

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09704

研究課題名（和文）時相変化に着目したAKI to CKD移行機序に果たす自然炎症の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of homeostatic inflammation in the AKI to CKD transition mechanism focusing on the time phase changes

研究代表者

早田 学（Hayata, Manabu）

熊本大学・病院・助教

研究者番号：30646120

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）：臓器特異的なMRP8ノックアウトマウスおよびレポーターマウスを用いて、AKIからCKDへの移行過程のphaseごとにおけるMRP8の役割を検討した。8-9週齢の雄 MRP8ノックアウトマウスおよびコントロールマウスに対して、右腎摘なしで30分の左腎虚血再灌流障害を加え、day 2, 7, 16でFACS解析を用いてマクロファージをsorting後、リアルタイムPCRにて炎症・線維化関連分子を解析した。その結果、MRP8ノックアウトマウスとコントロールマウスとの間に群間差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害患者が慢性腎臓病へ移行する過程で、TLR4に関連する炎症が関与していることは示唆されるものの、TLR4リガンドであるMRP8と腎障害慢性化との間に明確な関連を見出す結果には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We examined the role of MRP8 in each phase of the transition process from AKI to CKD. Eight to nine week-old male MRP8 knockout mice and control mice were subjected to left renal ischemia-reperfusion injury for 30 minutes without right nephrectomy. Macrophages were sorted using FACS analysis 2, 7 and 16 days after kidney injury, and then inflammation- and fibrosis-related molecules were analyzed by real-time PCR. As a result, no difference between groups was observed between the MRP8 knockout mouse and the control mouse.

研究分野：腎臓

キーワード：AKI CKD

## 1. 研究開始当初の背景

AKI は CKD 進展のリスク因子であり、機序として G2/M 細胞周期の停止・内皮細胞障害・エピジェネティクスのほか、好中球やマクロファージを含む免疫細胞の関与などが指摘されている (D.A. Ferenbach, *Nat. Rev. Nephrol.* 2015)。AKI からの修復の過程において腎組織局所で誘導される自然炎症が組織修復に重要な可能性が考えられる (H.J. Anders *JASN* 2014)。慢性炎症下においては TLR4 の内因性リガンドが全身性に上昇する (O.H. Mortensen, *PLoS ONE* 2009) のみならず、これに伴う腎障害時に腎組織局所で増加し腎症進展に重要な役割を果たす可能性が報告されている (Kuwabara T. *Diabetologia* 2012, *PLoS ONE* 2014)。申請者らは、プロテアーゼ(プロスタシン)が TLR4 ペプチドの K560/561 部位を切断しシグナルを軽減することによって、肝臓におけるインスリン抵抗性を改善することを報告している (Hayata M, *Nat Commun.* 2014; 図 1, 2)。TLR4 シグナルを介したインスリン抵抗性には過剰な遊離脂肪酸あるいはストレスを受けた細胞から分泌・放出される分子が内因性リガンドとして病態に重要な役割を果たすことが近年知られている (Donath MY, *Nat Rev Immunol.* 2011)。これらの概念は自然炎症あるいは慢性炎症として生活習慣病やガン、自己免疫疾患など多岐にわたる病態で重要であることが近年明らかになりつつある。実際に申請者らは CKD における慢性炎症をプロテアーゼ阻害剤 (CM: フオイパン®) によって抑制することで腎保護作用を示し、腎組織へのマクロファージ浸潤を軽減することを報告した (Hayata M. *AJP renal.* 2012; 図 3, 4)。

## 2. 研究の目的

マクロファージが AKI 病態に与える影響についてはまだ十分明らかにされておらず、本研究では TLR4 シグナルあるいはその内因性リガンドの果たす役割を検討することで、AKI からの腎組織修復機序解明さらには新規治療法の開発に繋げることを目的とする。虚血性腎傷害は、敗血症・ショック・移植・腎動脈硬化で臨床上的の問題となる。虚血性腎障害時には、壊死した尿細管から HSP・HMGB1・ヒストン・S100 タンパクなどの DAMPs が放出され、TLRs やインフラマソームを活性化し、サイトカイン・ケモカインを産生するとともに腎障害が進行する (Wu H, *JCI* 2007)。ケモカインは抗中球・M1 マクロファージを傷害部位に集積させる (Sik Lee, *JASN* 2011)。

