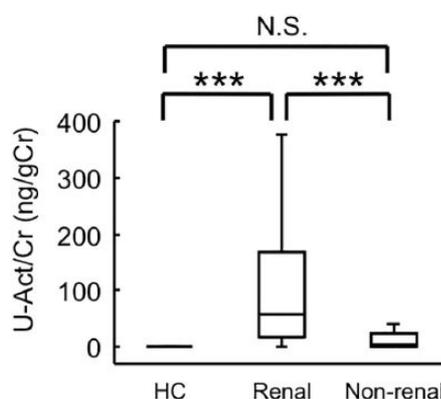
CD68 陽性マクロファージによるアクチビン産生 (ANCA 関連腎炎症例の腎生検標本) (下写真)



(2) ヒト腎疾患における尿中アクチビン測定の意味

これまでの検討から、健常マウスやラットでは尿中アクチビンは測定感度未満であるのに対し、いくつかの腎疾患モデル動物では、尿中アクチビンが検出されることを確認している。そこで、ヒト腎疾患における尿中アクチビン測定の有用性について検証した。

事前に同意の得られた腎疾患患者の尿中アクチビン濃度を ELISA 法により測定し、検尿所見(蛋白尿、血尿、尿沈渣、尿中 NAG、尿中 beta2-microglobulin、尿中 alpha1-microglobulin、尿中 L-FABP など)、腎組織障害の程度、腎機能(血清 Cr、eGFR、クレアチニン・クリアランス)との相関の有無について検討した。腎組織障害の程度は、糸球体障害(半月体や硬化糸球体の割合)、線維化(EVG 陽性面積、alpha-SMA 陽性面積)、炎症細胞浸潤(CD3 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞、Gr-1 陽性好中球、CD68 陽性マクロファージ)を定量化して評価した。その結果、健常人では尿中アクチビンが検出感度以下であるのに対し、急性腎障害、ループス腎炎、ANCA 関連腎炎症例(参考文献1)、多発性骨髄腫(参考文献2)では尿中アクチビンが有意に上昇していた。さらに尿中アクチビン濃度は半月体の割合や炎症細胞数と相関していた。



ANCA 関連腎炎における尿中アクチビン濃度 (右グラフ)

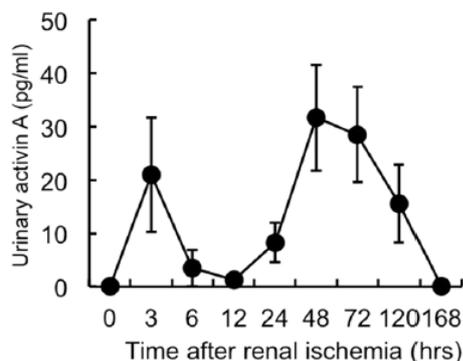
(3) 新規急性腎障害 (Acute kidney injury: AKI) バイオマーカーの可能性

上記の結果、尿中アクチビンは健常人では検出されないが急性腎障害で著明に増加することが判明した。そこで、尿中アクチビンが急性腎障害マーカーとして有用であるかを検討した。

急性腎障害モデルとして虚血・再灌流障害マウスを作成し、その発症・進展過程でアクチビンの発現増加の有無を real-time PCR、免疫染色、In situ hybridization、ウェスタンブロットを用いて検証した。その結果、コントロールとして用いた Sham 手術群と比較し、虚血腎ではアクチビンの発現が有意に増加することが明らかになった。各種ネフロンマーカーと 2 重染色し、急性腎障害におけるアクチビン産生細胞を同定したところ、尿細管細胞にアクチビン蛋白および mRNA の発現を認めた。

また、虚血・再灌流障害マウスの尿を経時的にサンプリングし、ELISA により尿中アクチビン濃度を測定したところ、ヒトのデータに一致して、マウス急性腎障害モデルにおいても尿中アクチビンが有意に増加することが分かった(参考文献3)。尿中アクチビンは腎機能や組織障害の程度と相関していたが、血清アクチビン濃度とは相関していなかった。尿中 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) および尿中 kidney injury molecule-1 (KIM-1) といった既存の急性腎障害バイオマーカー濃度との相関も認めた。

以上の解析により、尿中アクチビンが急性腎障害の重症度や予後を予測する新たなバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。



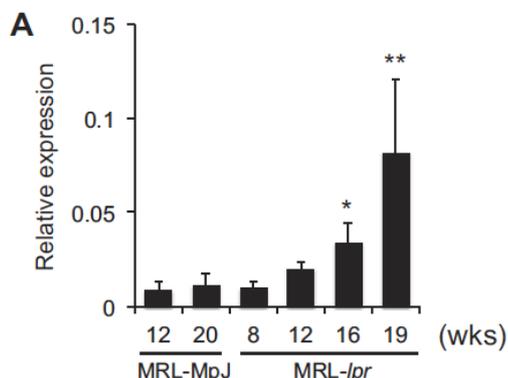
マウス急性腎障害モデルにおける尿中アクチビン濃度 (右グラフ)

