

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08711

研究課題名(和文) マクロファージの低酸素センサーPHDを標的とした腎疾患新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for kidney diseases targeting the hypoxia sensor PHD in macrophages

研究代表者

川上 貴久 (Kawakami, Takahisa)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：10722093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ(MP)の低酸素センサーであるPHDが腎疾患・炎症に与える影響を探索するため、MP特異的ノックアウトマウス(cKO)と同胞のコントロールマウスを用いて各種モデルを作成、解析した。急性腎障害や慢性腎臓病モデルでは差を認めなかったが、LPSによる全身炎症モデルでは有意に生存率が改善した。同モデルの血清、組織、同マウスの骨髄由来マクロファージを用いた解析、単離肝臓マクロファージのトランスクリプトーム解析から、cKOではMPの炎症が抑制されることが生存率改善に繋がることが示唆された。この研究結果は敗血症さらには他の炎症性疾患でMPのPHD抑制が治療へと繋がる可能性を示唆するものとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中に細菌が入ること起こる敗血症は、重度の炎症が起こることで腎臓を含む多くの臓器が障害される重症の疾患である。本研究は、白血球の一種で炎症を司るマクロファージのPHDというタンパクのはたらきを抑えることで、炎症が軽くなり、敗血症のモデルマウスの生存率を改善させることができることを示した。PHDを阻害する薬は、別の目的で既に上市されており、それらの手段によるマクロファージのPHD阻害が、敗血症や、さらには他の炎症性疾患についても臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Several models of inflammatory diseases were made by using macrophage(MP)-specific

PHD knockout mice (cKO) and siblings as the control to investigate the effects which the hypoxia sensor, PHD, in macrophages has on kidney diseases and inflammation. While no significant difference was observed in acute kidney injury and chronic kidney disease models, survival of cKO was significantly ameliorated in the systemic inflammation model treated with intraperitoneal injection of LPS. The analysis of blood, tissues, bone-marrow-derived MPs, and transcriptome of isolated MPs of liver showed that MPs in cKO had less pro-inflammatory tendency, which causes the longer survival. These results suggest PHD inhibition may be applied to clinical therapy for inflammatory diseases, including sepsis.

研究分野：腎臓病学, 自然免疫

キーワード：PHD マクロファージ 敗血症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)は腎機能障害がある閾値を超えると不可逆的に進行し、透析などの腎代替療法を必要とする末期腎不全に至る。その決定的治療法はなく、その開発に結びつく病態機序の解明が必要である。CKD の病態の中核には尿細管間質の慢性炎症がある。炎症の場合は低酸素状態に陥っており、それを感知する最も重要な分子が PHD である。PHD は低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor (HIF))を負に制御するが、低酸素状態になるとその作用が抑制され、HIF が活性化される。そして中心的な炎症細胞であるマクロファージの活性化には低酸素が関与している。また活性化したマクロファージには傷害性と修復性のものがあり、そのバランスが前者に傾いているために慢性炎症・慢性腎臓病が進行する。これらのことから、マクロファージの PHD を抑制することで、炎症が改善する可能性があると考えられた。また、PHD 阻害薬は慢性腎臓病における腎性貧血の治療薬(標的は腎線維芽細胞など)として最近上市され臨床で用いられ始めており、それが炎症に与える影響や新たな目的での臨床応用の可能性の探索にも繋がると考えられた。

### 2. 研究の目的

マクロファージの PHD 抑制が炎症(腎疾患における炎症を含む)にどのような効果をもたらすかを検証することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

Phd1,2,3 の全てをマクロファージ特異的にノックアウトしたマウスを用いて腎疾患、炎症モデルを作成し、マクロファージの PHD 抑制が、腎疾患やその炎症に与える影響を検討した。具体的には、*Phd1<sup>flox/flox</sup>*, *Phd2<sup>flox/flox</sup>*, *Phd3<sup>flox/flox</sup>*, *Lysm<sup>Cre/+</sup>* マウス(cKO)を実験群、同胞の *Phd1<sup>flox/flox</sup>*, *Phd2<sup>flox/flox</sup>*, *Phd3<sup>flox/flox</sup>*, *Lysm<sup>+/+</sup>* マウス(Cont)をコントロール群として実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 腎疾患モデル

cKO と Cont 間でベースラインの腎組織、腎機能(血清クレアチニン)に差がないことを確認した後、片側虚血再灌流傷害モデルとアデニン誘導 CKD モデルを作成し、検証した。片側虚血再灌流傷害モデルでは、腎組織傷害 qRT-PCR による遺伝子(近位尿細管障害マーカーである KIM1, NGAL, 炎症性サイトカイン、ケモカイン)発現の解析を行ったが、cKO と Cont で有意な差を認めなかった。また、アデニン誘導 CKD モデルでは、腎機能(血清クレアチニン)、尿細管障害、線維化、炎症性サイトカイン・ケモカインなどについて解析を行ったが、こちらも cKO と Cont で有意差を認めなかった。

