

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08256

研究課題名(和文) 二重鎖DNA障害による超急性期から慢性期におよぶ移植腎機能障害の解析

研究課題名(英文) Double-strand DNA injury in acute and chronic stages of renal allografts

研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA, Hitoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50191531

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)：移植腎症(137例)の疾患コホートにおいて、移植腎におけるDNA損傷の定量的評価と腎機能障害との関連について、移植早期における無機能腎あるいは機能発現遅延の診断に適切な指標であることを明らかとした。さらに、長期移植腎症でDNA損傷を伴う糸球体におけるVI型膠原線維の蓄積に関して、培養ヒト糸球体内皮細胞における細胞内シグナル伝達経路をDNA損傷誘発剤マイトマイシンC(MMC)等で処理した実験系により検討し、DNA損傷によるVI型膠原線維の分泌にはATRキナーゼ経路が関与し、直接的あるいは間接的に輸送蛋白として働くANXA2に作用す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

本研究により、臨床的に問題となっている急性期から慢性期に至る一連の移植腎障害の進展における二重鎖DNA損傷からVI型膠原線維蓄積による糸球体硬化に至る機序を解明し、その分子メカニズムに対する新しい治療法の開発への道を開き、末期腎不全への進行抑制と腎不全対策としての次世代移植医療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been clarified the relation between the DNA damage at the early phase after renal transplantation and the primary non-functioning or delayed graft function of transplant kidneys in the cohort of renal transplantation (137 cases). The quantitative evaluation of DNA damage is an appropriate index for the diagnosis of the onset of renal dysfunction from the early to the late stages of transplanted renal allografts.

Collagen type VI (COL6) deposition occurs in various glomerular diseases such as transplanted nephropathy, causing serious pathological damage like nodular lesions. In in vitro studies, COL6 secretion from human renal glomerular endothelial cells (HRGECs) was induced by Mitomycin C (MMC) treatment associated with the number of γ -H2AX-positive cells. These results confirm that nodular glomerulosclerosis partially results from DNA damage in the glomerulus and that DNA damage induced COL6 secretion from HRGECs occurs through an ATR and ANXA2-mediated pathway.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：疾患コホート DNA損傷マーカー VI型膠原線維 移植腎障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 移植腎障害においては、超急性～急性拒絶における免疫学的機序(細胞性および液性)が注目され、臨床的にもこの抑制が移植医療の進歩につながっている。本研究者は、これまでに慢性移植腎症の糸球体障害として、移植後の年月が経るにつれて腎糸球体係蹄における内皮細胞(CD34陽性)の二重鎖DNA損傷とVI型膠原線維(COL6)の増加が慢性移植腎症における糸球体障害を促進する事を明らかとした。加えて、ヒト糸球体係蹄内皮初代培養細胞を用いた *in vitro*の実験系において、二重鎖DNA損傷によるCOL6の分泌増加を確認した(図1, Clin Exp Nephrol 20:479-88, 2016)。

(2) 移植腎においては、周術期に「虚血再灌流障害」等による尿細管上皮細胞障害が種々の程度で発生し、不可逆的な移植腎機能障害(primary nonfunctioning, PNF)や機能発現遅延(delayed graft function, DGF)を生じることが、腎移植医療における重要な課題となっている。近年、急性腎障害が慢性腎障害の進行に重要な因子であることも知られるに至っているが、移植早期にPNFあるいはDGFを診断治療する適切な指標がないのが現状である。以上より、移植腎障害には、細胞性ならびに液性による免疫学的機序と、DNA損傷を引き金とした尿細管間質障害および糸球体係蹄内皮細胞からのCOL6分泌という非免疫学的機序が、独立あるいは関連しながら関わっているとの作業仮説を立てた。

