

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08731

研究課題名（和文）CCN2機能制御による慢性・急性腎障害の新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutics for chronic and acute kidney injury through the regulation of CCN2 function

研究代表者

井上 勉（Inoue, Tsutomu）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30406475

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）：慢性腎臓病は、進行すると透析が必要になる他、心血管疾患や感染症のリスク因子であり、日本の主要な死因に関連する重要な基礎病態である。現時点では進行を阻止する有効な手段はなく、治療薬は代表的なunmet medical needsとされている。慢性腎臓病の進行は、組織学的には腎臓の線維化で特徴付けられる。障害腎では、尿細管上皮細胞がCCN2を産生し、腎線維化を進行することが知られている。本研究では、CCN2がインテグリンを介して尿細管上皮細胞のFAK（Focal Adhesion Kinase）をリン酸化し、最終的に -カテニンが転写因子として作用することで、腎線維化が進行する機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器の線維化は、腎臓に限らず多数の臓器における慢性進行性の機能低下に関わる重要な病態である（例：肺線維症、皮膚硬化症、慢性心不全、肝硬変症）。その多くの病態において、CCN2が重要な液性因子であることが知られている。本研究の成果は、慢性腎臓病に限らない臓器線維化症に対する、新規治療薬開発に関わる重要な知見を提供する。さらに、本研究で腎線維化抑制効果を発揮したデコイペプチドは、CCN2-インテグリン相互作用の阻害効果を発揮することが明らかであり、同protein to protein interaction阻害薬として、具体的な慢性腎臓病治療薬のリード化合物となり得る。

研究成果の概要（英文）：Chronic kidney disease (CKD), when it progresses, necessitates dialysis and is a risk factor for cardiovascular disease and infections, making it a significant underlying condition related to major causes of death in Japan. Currently, there are no effective means to halt the progression of CKD, and the lack of appropriate drugs for its treatment is considered a prime example of unmet medical needs. The progression of CKD is histologically characterized by kidney fibrosis. In damaged kidneys, tubular epithelial cells are known to produce CCN2, which promotes kidney fibrosis. This study elucidated the mechanism by which CCN2 phosphorylates FAK (Focal Adhesion Kinase) in tubular epithelial cells via integrins, ultimately causing -catenin to act as a transcription factor and advance kidney fibrosis.

研究分野：腎臓学

キーワード：慢性腎臓病 線維化 CCN2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) とは腎機能が低下した状態を指す。進行して透析となるばかりではなく、脳・心血管疾患のリスク因子であり、さらには易感染性を介して重症感染症の発症率も増加させることが明らかであるため、本邦では悪性新生物を除く主要な死因に関連する基礎病態である。長期間持続する蛋白尿や糖尿病、高血圧症が主な原因であるが、近年では急性腎障害後に進行する後遺症としての CKD も注目されており、集中治療室での短期的な生命予後だけでなく、再入院率や遠隔生命予後をも悪化させる重大なリスク因子と考えられている。高齢化や医療の高度化・複雑化に伴い CKD の罹患率は増加傾向にあるが、治療は降圧や血糖管理、減塩を中心とした食事療法などのみで特異的な介入手段がない。

CKD の組織像は糸球体硬化、尿細管萎縮、間質の線維化であり、腎臓は機能しているネフロンを失いながら膠原線維に置換されていく。腎線維化は原疾患を問わず慢性腎臓病の進行に関わる common pathway であり、疾患横断的な治療ターゲットとして注目されている。腎臓に限らず臓器線維化を促進する因子として古くから TGF- β (transforming growth factor- β) が知られているが、正常組織の維持や免疫系にも多面的な役割を担っていることから、慢性疾患への長期介入には課題が多い (Varga, J. et al. Nat Rev Rheumatol 2009)。

我々は、蛋白尿が尿細管上皮細胞を活性化し CKD が進行する機序を、慢性炎症巣の形成と線維化に関わる各種サイトカインに焦点を当てて研究を進めてきた (Clin Exp Nephrol 2015; Kidney Int 2015; J Am Soc Nephrol 2010; FASEB J 2003 他)。HGF (hepatocyte growth factor) の抗 TGF- β 作用が注目された際に、腎臓での治療効果を検証する過程で、活性化・障害尿細管上皮細胞が産生する CCN2 が腎線維化に重要な役割を果たすことを見いだした (BBRC 2002; FASEB J 2003; J Am Soc Nephrol 2005; Am J Pathol 2006; J Am Soc Nephrol 2008)。さらに我々は Cre/loxP システムを用いて尿細管上皮細胞特異的に CCN2 をノックダウンすると、マウス腎障害モデルで間質の線維化が約 70%抑制されることを確認しており、CCN2 が CKD の有力な治療ターゲットとなることを確信している。

