

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08203

研究課題名(和文) レドックス破綻からアプローチする新たな急性腎障害の発症修復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Pathogenesis and Repair Mechanism of Acute Kidney Injury by a New Approach from Redox Dysregulation

研究代表者

糟野 健司 (Kasuno, Kenji)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：60455243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レドックス制御因子Thioredoxin (TXN)とAKI-to-CKD transitionの関連を調べた。TXNはAKIの重症度に応じて尿中に増加し、尿細管で減少した。AKIによる尿細管内TXNの減少に伴って、レドックス感受性G2/M細胞周期制御因子Cdc25Cの局在変化、G2/M停止、間質線維化、血清クレアチニン上昇を認めた。一方、尿細管内TXN高発現マウスではこれらの変化が抑制された。ヒトでは、尿中TXNの上昇がAKI-to-CKD transitionを介した慢性維持透析と関連していた。以上よりTXNがAKI-to-CKD transitionの病態に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKIやCKDは病因が特定されていないため、病因を標的とした個別化医療の展開が困難で、現在は病因によらず腎機能によって画一的に診断されている。一方で腎臓のレドックス調節不全を標的としてBardoxolone methylを始めとするレドックス調節薬が開発されている。病因に基づいた治療薬の登場により、分子メカニズムに基づいて適切な治療法選択に役立つバイオマーカーが求められている。本研究成果は、尿中TXNが腎臓のレドックス調節異常を検出できることを示唆している。さらなる研究により、尿中TXNがレドックス調節薬に反応する患者を特定するコンパニオン診断薬として腎臓病の個別化医療に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The relationship between the redox regulator thioredoxin (TXN) and AKI-to-CKD transition was investigated. Depending on the severity of AKI, TXN increased in the urine and decreased in the tubular cells. In accordance with the decrease of TXN, phosphorylation of redox-sensitive G2/M cell cycle regulator Cdc25C was increased and the localization was changed from nucleus to cytoplasm in wild-type mice with severe AKI. Subsequent AKI-to-CKD transition including G2/M arrest, interstitial fibrosis, and elevation of serum creatinine were observed in these mice. In contrast, these findings of AKI-to-CKD transition were suppressed in TXN transgenic mice. In humans, high urinary TXN levels at the AKI onset were associated with subsequent chronic maintenance dialysis dependency. These results suggest that TXN is involved in G2/M cell cycle arrest in AKI-to-CKD transition. Urinary TXN is useful for the G2/M arrest biomarker in AKI and also a companion diagnostic for redox-modulating therapeutics.

研究分野：腎臓内科

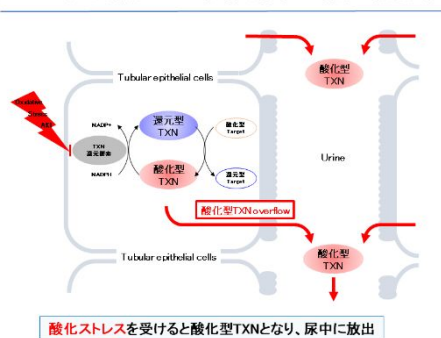
キーワード：急性腎障害 酸化ストレス レドックス チオレドキシン G2/M細胞周期停止 バイオマーカー 尿中チオレドキシン AKI-to-CKD transition

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (acute kidney injury; AKI) は従来、完治する疾患と考えられていたが、一部の患者は慢性腎臓病へと移行し慢性維持透析に至る症例が多いことがわかってきた。慢性移行のメカニズムとして尿細管の細胞周期が G2/M 期で停止し、腎間質線維化をきたすことが示唆されている。研究代表者らは AKI において酸化ストレスから 3 時間という早期にチオレドキシン (thioredoxin; TXN) が尿細管細胞内から細胞外の尿中に放出され、細胞内のレドックス制御タンパク TXN が枯渇してレドックス破綻が起きることを独自に発見した (Kasuno et al. *AJP Renal Physiol* 2014) (図 1)。逆に遺伝子導入マウスで TXN を過剰発現させると、虚血再還流障害による AKI が軽減されることがわかっている (Kasuno et al. *Kidney Int* 2003)。TXN は 12kDa のレドックス制御タンパクで、2 つの近接したシステインのチオール基からなるレドックス活性中心の状態により酸化型と還元型をとる。定常状態では酸化された TXN は