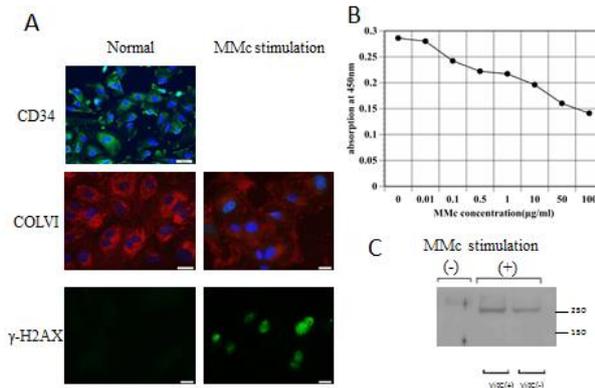


図1:ヒト糸球体係蹄内皮初代培養細胞における二重鎖DNA損傷によるVI型膠原線維の分泌増加

2. 研究の目的

- (1) 本研究は、これまでのコホートをさらに発展させ、移植直後の超急性期における二重鎖DNA障害の観点からのPNFあるいはDGFを解析する。
- (2) 慢性移植腎症等の糸球体および尿細管機能障害を臨床病理学的に解析する。
- (3) ヒト腎糸球体係蹄内皮細胞の初代培養系を用いたCOL6分泌の分子機構を解明し、不可逆的な糸球体線維化に至る過程の抑制機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) 移植腎症の疾患コホート作成と解析:

金沢医科大学において2007年以後に腎移植および腎生検が実施された移植腎症(137例)の疾患コホートの後向き調査において、経年的な腎機能予後調査を行う。

(2) 臨床病理学的診断における病変部血管・線維化の意義:

作成したコホート症例における生検組織の糸球体ならびに間質病変に関して画像解析装置を用いて腎病変の程度や、線維化の程度をスコア化する。さらに同一標本において、特異的抗体を用いた免疫組織化学法により、病変部位でのDNA損傷の程度を調べる。

- ① 光顕による評価: Banff分類に準じた評価を行う。
- ② 電顕による評価: 慢性抗体関連型拒絶反応の所見を重点的に評価する。
- ③ 蛍光抗体法でリン酸化ヒストン H2AX(γ-H2AX)発現量を定量的に評価する。

(3) DNA 損傷に伴う糸球体内皮細胞からの COL6 分泌における細胞内シグナル伝達経路の解析：

Primary human glomerular endothelial cells (HRGEC, ScienCell Research Labo) を、DNA 損傷誘発剤マイトマイシンC (MMC) あるいは活性酸素種 H_2O_2 処理等によりDNA 損傷を誘発する。

- ① γ -H2AX および COL6 の細胞内動態を免疫蛍光染色法と Western 法で継時的に観察する。
- ② DNA 損傷を認識し DNA 損傷時のシグナル伝達で中心的な役割を果たす 3 つのキナーゼ(ATM, ATR, DNA-PK) に対する特異的な阻害剤(KU55933, VE-821, Nu7441) による COL6 分泌動態を検討する。さらに、これらシグナル伝達経路を特定した後に、その経路に関与する蛋白質発現抑制による COL6 分泌抑制を確認する。

4. 研究成果

(1) 移植腎症の疾患コホート作成と解析：

金沢医科大学において2007年以後に腎移植および腎生検が実施された移植腎症(137例)の疾患コホートの経年的な予後調査により、以下の知見を得た。

① CTRP-9と血管石灰化および移植腎機能障害

腎移植患者において動脈硬化を背景に発生するCardiovascular disease(CVD)は、死亡に伴う移植腎機能喪失の主要な原因の一つである。

本研究の一環として、Adiponectin (ADPN)のパラログであるC1q/TNF- α related protein-9(CTRP9)の動脈硬化の進行およびCVDの発生との関連について検討した。

血清CTRP9濃度の変化量と血清高分子-ADPN濃度変化量との正相関($rS=0.315$, $p=0.026$) および血管石灰化(aortic calcification area index, ACAI) 変化量との負の相関が確認された。