#### (2) 全身性炎症モデル

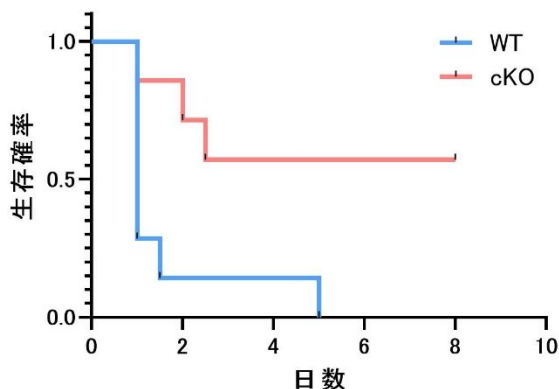
全身性炎症モデルとして、LPS 投与モデルを作成し、解析を行った。25 mg/kg の LPS を腹腔内投与し生存期間を解析したところ、cKO で有意に生存率の改善を認めた( $p = 0.0088$ ) (図 1)。LPS 投与 2・4 時間後の血中サイトカインの解析では、LPS 投与 4 時間後に IL-1 $\beta$  が cKO で有意に低下しており、TNF- $\alpha$ , IL12b, IL-18 も有意ではないが cKO で低下しており、これらの炎症性サイトカインの低下が生存率の改善に寄与していると考えられた。

炎症性サイトカインの低下がマクロファージの PHD 抑制の直接の効果であるか確認するため、*in vitro* の系で解析を行った。まず、マウス由来マクロファージの株化培養細胞

である RAW 細胞を用い、PHD 阻害薬(daprodustat)の投与が LPS 刺激によるサイトカイン発現に及ぼす影響を検討した。まず、PHD 阻害薬 24 時間投与で、GAPDH, VEGF-A, GLUT1 などの HIF 標的遺伝子の発現増加を認め、PHD 阻害薬による HIF の活性化が示唆された。LPS 刺激 2 時間後では、PHD 阻害薬の濃度依存性に TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2, CXCL2 の mRNA 発現が増加した。また LPS 刺激 4 時間後では、PHD 阻害薬の濃度依存性に IL12-b, IL-18, CCL2, CXCL2 の発現が増加した。これらは *in vivo* で炎症性サイトカインが抑制された所見と合致するものであった。また興味深いことに、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の LPS 刺激時の発現が、PHD 阻害薬濃度依存性の増加を認め、これも炎症抑制の傾向を示すものであった。

次に、cKO, Cont マウスから骨髓由来マクロファージを作成し解析を行った。LPS 刺激により各種サイトカインの発現は増加するが、cKO, Cont の比較で、IL-12b, IL-18 の発現は cKO で増

図 1



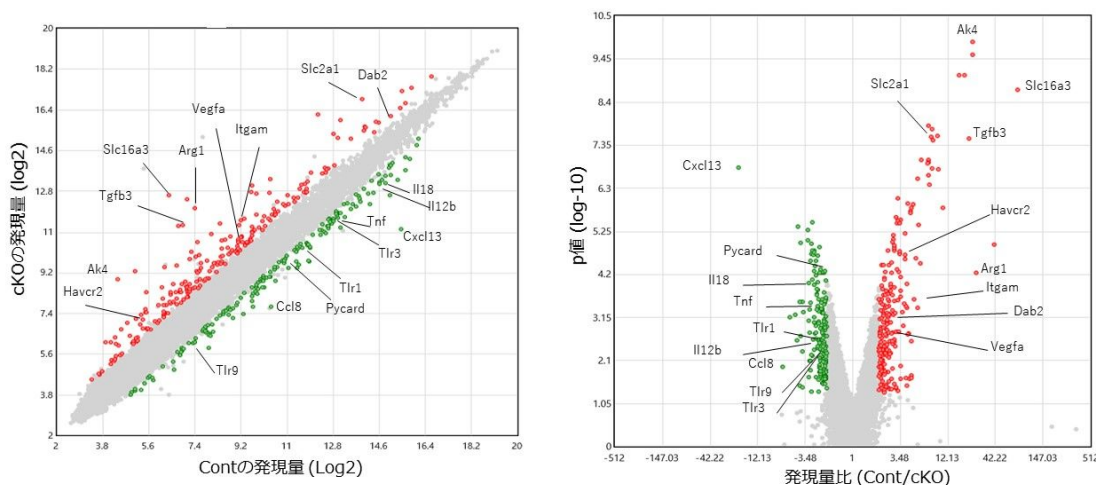
加し、RAW 細胞や *in vivo* と合致する所見を認めたが、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 は cKO でむしろ軽度増加し、*in vivo* とは異なる結果となった。