図 1 AKIにおける酸化ストレス依存的尿中TXN排泄と細胞内枯渇



TXN が枯渇してレドックス破綻が起きることを独自に発見した (Kasuno et al. *AJP Renal Physiol* 2014) (図 1)。逆に遺伝子導入マウスで TXN を過剰発現させると、虚血再還流障害による AKI が軽減されることがわかっている (Kasuno et al. *Kidney Int* 2003)。TXN は 12kDa のレドックス制御タンパクで、2 つの近接したシステインのチオール基からなるレドックス活性中心の状態により酸化型と還元型をとる。定常状態では酸化された TXN は

TXN 還元酵素により再び還元型にされてリサイクルされるが、酸化ストレスが TXN 還元酵素の還元能力を超えて過剰となった場合、酸化型 TXN は細胞外に放出される (Kondo et al. *J Immunol* 2004)。一方、細胞周期の G2/M 期に特異的なホスファターゼである Cdc25C も分子内に 2 つのシステインからなるレドックス活性中心を有しており、レドックス依存的に G2/M 停止に関わっていることが報告されている (PA. Savitsky *J Bio Chem* 2002)。これらの報告から AKI における尿細管内 TXN の枯渇により細胞周期 G2/M 停止が引き起こされる可能性が提起された。

2. 研究の目的

本研究の目的は「AKI におけるレドックス破綻」からアプローチして AKI から慢性腎臓病への移行メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

培養尿細管細胞に TXN siRNA を用いて TXN ノックダウンを施し、培養細胞で AKI における尿細管レドックス破綻を再現した。TXN ノックダウンが Cdc25C のリン酸化と局在変化、G2/M 停止マーカー-phospho-Histone H3、TGF- β 、CTGF に及ぼす影響を調べた。また培養尿細管細胞に TXN 還元酵素阻害剤を添加することにより、培養細胞で AKI における尿細管レドックス破綻を再現して同様の観察を行った。TXN 遺伝子導入や TXN 誘導剤投与マウスに腎虚血後 14 日間再灌流させて AKI-to-CKD transition を発症させ、Cdc25C のリン酸化と局在変化、G2/M 停止マーカー-phospho-Histone H3 を免疫染色とウェスタンブロット法で観察した。さらに線維化促進因子 TGF- β 、CTGF の腎臓での発現量を RT-PCR で定量した。腎組織を fibroblast specific protein-1 (FSP-1)、smooth muscle actin (SMA)、マッソントリクローム法で染色し、間質線維化面積を測定した。腎機能は血清クレアチンを測定し、TXN 誘導の影響を対照コントロールマウスと比較した。さらにヒト AKI 患者 44 例を追跡し、AKI 発症時の尿中 TXN 濃度と慢性維持透析移行、死亡率との関連を調べた。