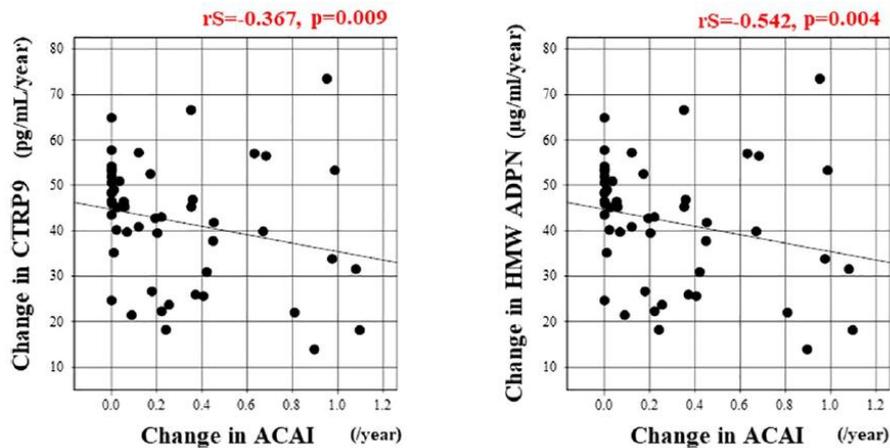


図 2：ACAI変化量と血清CTRP9および高分子-ADPN濃度変化量との関係

重回帰分析において、血清CTRP9濃度の増加は、ACAIの有意な改善因子であった。さらに、腎内動脈内皮細胞においてCTRP9とAdipoR1との共局在を認めた。

以上から、腎移植例において、CTRP9は高分子-ADPNとともにAdipoR1を介して血管保護作用を発揮し、大動脈石灰化の進行および移植腎機能喪失を抑制する可能性が示めされた (PLoS One. 2020 15(1): e0226526. doi: 10.1371/journal.pone.0226526) .

② 高分子アデポネクチンの移植腎機能障害および骨格筋異常への影響

腎移植におけるADPNと動脈硬化ならびにサルコペニアとの関連について、1998年以降に腎移植を施行した51例(生体腎40例, 献腎11例: 男性31例, 女性20例, 移植時年齢29~52歳)を対象に8年間の変化を調査検討した。

骨格筋の評価指標であるPsoas muscle index(PMI)とIMAC(Intramuscular adipose tissue)の経年的

に調査により，以下の知見を得た．移植時年齢は移植前PMIと負の相関，移植前IMACとは正相関を示した(各々 $rS=-0.427$, $p<0.01$, $rS=0.501$, $p<0.01$)．また，腎移植1年および5年目において，血清高分子ADPN濃度とPMIとの間に負の相関を認めた．多変量解析において，PMIの平均変化量に対して高分子量ADPN濃度の平均変化量の増加が増悪因子となった (Sci Rep. 2020; 10(1):10723. doi: 10.1038/s41598-020-67711-1) ．

③ 非古典的組織適合抗原Class I (human leukocyte antigen G, HLA-G) と移植腎機能障害

非古典的HLAクラス I 分子であるHLA-Gの移植腎における発現動態および移植腎長期予後との関連を検討した．腎移植2-4週もしくは1年後の腎生検組織において，40例中12例 (30%)で近位尿細管の核周囲および血管側基底膜にその発現を認めた．HLA-G発現群では移植腎機能低下 (eGFR30%減少および血清クレアチニン(s-Cr)1.5倍化)に対する有意な抑制効果を認めた (図3: Clin Exp Nephrol 25:479-88, 2021) ．

図3: HLA-G発現と移植腎機能低下 (eGFR30%減少) との関連: Kaplan-Meier 法による検討 ($p=0.0164$; Log-rank 検定)．

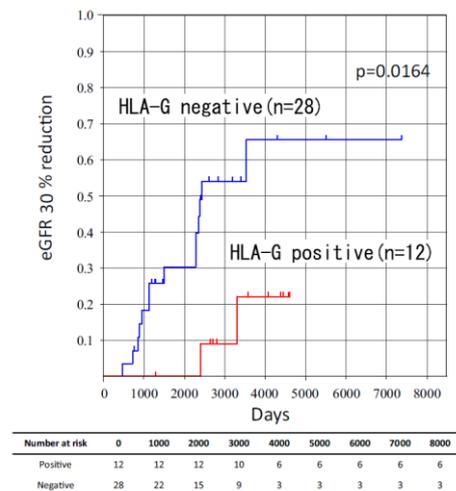


図 3

(2) 臨床病理学的診断における近位尿細管障害および糸球体結節性病変の意義:

① 急性期移植腎障害の検討:

DGF のグレードを①immediate function, ②slow graft function, ③DGF, ④severe DGF, ⑤primary non-function (PNF) の5群に分け比較すると，各群間で $\Delta \gamma$ -H2AX (1hr-0hr)および移植後1~4週間までのS-Crと推算GFRに有意差を認めた．多変量解析では，ドナーの移植前s-Cr値および $\Delta \gamma$ -H2AX (1hr-0hr)がDGFのグレードを予測する有意因子であった (s-Cr: β 値 0.772, $p<0.001$; $\Delta \gamma$ -H2AX: β 値 3.457, $p=0.002$)．ROC解析では， $\Delta \gamma$ -H2AX (1hr-0hr) 12%以上により，感度100%，特異度88.2%でsevere DGFおよびPNF群を判別可能であった (AUC:0.922, $p=0.023$, Clin Exp Nephrol. 24: 96-104, 2020)．