このように *in vitro* の解析では一部矛盾する所見を認め、*in vivo* の試料を用いた直接的な解析の方が好ましいと考えられ、LPS 投与 2・4 時間後に採材した各種臓器の遺伝子発現を解析した。中でも肝臓は、cKO で IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12b、IL-18 の発現の有意な減少を認め、TNF- $\alpha$  も減少傾向であり、生存率の改善と合致する所見であった。また、肝臓は体内で最多のマクロファージを有する臓器であり、そのマクロファージが全身に与える影響も大きいと考えられることと併せ、*in vivo* のマクロファージの解析には肝臓のマクロファージが適当であると考えた。

そこで、LPS 投与前・2 時間後の cKO・Cont マウス(各群 n=3)の肝臓から、FACS でマクロファージを単離し、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。解析には Clariom S という 1 つの遺伝子に対し 10 個のプロープで検出し、RNA-seq の shallow sequencing と同等の 2 万以上の遺伝子解析が可能で、低コストのアレイを用いた。

cKO では Cont に比して、ほぼ全ての解糖系酵素、Slc2a1 (GLUT1)、Vegfa、Bnip3 などの HIF 標的遺伝子の発現が有意に多く、HIF の活性化が強く示唆された。また、LPS 投与 2 時間後の肝臓マクロファージでは、Cont と cKO の比較で発現量比が 2 倍以上、 $p < 0.05$  で有意差のあるものを 391 個認め、Cont で発現が多い (cKO で発現が少ない) 遺伝子は 170 個、cKO で発現が多い遺伝子は 221 個であった(図 2)。Cont に比して cKO で発現が多かったものの中には、炎症抑制性マクロファージのマーカーである ARG1 や炎症抑制作用のある TGF- $\beta$ 3、TIM-3 があり、cKO のマクロファージは炎症抑制の性質があることが示唆された。さらに、Cont に比して cKO で発現が少なかったものとして、TNF- $\alpha$ 、IL-12b、IL-15、IL-18 などの炎症性サイトカインや CCL2、CC7、CCL8、CXCL13 などの炎症性ケモカインがあり、実際に cKO のマクロファージでは炎症を促進する因子の発現が抑制されていることが示された。

図2



さらに、cKO では Pycard という ASC をコードする遺伝子発現が少なかった。IL-1 $\beta$ 、IL-18 は細胞内のインフラマソームによって活性化型となった後に細胞外に放出されて炎症を誘導するが、ASC はこのインフラマソームの構成因子である。Pycard (ASC) の発現減少は、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現には差がなかったが血中 IL-1 $\beta$  が cKO で少なかったことを説明するものである。

以上の解析から、マクロファージにおける PHD 阻害はマクロファージを炎症抑制性に傾け、LPS による炎症を抑制することが示された。LPS 投与モデルは敗血症モデルであり、PHD 阻害や阻害薬が敗血症の治療となる可能性が示唆された。さらに他の炎症性疾患についても効果をもつ可能性があり、その発展性を期待できることを示す研究となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 宮本彩子、川上貴久、川嶋聡子、池谷紀子、福岡利仁、岸本暢将、駒形嘉紀、要伸也
2. 発表標題 マクロファージ特異的PHDノックアウトはLPSによる全身性炎症を改善する
3. 学会等名 第65回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	要 伸也  (Kaname Shinya)  (60224581)	杏林大学・医学部・教授    (32610)	

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