CCN2 は臓器線維化に作用するのみではなく、細胞増殖や細胞運動にも関与することが知られており、完全に機能を欠失すると致死的になることから、創傷治癒や生存に必須の因子であると予想される。しかし現在まで CCN2 の受容体は同定されておらず、線維芽細胞の周囲間質に分布し、フィブロネクチンなどの細胞外基質とインテグリンなどの接着因子とを仲介する matrixcellular 蛋白として作用すると考えられている (Kennedy L, et al. Exp Cell Res 2007)。

2. 研究の目的

前述の様な学術的背景を踏まえ、CKD の治療に CCN2 の機能制御を試みる場合は、余剰な臓器線維化作用のみを特異的に長期間抑制することが必要である。これまでの我々の検討結果からは、CCN2 が FAK (Focal Adhesion Kinase) のリン酸化を介して転写因子としての β -catenin を制御し、細胞形質の変化を生じている機序が強く示唆されている。そこで本研究では、FAK リン酸化部位および CCN2 が線維化に作用する際のシグナル伝達系について、CCN2 の受容体を含めた作用経路の同定を目的とする。

3. 研究の方法

CCN2 ノックアウトマウスが胸郭奇形による出生後致死となるため、その役割を *in vivo* で検討することは困難とされてきた。我々は CCN2 の各モジュールを欠損した CCN2 発現ベクターを作成し、培養細胞を用いて線維化に関わる機能モジュールを検討、第 4 モジュールが重要であることを突き止めた。さらに Cre リコンビナーゼ活性下で第 4 モジュール欠損変異型 CCN2 を発現する遺伝子改変マウス (CCN2Ex5^{fx/wild}) を作出した。そこで本研究では、以前から我々が利用している γ GT (γ -glutamyl transpeptidase).Cre マウスと交雑することで、尿細管上皮細胞特異的にモジュール 4 を欠損した CCN2 を発現するマウス (CCN2Ex5^{-/-}マウス) を作成し、Wild type マウスと比較する事で、CCN2 モジュール 4 を介した腎線維化機序の詳細を明らかにする。また、各マウスから初代皮膚線維芽細胞を調製し *In vitro* の実験に用いる。FAK のリン酸化部位の同定は、各リン酸化部位 (Tyr576/577, Tyr925, Tyr397) に特異的な抗体を購入し、western blot にて検討をおこなう。

FAK のリン酸化に関わる CCN2 受容体としてはインテグリンが有力である。CCN2/インテグリン/FAK に関連する既報はいずれも非上皮系で腎臓以外であり、新規に同定する必要がある。既報

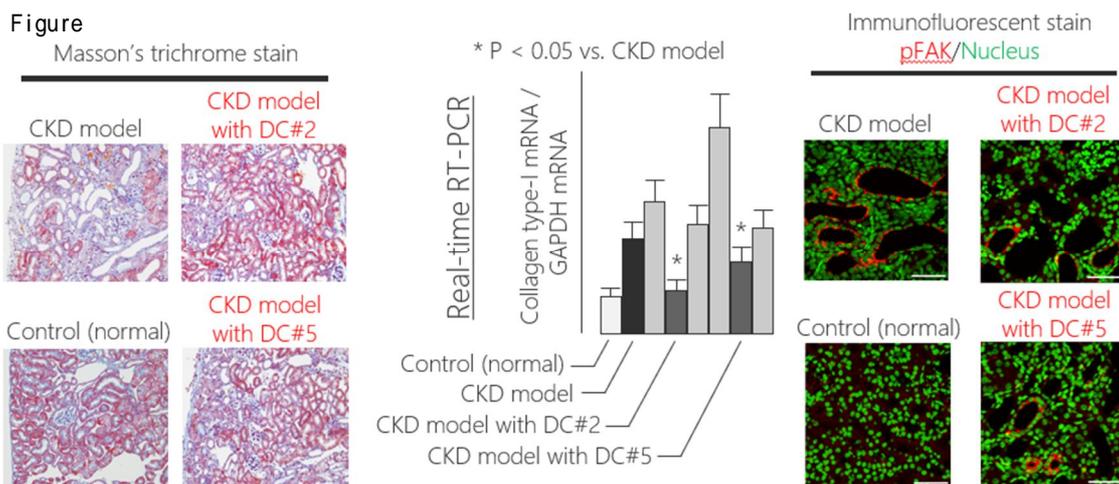
(Lin J, et al. J Immunol 2012) を参考に renal time RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) を用いて各 CKD モデルマウス (Wild、CCN2^{-/-}、CCN2Ex5^{-/-}) と培養細胞におけるインテグリンサブユニットの発現プロファイリングを行い、腎線維化に関わる CCN2 受容体を同定する。CCN2/インテグリンの相互作用は必ずしも RGD motif 依存性ではないと推測されており、CCN2 の一次構造から結合部位 (治療ターゲットとしての阻害部位) が推測できない。そこで第 4 モジュール全長を対象に複数のデコイペプチドを作成、CKD モデルマウスに投与して治療効果を確認する。