② 慢性期移植腎障害および類似病変の検討:

糸球体における γ -H2AX陽性率 (β 値 0.539, $p = 0.014$)および尿タンパク/クレアチニン比 (β 値 -0.494, $p = 0.039$)は，COL6陽性率に対する独立した関連因子であることが多変量回帰により示された．また，長期移植腎におけるCOL6沈着を伴う結節様病変を確認し，同部位を中心とした糸球体係蹄内皮細胞における γ -H2AX発現ならびに結節性病変群における γ -H2AX発現と糸球体内COL6蓄積との間に正相関を認めた ($rS=0.642$, $p=0.017$; Sci Rep. 2020; 10(1):22206. doi: 10.1038/s41598-020-79106-3)

(3) 培養ヒト糸球体内皮細胞によるCOL6分泌における細胞内シグナル伝達経路の解析：

Primary human glomerular endothelial cells (HRGEC) を、DNA損傷誘発剤マイトマイシンC (MMC) 処理してDNA損傷を誘発した実験系により検討し、以下を明らかとした。

① DNA損傷によるCOL6分泌の誘導シグナルの同定：DNA損傷時のシグナル伝達で中心的な役割を果たす3つのキナーゼ(ATM, ATR, DNA-PK)に対する特異的な阻害剤によるCOL6分泌が抑制を検討し、ATR阻害剤VE-821処理によりCOL6の分泌低下を確認した。

右図4：ATR阻害薬によるMMC刺激後のヒト糸球体内皮細胞からのCOL6分泌が抑制された。

(Mann-Whitney U検定.* p<0.05, ** p<0.01)

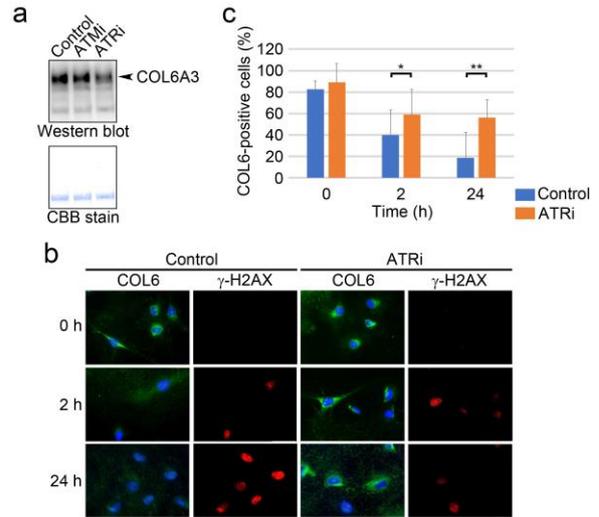


図4

② ①で同定した司令塔分子の下流で働くCOL6の細胞内輸送分子候補として、DNA損傷誘発後の細胞内 Annexin A2の細胞膜移行を解析し、Annexin A2の移行もVE-821で阻害されることが判明した。また、Annexin A2をノックダウンした糸球体内皮細胞においても、DNA損傷誘発後のCOL6分泌抑制を確認した。また、Western Blot法でANXA2の細胞内タンパク量が変化しないことを確認した。

右図5：Annexin A2ノックダウンによる糸球体内皮細胞のDNA損傷誘発COL6分泌の抑制。

(Mann-Whitney U検定.* p<0.05)