4. 研究成果

図2 培養尿細管上皮細胞においてTXN阻害はG2/M停止を惹起する

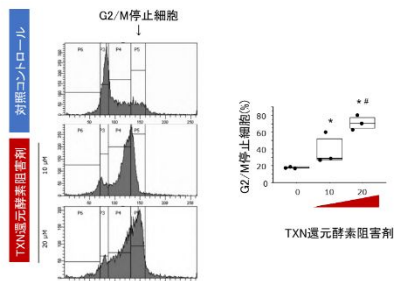


図3 TXN阻害はCdc25Cを介してG2/M停止を惹起する

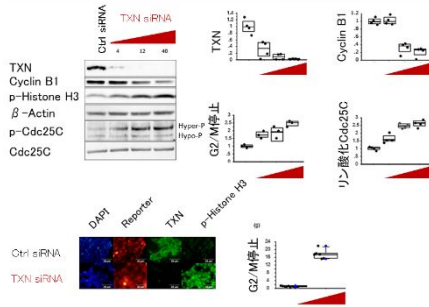


図4 TXN siRNAによりpCdc25Cは核から細胞質にの局在変化する

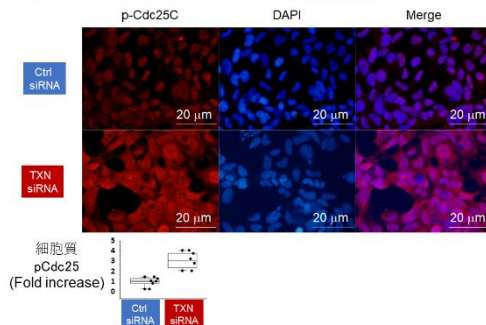


図5 TXN阻害は線維化促進因子を亢進する

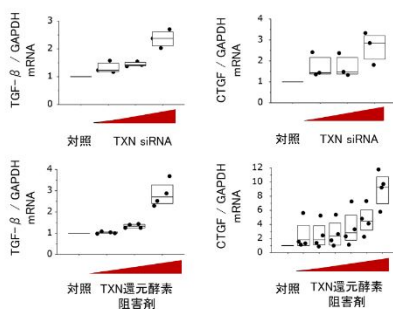
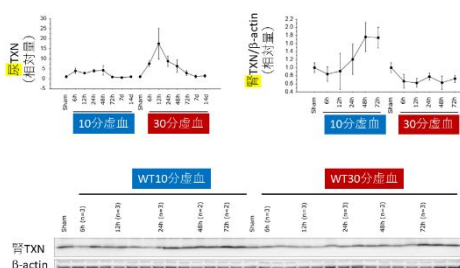


図6 AKIの重症度により尿TXNが増加し腎TXNは枯渇する



AKI における尿細管細胞内の TXN 枯渇を再現するために培養尿細管細胞に TXN 還元酵素阻害剤を加えて細胞周期への影響を観察した。フローサイトメトリー法による観察では TXN 還元酵素阻害剤は用量依存的に G2/M 停止を有意に増加させた (図 2)。さらに TXN siRNA で TXN をノックダウンし、ウエスタンブロット法で G2/M 停止マーカー-phospho-Histone H3 や G2/M 促進因子 Cyclin B1 の発現量、G2/M 制御因子 Cdc25C の Ser216 リン酸化をウエスタンブロット法で観察した。Cyclin B1 の発現量は用量依存的に低下し、Cdc25C の Ser216 リン酸化が増加し、phospho-Histone H3 が増加した。これらの結果から尿細管細胞内の TXN 枯渇が細胞周期の G2/M 停止に関与していることがわかった (図 3)。

G2/M 制御因子 Cdc25C は核から細胞質へ局在変化するにより不活化することが知られている。このことから、TXN 枯渇が Cdc25C の局在に与える影響を調べるために培養尿細管細胞に TXN siRNA を用いて TXN ノックダウンを施し、Ser-216 リン酸化 Cdc25C の局在変化を観察した。Negative control siRNA を処理した細胞では Ser-216 リン酸化 Cdc25C は主に核に発現を認めたと、TXN siRNA を処理した細胞では Ser-216 リン酸化 Cdc25C が細胞質に分布し、TXN ノックダウンにより Cdc25C が核から細胞質に局在変化する事がわかった (図 4)。

G2/M 期細胞周期停止は腎間質の線維化を引き起こすことが報告されているため、TXN 枯渇による線維化促進サイトカインへの影響を調べた。培養尿細管細胞に TXN siRNA 作用させると用量依存的に TGF- と CTGF の mRNA が亢進することがわかった。TXN 還元酵素阻害剤も用量依存的に TGF- と CTGF の mRNA が亢進することがわかった (図 5)。

次にマウスの虚血再灌流障害による AKI-to-CKD transition モデルにおいて、重症度に応じて TXN 枯渇が起こるかどうかを調べた。腎虚血 10 分の後に再灌流したマウス群、腎虚血 30 分の後に再灌流したマウス群の両群で尿中 TXN 排泄と腎尿細管 TXN 発現量を経時的に観察した。10 分虚血再灌流マウスでは尿中 TXN 排泄の増加は限定的であったが、30 分

