

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15972

研究課題名（和文）芳香族炭化水素受容体(AhR)活性化を介した尿細管間質における炎症抑制機序の解明

研究課題名（英文）To elucidate the mechanism of anti inflammatory effect by activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway in tubulointerstitium

研究代表者

高村 武之（TAKAMURA, TAKEYUKI）

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：30814248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本邦におけるeGFR60未満の慢性腎臓病(CKD)患者は約1300万人に上るとされる。CKDの悪化により毎年約1万人に新規の透析導入が必要となっており、CKDの根治的治療の開発は急務である。本研究は芳香族炭化水素受容体(AhR)の活性化が持つ尿細管間質の炎症抑制作用を明らかにするものである。我々はC57BL/6Jマウスおよび培養尿細管上皮細胞を用いて、AhR経路を活性化した際の各種mRNAおよびタンパクの発現量に注目し検討を行った。AhRアゴニストの投与は腎臓でもAhR経路を活性化している可能性が示唆されたため現在その作用機序の解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者は約1300万人といわれ、今や腎臓病は国民病と考えられているものの腎不全の根治療法は存在せず、腎移植もドナー不足に悩まされているのが現状であり、腎機能低下の治療や進展予防に期待する社会的要望は強い。これまで明らかとなっていない、芳香族炭化水素受容体(AhR)の活性化が尿細管間質における炎症抑制に寄与している可能性があることは、新規治療法の開発につながる意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are 13 million chronic kidney disease (CKD) patients and ten thousand of them are required to start dialysis treatment every year in Japan. There is a need to develop curative treatments of CKD. This study investigated whether the activation of the AhR pathway affects CKD. Our experimental results suggested that the activation of the AhR pathway may induce the mRNA expression of CYP1A1, a major target gene of the AhR/xenobiotic responsive element pathway, increased in the kidney of the mice.

研究分野：腎臓内科

キーワード：AhR 芳香族炭化水素受容体 尿細管間質 慢性腎臓病

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

Aryl hydrocarbon receptor (AhR：芳香族炭化水素受容体)は、バクテリアからヒトまで生物界に広く存在し、ほとんど全ての細胞や組織で発現が認められる転写調節因子である。これまでは環境汚染物質であるダイオキシンや、その他の芳香族炭化水素の代謝に関連して研究が進められてきたが、現在では異物代謝のみならず免疫系を含めた細胞の多様な機能に重要な役割を果たしていると考えられており、とりわけ免疫系においては炎症の調節因子として重要であるという報告が近年相次いでいる。

我々のグループは、AhR経路の活性化が炎症性腸疾患において防御的な役割を果たすことを世界で初めて報告した。またそのメカニズムとして、AhR経路の活性化が腸管内PGE2 (Prostaglandin E2)を増加させ、炎症性サイトカインの分泌抑制を誘導することを明らかにした。その後、世界中から同様の報告が相次いでなされ、現在、AhRのアゴニストを用いた潰瘍性大腸炎に対する臨床試験が行われている。

一方で、AhR経路の活性化が腎臓に及ぼす影響に関しては一部で報告があるのみであり未だ明らかになっていない。PGE2は生体の中で最も豊富に腎臓で産生されており、さらには腎不全患者で増加していることも確認されている。またPGE2の受容体であるEP4を介した経路の活性化は糖尿病性腎症におけるタンパク尿減少や、5/6腎摘マウスにおいて腎保護的に作用するという報告もあり、PGE2を介したAhR経路の活性化が腎疾患進展予防に寄与する可能性は高いと考えられる。

慢性腎臓病患者は約1300万人といわれ、今や腎臓病は国民病と考えられているものの、腎不全の根治療法は存在せず、腎移植もドナー不足に悩まされているのが現状であり、腎機能低下の治療や進展予防に期待する社会的要望は強い。これまで明らかになっていない、AhR経路を介した腎障害の改善に関する研究が持つ意味は大きいと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿細管上皮細胞に発現するAhRの活性化が、PGE2の産生を介して炎症性サイトカインを抑制し炎症増悪や腎間質線維化を抑制するという仮説を検証することにある。またひいてはAhRを慢性腎臓病の新規治療ターゲットにするための創薬基盤を確立することである。