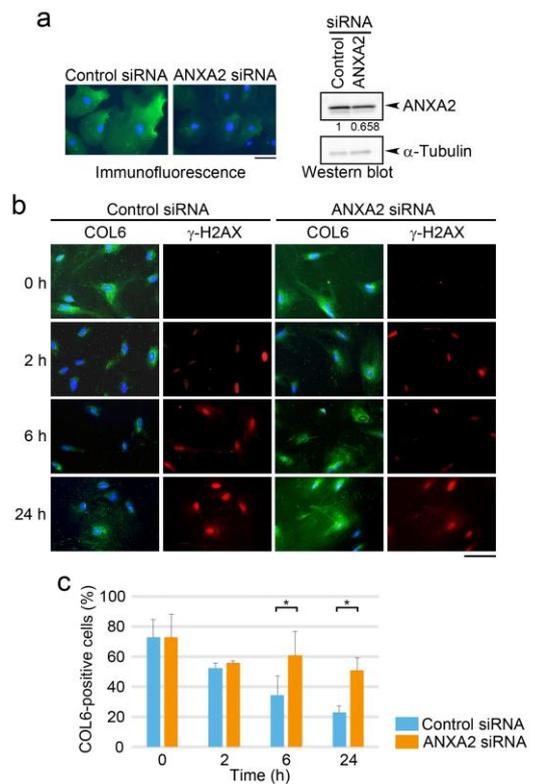


図5

している可能性を示唆した (Sci Rep. 2020; 10(1):22206. doi: 10.1038/s41598-020-79106-3) .

以上より今回実施した(1)～(3)の研究は、臨床的に問題となっている超急性期から慢性期に至る移植腎障害の進展機序の一端を新たに解明し、その分子メカニズムに対する新しい治療法の開発への道を開き、末期腎不全への進行抑制と腎不全対策としての次世代移植医療への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Okada K, Nomura-Nakayama K, Okushi Y, Okino K, Mukai K, Hayashi N, Fujimoto K, Adachi H, Yokoyama H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Changes in double-strand DNA breaks predict delayed graft function (DGF) in Japanese renal allograft recipients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 96-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-019-01793-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyatake N, Adachi H, Nomura-Nakayama K, Okada K, Okino K, Hayashi N, Fujimoto K, Furuichi K, Yokoyama H	4. 巻 15
2. 論文標題 Circulating CTRP9 correlates with the prevention of aortic calcification in renal allograft recipients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0226526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0226526	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 Adachi H, Fujimoto K, Fujii A, Yamasaki K, Okada K, Matsuura T, Okino K, Furuichi K, Yokoyama H	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-term retrospective observation study to evaluate effects of adiponectin on skeletal muscle in renal transplant recipients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-67711-1	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 Kumano S, Okushi Y, Fujimoto K, Adachi H, Furuichi K, Yokoyama H	4. 巻 25
2. 論文標題 Role and expression of non-classical human leukocyte antigen G in renal transplanted allografts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-020-01999-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii A, Sunatani Y, Furuichi K, Fujimoto K, Adachi H, Iwabuchi K, Yokoyama H	4. 巻 10
2. 論文標題 DNA damage in human glomerular endothelial cells induces nodular glomerulosclerosis via an ATR and ANXA2 pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79106-3	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 横山仁
2. 発表標題 ネフローゼ症候群:腎疾患の腎組織所見と新しい免疫抑制療法
3. 学会等名 日本内科学会講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ai Fujii, Yumi Sunatani, Kengo Furuichi, Keiji Fujimoto, Hiroki Adachi, Kuniyoshi Iwabuchi, Hitoshi Yokoyama
2. 発表標題 DNA damage in human glomerular endothelial cells induce nodular glomerulosclerosis via ATR pathways
3. 学会等名 9th CKD Frontier, Nagoya(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田圭一郎, 矢部友久, 藤井愛, 野村佳苗, 大串勇気, 沖野一晃, 向井清孝, 藤本圭司, 足立浩樹, 横山仁
2. 発表標題 二重鎖DNA損傷と移植腎機能発現に関する検討
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichiro Okada, Hitoshi Yokoyama
2. 発表標題 Changes in double-strand DNA breaks predict delayed graft function (DGF) in Japanese renal allograft recipient
3. 学会等名 56th ERA-EDTA Congress in Budapest (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ai Fujii, Yumi Sunatani, Kengo Furuichi, Keiji Fujimoto, Hiroki Adachi, Kuniyoshi Iwabuchi, Hitoshi Yokoyama
2. 発表標題 Double-strand DNA (dsDNA) damage in human glomerular endothelial cells induces collagen type VI secretion via an ATR and ANXA2 pathway
3. 学会等名 10th CKD Frontier, Nagoya (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究協力者	藤井 愛 (FUJII Ai)		
研究協力者	熊野 奨 (KUMANO Sho)		
研究協力者	岡田 圭一郎 (OKADA Keiichiro)		

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
---------	---------