図7 重症AKIはTXN枯渇によりCdc25Cを介してG2/M停止を惹起する

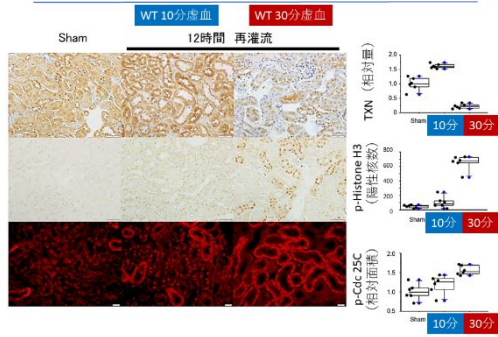


図8 TXNトランスジェニックマウス(TXN-Tg)の腎でのTXN発現

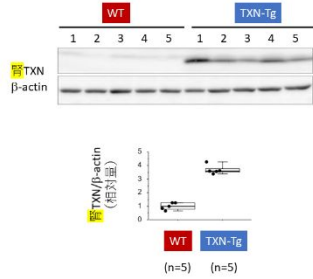


図9 TXN-TgマウスはG2/M停止を解除し慢性化を抑制する

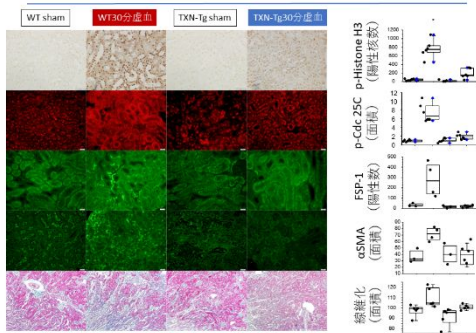
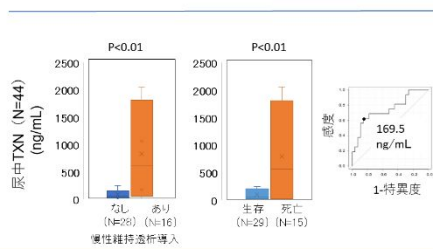
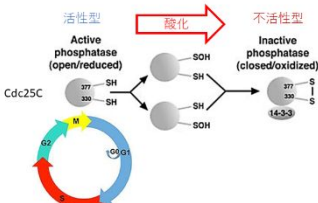


図10 尿中TXN排泄が多いAKIは慢性維持透析に移行し死亡が多い



AKI発症時の尿中TXN cut off = 170 ng/mL以上で透析導入
AUC=0.75 (95%CI: 0.5852-0.9056)、感度0.652、特異度0.852

図11 尿管TXN枯渇はCdc25C酸化を介しG2/M停止を起す



レドックス感受性G2/M制御蛋白Cdc25Cフォスファターゼは酸化型になると核外移行により不活化しG2/M停止を来す。

虚血再灌流マウスでは尿中 TXN は 6 時間目から増加し 12 時間をピークに濃度が増加した。一方、腎臓では 10 分虚血再灌流による TXN 枯渇は限定的で、早期に回復するのにに対し、30 分虚血再灌流による TXN は著しく枯渇し、回復が遅くて枯渇が 72 時間まで遷延した(図 6)。30 分虚血再灌流マウスでは尿細管の TXN 枯渇に伴って phospho-Histone H3 が核に染色され、Ser-216 リン酸化 Cdc25C は核から細胞質に局在変化することがわかった(図 7)。

逆に尿細管の TXN を増加させた時の影響を観察するために、TXN 遺伝子導入マウス(図 8)と野生型マウスを比較した。30 分虚血の後、14 日間再灌流を行った野生型マウスの腎臓では phospho-Histone H3 が核に染色され、Ser-216 リン酸化 Cdc25C が核から細胞質に局在変化し、fibroblast specific protein-1 (FSP-1)陽性細胞が増加し、

SMA が発現亢進し、間質線維化面積が増大し、TGF- β 、CTGF の産生が亢進し、AKI-to-CKD transition に特徴的な所見が認められた。一方、TXN 遺伝子導入マウスでは 30 分虚血 14 日間再灌流障害による phospho-Histone H3、Ser-216 リン酸化 Cdc25C 局在変化、fibroblast specific protein-1 (FSP-1)の亢進、SMA の亢進、間質線維化面積の増大、TGF- β 、CTGF の産生亢進が抑制された(図 9)。

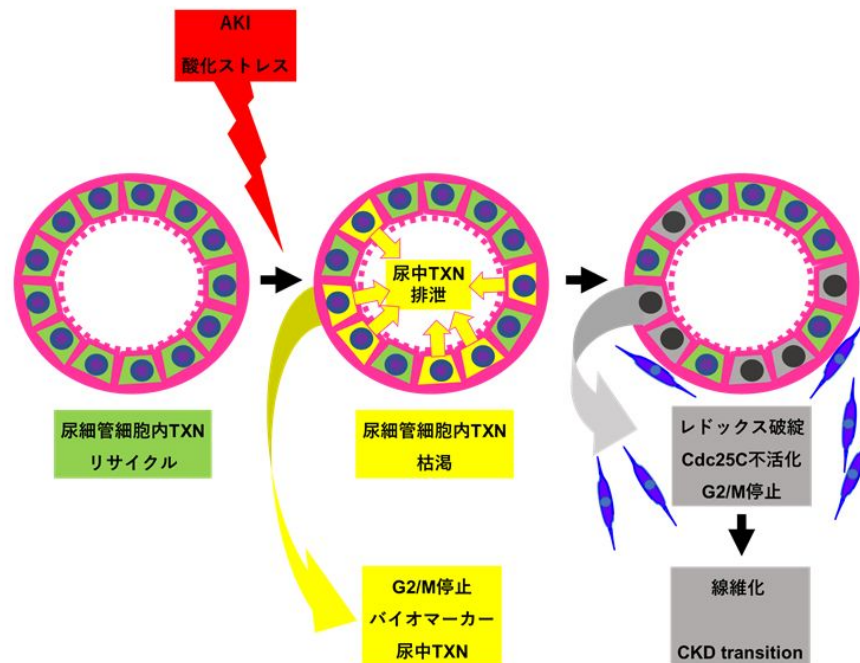
野生型マウスに TXN 誘導剤を 30 分の虚血再灌流障害の 30 分後から 14 日間毎日投与し、尿細管内 TXN を発現亢進させても AKI-to-CKD transition に特徴的な phospho-Histone H3 の亢進、Ser-216 リン酸化 Cdc25C の局在変化、FSP-1 の亢進、SMA の亢進、間質線維化面積増大、TGF- β 、CTGF の亢進は生理食塩水投与対称群と比較し有意に抑制された。