(4) アクチビンを標的とした腎疾患治療の有効性

ヒト腎生検標本を用いたアクチビン染色の結果、いくつかの腎炎においてアクチビンの発現増加が確認され、特にループス腎炎でその発現が著明であった。

そこで自然発症ループス腎炎モデルマウス (MRL-lpr マウス) を用いて解析を進めた。このマウスは 12

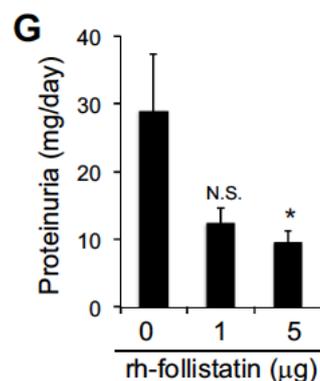
週齢より蛋白尿を認め、20 週齢までに腎不全を発症する。このマウスの腎炎発症・進展過程におけるアクチビンの発現を real-time PCR、免疫染色、In situ hybridization、ウェスタンブロットを用いて検証した。その結果、コントロールとして用いた MRL-Mpj マウス(同系統の腎症を発症しないマウス)ではアクチビンの発現は変化しないのに対し、MRL-lpr マウスでは有意にアクチビンの発現増加を認めた。



MRL-lpr マウスの腎臓におけるアクチビンの発現変化 (real-time PCR) (右グラフ)

各種マーカー(糸球体、尿細管、線維芽細胞、炎症細胞、血管内皮など)との 2 重染色を行ったところ、アクチビン産生細胞は浸潤マクロファージであることが判明した。

さらに、上記モデル動物にアクチビン・アンタゴニストであるフォリスタチン蛋白を投与し、内因性アクチビンシグナルを遮断した時の効果を調べた。腎機能、尿蛋白量、血尿、線維化、炎症細胞浸潤などを評価し、腎障害改善効果の有無を判定した。フォリスタチンの用量については、過去のラットに対する投与実験(Maeshima A, et al. J Am Soc Nephrol 12: 1685-1695, 2001)を参考にした。その結果、フォリスタチン投与により腎機能、腎組織障害(線維化面積、細胞性半月体数、浸潤した炎症細胞数)や尿蛋白量の改善を認めた。



フォリスタチン投与による尿蛋白量の改善効果(右グラフ)

以上の検討により、腎疾患治療、特にループス腎炎の治療において、アクチビンは有力な標的分子であることが示唆された。今後腎疾患の発症・進展におけるアクチビンの役割をさらに明らかにすることにより、腎疾患治療のさらなる発展が期待できると思われる。

(参考文献)

- 1: Takei Y, Takahashi S, Nakasatomi M, Sakairi T, Ikeuchi H, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y, Maeshima A. Urinary Activin A is a novel biomarker reflecting renal inflammation and tubular damage in ANCA-associated vasculitis. PLoS One. 14(10): e0223703, 2019
- 2: Iriuchishima H, Maeshima A, Takahashi S, Ishizaki T, Yokohama A, Tsukamoto N, Saitoh T, Murakami H, Handa H. Activin A: a novel urinary biomarker of renal impairment in multiple myeloma. Biosci Rep. 39(5): BSR20190206, 2019
- 3: Takahashi S, Nakasatomi M, Takei Y, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y, Maeshima A. Identification of Urinary Activin A as a Novel Biomarker Reflecting the Severity of Acute Kidney Injury. Sci Rep. 8(1):5176, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Shunsuke, Nakasatomi Masao, Takei Yoshinori, Ikeuchi Hidekazu, Sakairi Toru, Kaneko Yoriaki, Hiromura Keiju, Nojima Yoshihisa, Maeshima Akito	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of Urinary Activin A as a Novel Biomarker Reflecting the Severity of Acute Kidney Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-23564-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takei Yoshinori, Takahashi Shunsuke, Nakasatomi Masao, Sakairi Toru, Ikeuchi Hidekazu, Kaneko Yoriaki, Hiromura Keiju, Nojima Yoshihisa, Maeshima Akito	4. 巻 14
2. 論文標題 Urinary Activin A is a novel biomarker reflecting renal inflammation and tubular damage in ANCA-associated vasculitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0223703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iriuchishima Hirono, Maeshima Akito, Takahashi Shunsuke, Ishizaki Takuma, Yokohama Akihiko, Tsukamoto Norifumi, Saitoh Takayuki, Murakami Hirokazu, Handa Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Activin A: a novel urinary biomarker of renal impairment in multiple myeloma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 BSR20190206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20190206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋駿介、前嶋明人、他
2. 発表標題 急性腎障害における新たな尿中バイオマーカー：アクチビン
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----