Myeloid-related protein 8 (MRP8: S100A8) は敗血症性ショックの病態に重要な役割を果たし (Vogl T. *Nat Med.* 2007)、また腎性 AKI の鋭敏なマーカーとなり腎前性 AKI を除外できる可能性をもつ (Ae Jin Kim, *PLoS ONE* 2016)。MRP8 は腎障害時に上昇し、単球の集積に寄与するが、AKI が CKD 化する過程における MRP8 の腎予後に対する影響は不明である。さらに疫学調査により、MRP8 が病態に重要であることが知られている psoriasis を有する患者群で明らかに CKD の有病率が高いことが報告されている (Wan J. *BMJ* 2013, Farmer CK. *Nat Rev Nephrol.* 2013)。

以上より、AKI 慢性期には MRP8 のような内因性リガンドの発現が増強・持続し、TLR4, RAGE など自然免疫受容体を介して AKI からの組織修復に影響を与え、更には CKD へ移行する機序となる可能性が示唆される。さらにその機序には細胞の免疫反応が重要と考えられる。FACS やフローサイトメトリーで免疫細胞を解析した報告は多いが、腎組織における動的変化を捕えた報告は少ない。(腎組織におけるイメージング(免疫組織学的顕微鏡分析)は、マクロファージを含む免疫細胞が関与する炎症を動的に解析するのに役立つ方法である。)

## 3. 研究の方法

腎障害の急性期から慢性期にかけて、自然免疫機構を介する炎症反応が腎障害に対してどのように働くかを解明し、phase によって異なると思われる内因性リガンド及び受容体の役割を以下の様な方法を用いて明らかにする。

(1) AKI から CKD へ移行する過程における、TLR4 および内因性リガンドの変化を検討する。

(2) 臓器特異的な MRP8 KO マウスおよびレポーターマウスを用いて、AKI から CKD への移行過程の phase ごとにマクロファージが腎障害に対して果たす役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) AKI to CKD マウスモデルとしては片側腎虚血マウスを用い、37 下で25分間の腎動脈クランプによる虚血再灌流障害から3週間 経過後の障害側腎について検討した。障害側腎は非障害側腎と比較して萎縮しており(図1)、mRNAを用いた検討では、腎障害マーカー(KIM-1、NGAL)上昇、炎症マーカー(TNF、IL-1)上昇、線維化マーカー(TGF、SMA)上昇を認め、TLR4 内因性リガンド(MRP8)の増加を伴っていた。MRP8 が腎組織局所の慢性炎症に与える影響を検討するために、RAW264.7 細胞を用いてLPS およびコンビナント MRP8 の添加実験を行い、併せて TLR4 阻害薬(E5564)の影響を検討した。その結果、炎症マーカー(IL-6、IL-1)の上昇を認め E5564 によってキャンセルされた(図2、左半分はE5564 なし、右半分はあり)。以上より AKI から CKD への移行過程に、MRP8 による炎症が関与しており、その経路にTLR4 が関与していることが示唆された。

(2) Cre/loxP システムを用いて、骨髄特異的な MRP8 ノックアウト(KO)マウスを作成し、mRNA および蛋白レベルで60-80%発現が低下していることが確認された(図3)。野生型マウスを用いた実験で、37 下で25分間の腎動脈クランプによる片側腎虚血再灌流障害から3週間経過後、障害側腎が非障害側腎と比較して有意に萎縮しており、同側でNGAL、IL-1、TGF のmRNAが上昇していることを確認した。