最後に 44 例のヒト AKI にて AKI 発症時の尿中 TXN の排泄と AKI 後の予後を追跡調査したところ、最長 6 年間の観察期間に AKI-to-CKD transition によって慢性維持透析になった患者では AKI 発症時の尿中 TXN が有意に高いことがわかった。さらに尿中 TXN 濃度 170 ng/mL をカットオフとし AKI 後の慢性維持透析導入を予測できることがわかった。また、最終的に総死亡に至った患者でも AKI 発症時の尿中 TXN が有意に高いことがわかった(図 10)。

これらの結果から AKI における尿中 TXN 排泄および尿細管内 TXN 枯渇による尿細管レドックス破綻はレドックス感受性 G2/M 制御因子 Cdc25C のリン酸化と核から細胞質への局在変化による不活化を介して尿細管細胞の G2/M 細胞周期停止を来すメカニズムの一つであることが解明された (図 11)。

本研究成果により、AKI 発症時の尿中 TXN は AKI-to-CKD transition の原因となる G2/M 細胞周期停止に関する情報を提供する質的バイオマーカー、さらにはレドックス調節薬に反応する患者を特定するためのコンパニオン診断薬として有用である可能性が示唆された (図 12)。

図12 尿細管内TXN枯渇によるAKI-to-CKD transitionの病態仮説と尿中TXNのG2/M停止バイオマーカーとしての有用性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seiji Yokoi, Kenji Kasuno, Kazuhisa Nishimori, Sho Nishikawa, Yudai Nishikawa, Sayu Morita, Mamiko Kobayashi, Sachiko Fukushima, Daisuke Mikami, Naoki Takahashi, Yumiko Oota, Hideki Kimura, Yoshihiro Soya, Shinsuke Kimata, Kengo Nishimura, Takahiko Ono, Eri Muso, Haruyoshi Yoshida, Junji Yodoi, and Masayuki Iwano	4. 巻 507
2. 論文標題 Analytical and Clinical validation of rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for urinary thioredoxin, an oxidative stress-dependent early biomarker of acute kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 271-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.04.025.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 糟野健司
2. 発表標題 Redox dysregulation after acute renal injury is a novel pathophysiology of AKI-to-CKD transition
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 糟野健司
2. 発表標題 レドックス制御破綻を介したG2/M細胞周期停止による新たなAKI-to-CKD transitionのメカニズムと診断・治療への応用について
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会西部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 糟野健司
2. 発表標題 Intracellular thioredoxin depletion triggers tubular epithelial cell cycle arrest at G2/M after acute kidney injury
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 糟野健司
2. 発表標題 Urinary thioredoxin 1 as a G2/M cell cycle arrest marker of acute kidney injury
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 腎障害の予防剤または治療剤	発明者 糟野健司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-114970	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 腎障害の予防剤または治療剤	発明者 糟野健司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/1598	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 尿中チオレドキシンの測定により、急性腎障害からの回復の予測や慢性移行の可能性を推定する技術	発明者 糟野健司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-66043	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 尿中チオレドキシンの測定により、急性腎障害からの回復の予測や慢性移行の可能性を推定する技術	発明者 糟野健司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/9522	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	岩野 正之 (Iwano Masayuki) (20275324)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	
研究分担者	木村 秀樹 (Kimura Hideki) (20283187)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高橋 直生 (Takahashi Naoki) (30377460)	福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教 (13401)	
研究分担者	三上 大輔 (Mikami Daisuke) (90464586)	福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教 (13401)	
研究分担者	松本 英樹 (Matsumoto Hideki) (40142377)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関