AhRが炎症抑制や各種免疫システムに影響を与えることは他臓器では確認されているが、腎臓では未だにcontroversialであり明らかになっていない。また腎臓におけるAhR経路の活性化とPGE2に関する検討もほとんど行われていない。一方、他臓器ではAhR経路の活性化が炎症に抑制的に作用することが示されており、既に臨床治験の段階まで進んでいる研究も認める。これらのことは、AhRを標的とした新規腎疾患治療が現実的に可能であることを示唆している。申請者は上記の点に学術的独自性と創造性があると考えている。

また本研究によって得られた知見は、国内外の学会発表、海外雑誌への論文発表という形で積極的に発信していく予定である。加えて、本研究成果は速やかな臨床応用への可能性もあり、マスメディアやインターネットを通じて、積極的に広く社会へアピールし、研究成果を還元したいと考えている。

3. 研究の方法

マウスに一側尿管結紮モデル(UUO)を作成し腎尿細管間質の炎症進展メカニズムをAhRとPGE2/EP4の観点から解明する。またAhR KOマウスを用いて同様の解析を行う。

①I3C投与による尿細管上皮細胞でのAhR-PGE2経路活性化の検討

AhRのアゴニストは複数報告されており、最も強力に活性化能を持つ物質としてTCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)がよく知られているが、ダイオキシンであり毒性が強く臨床応用は難しい。そこで我々はキャベツやブロッコリーといったアブラナ科の植物に多く含まれるI3C (indole-3-carbinol)をマウスに経口投与し尿細管上皮細胞でのAhR活性化能を検討する。

I3C 20mg/kg をWTのC57BL/6Jに5日間経口投与し、腎皮質組織を採取する。続いてRT-PCR法とウエスタンブロットを用いて、AhRの下流に存在するCYP1A1(Cytochrome P450)、COX-2(Cyclooxygenase-2)の発現量を測定する。またPGE2の測定にはELISA法を用いる。加えてAhRのアンタゴニストとして知られる α NF (α -naphthoflavone)をI3Cと同時に投与する検討も行う。

②UUOマウスを用いた検討

[UUOマウスにI3Cを投与]

検討①②から、in vivo、in vitroにおいてAhRの活性化が腎臓におけるPGE2の発現を誘導することを確認した。続いて、腎尿細管間質の線維化を誘導するために一側尿管結紮を行うとともに、I3C 20mg/kgを14日間経口投与し、尿細管間質の形態学的変化を病理学的に検討する(Masson Trichrome染色などによる組織学的な線維化の評価、およびF4/80などの免疫染色による炎症性マクロファージ浸潤の検討)。またアルブミン尿の測定、RT-PCR法とウエスタンブロットを用いた各種サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、HO-1、MPO、IL-10)と、kim-1やNgalなどの尿細管障害マーカーの測定を行う。加えて、炎症性マクロファージの浸潤、ならびにFACSによるマクロファージのプロファイリングを評価する。

[AhRノックアウトマウスにUUOを誘導した検討]

続いて、AhR経路の活性化によるUUOの炎症抑制メカニズムを検討するために(1)と同様の検討をAhRノックアウトマウスを用いて行う。

[EP4経路を阻害したうえでUUOを誘導した検討]

これまでの報告から、PGE2/EP4経路の活性化は糖尿病性腎症におけるタンパク尿減少や、5/6腎摘マウスにおいて腎保護的に作用するという報告も見られている。そこでAhR/PGE2経路による腎尿細管間質の炎症抑制にEP4が関与していることを確認するため、EP4の選択的阻害薬であるONO-AE3-208 (10mg/kg)を投与し、(1)と同様の検討を行う。

4．研究成果

・ I3C投与によるマウス腎臓および培養尿細管上皮細胞でのAhR経路活性化の検討

野生型マウスにI3C 20mg/kg を5日間経口投与して腎皮質組織を採取したのち、リアルタイムPCRで検討したところ、Control群であるPBS投与マウスに比べてI3C投与マウスではCYP1A1の発現量が増加傾向を示した。このことはAhRアゴニストの経口投与でも腎皮質のAhRを活性化する可能性を示唆している。

これまでの報告から、尿細管上皮細胞株のHK-2はAhRを発現していることが判明している。そこで上記の細胞上清中にI3Cを添加しHK-2細胞におけるCYP1A1のmRNA発現量を確認したところコントロールに比べて増加傾向を認めた。一方で、PGE2の明らかな発現増加を確認することはできなかった。

・ AhR KOマウスを用いた検討

今後検討を行っていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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