## IRI 3 週後の腎萎縮像



非 IRI 側

IRI 側

図 1

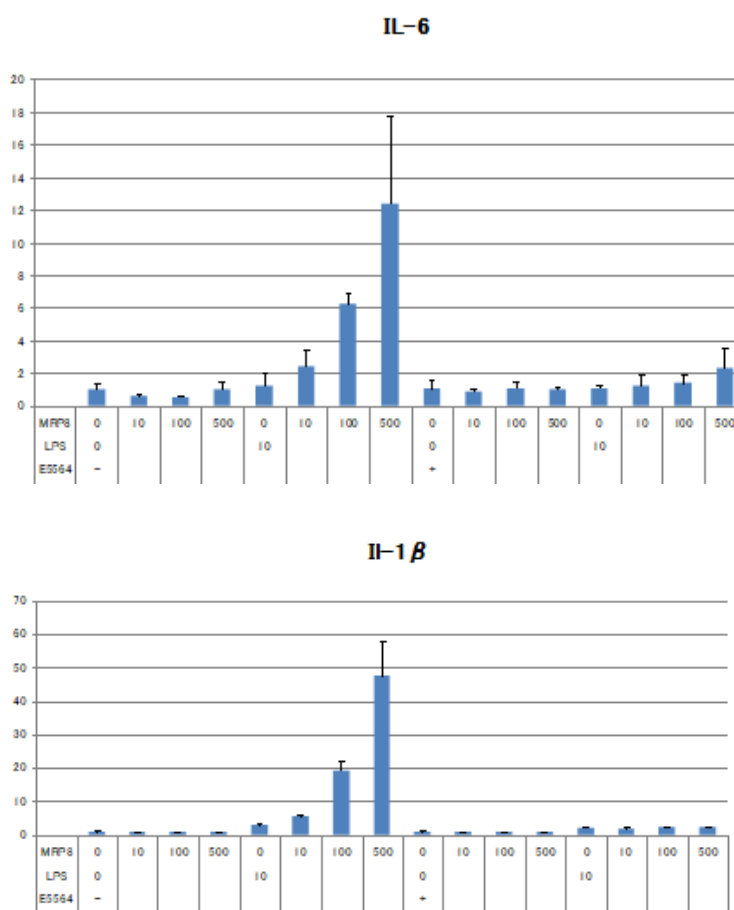


図 2

(3) AKI から CKD への移行過程に、MRP8 による炎症が関与しており、MRP8 KO マウスでは炎症が軽減し CKD への移行が減弱するという仮説を立てた。8-9 週齢の雄 MRP8 KO マウス (floxed) およびコントロールマウス (non-floxed) に対して、右腎摘なしで 30 分の左腎虚血再灌流障害を加え、day 2, 7, 16 で障害側の腎組織を回収した。骨髓由来細胞のみが蛍光する Zs-Green レポーターアッセイの手法を用いておよび、FACS 解析を用いてマクロファージを sorting した。具体的には Ly6G を好中球マーカーとして用い、Ly6G(+)/CD11b(+) のダブルポジティブ集団を好中球とし、Ly6G(-)/CD11b(+) の集団は単球・マクロファージとする選別を行った。この際に萎縮が強い個体では、Ly6G/CD11b の 2 次元所見が他と大きく異なっていた。Sorting したマクロファージから RNA を抽出しリアルタイム PCR にて炎症・線維化関連分子を解析した結果、day2 と比べて day7, 16 では炎症・線維化が強くなっている傾向はあるものの、MRP8 KO マウス (floxed) とコントロールマウス (non-floxed) との間に群間差は認められなかった (図 4)。

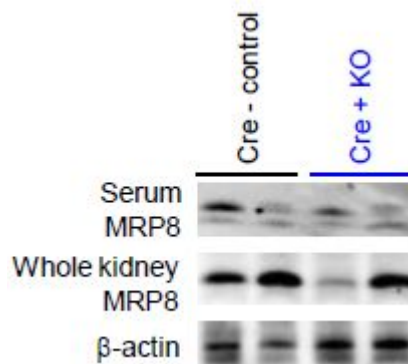


図 3

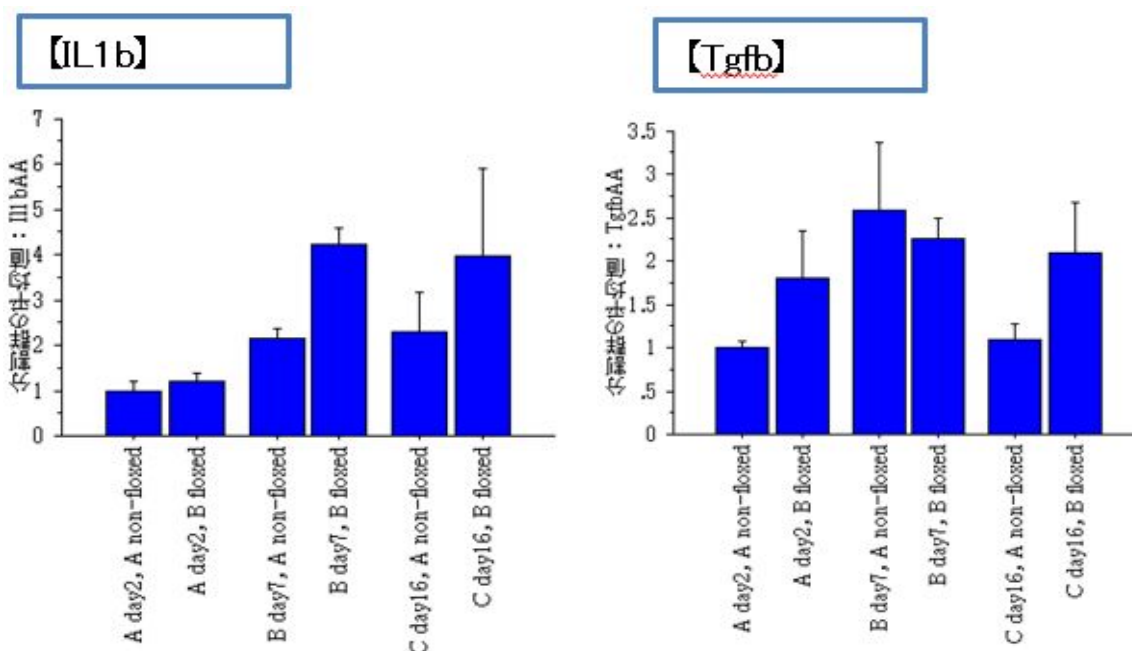


図 4

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 Manabu Hayata, Junji Yamashita, Kentaro Tokunaga, Masashi Ejima, Katsuyuki Sagishima, Shigeki Nakagawa, Daisuke Hashimoto, Hideo Baba, Kosuke Maruyama, Yu Kohrogi, Teruhiko Mizumoto, Masashi Mukoyama and Hidenobu Kamohara	4. 巻 3: 53
2. 論文標題 Refractory peritonitis by spontaneous perforation of the common bile duct in a patient receiving peritoneal dialysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Renal Replacement Therapy	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hata Y, Kuwabara T, Mori K, Kan Y, Sato Y, Umemoto S, Fujimoto D, Kanki T, Nishiguchi Y, Yokoi H, Kakizoe Y, Izumi Y, Yanagita M, Mukoyama M	4. 巻 10
2. 論文標題 Ablation of Myeloid Cell MRP8 Ameliorates Nephrotoxic Serum-induced Glomerulonephritis by Affecting Macrophage Characterization through Intraglomerular Crosstalk.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kanki Tomoko, Kuwabara Takashige, Morinaga Jun, Fukami Hirota, Umemoto Shuro, Fujimoto Daisuke, Mizumoto Teruhiko, Hayata Manabu, Kakizoe Yutaka, Izumi Yuichiro, Tajiri Saeko, Tajiri Tetsuya, Kitamura Kenichiro, Mukoyama Masashi	4. 巻 21
2. 論文標題 The predictive role of serum calprotectin on mortality in hemodialysis patients with high phosphoremia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-020-01812-x	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神吉 智子, 桑原 孝成, 梅本 周朗, 藤本 大介, 水本 輝彦, 早田 学, 中山 憲司, 宮崎 有, 井上 貴博, 小川 修, 向山 政志
2. 発表標題 CKDにおけるMRP8の化学修飾の探索とその意義の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本 大介, 桑原 孝成, 梅本 周朗, 神吉 智子, 水本 輝彦, 早田 学, 泉 裕一郎, 柿添 豊, 向山 政志
2. 発表標題 糸球体内クロストークにおけるメサンギウム細胞由来因子によるポドサイトERストレス応答の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早田学、中原智史、徳永健太郎、江嶋正志、成松紀子、鷺島克之、蒲原英伸
2. 発表標題 当院で実施した心停止後症候群に対する体温管理療法
3. 学会等名 第20回日本脳低温療法・体温管理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.kumadai-nephrology.com/">http://www.kumadai-nephrology.com/</a>
---

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
研究分担者	桑原 孝成  (Kuwabara Takashige)  (00393356)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師    (17401)	