以上の検討から CCN2/FAK に関わるシグナル伝達系の同定が叶った後、CCN2Ex5^{-/-} マウスから調製した初代皮膚線維芽細胞に whole CCN2 発現ベクターを導入し、想定した経路が wild マウスと同様に作動するかを western blot で確認する。さらに、既に採取済みの各 CKD モデルマウス (Wild、CCN2Ex5^{-/-}) の検体を用いて、免疫染色と western blot で FAK のリン酸化の細胞内分布を検討する。加えて CCN2Ex5^{-/-} マウスに新たに各 CKD モデルを作成し、whole CCN2 発現ベクターを大腿の筋肉に electroporation 法で導入する。CKD 進行速度を比較し、第 4 モジュールの欠損が CCN2Ex5^{-/-} マウスにおける腎線維化遅延効果の一義の原因であることを確認する。

4. 研究成果

CKD モデルマウス (Wild、CCN2Ex5^{-/-}) および培養細胞を用いた検討で、FAK/Akt/GSK3β/β-catenin の axis が最も有力であることを明らかにした。次に、HK-2 細胞と RT-PCR を用いて、同細胞に発現している integrin の subunits を同定した (αvβ1)。同 integrin は、腎における CCN2 の受容体候補であり、かつ、抗線維化治療の介入点として有力であるため、αv subunit に対する特異抗体を用いて CCN2/integrin/FAK シグナルの阻害実験を行った。結果、抗αv integrin 抗体で有意な阻害作用が確認された。さらに、障害機序が異なる急性/慢性腎臓病モデルマウスを用いて、腎障害機序にかかわらず FAK のリン酸化が亢進する事を確認した。我々はその中でも、腎線維化の進行に平行して持続的なリン酸化が生じている Tyr397 に注目した。さらに、CCN2 モジュール 4 欠損線維芽細胞に whole CCN2 (wild type CCN2) 発現ベクターを導入することで、同細胞の線維化促進形質が正常化することも確認できた。

我々が同定した一連の経路の何れかを抑制することで、慢性腎臓病の治療が可能となる可能性が極めて高くなったため、計画していた複数のデコイペプチド (DCs) を作成、CKD モデルマウスに投与して治療効果 (DC#2 および DC#5) を確認した。(下図、Figure)



さらに今回同定された細胞内シグナル伝達経路に寄与する各因子について、治療薬となり得る阻害薬候補の検討をおこなった。3 つの異なるマウス慢性腎臓病モデル (片側尿管結紮モデル、アデニン腎症モデル、片側虚血再灌流モデル) にβ-catenin 阻害薬である ICG-001 を投与して経時的に腎臓を摘出 (最長 2 か月間) 腎線維化の進行度合いを組織学的に評価し、さらに RT-PCR で関連遺伝子群 (細胞外基質および線維化促進性サイトカイン類) の発現変化を検討した。

作成した DC の中で 2 つの配列は有意に FAK リン酸化を抑制し伴って CKD モデルマウスに治療効果を発揮した。一方、ICG-001 は我々の検討範囲では有意な治療効果が確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Amano Hiroaki, Inoue Tsutomu, Kusano Takeru, Okada Hirokazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Analysis of the Function of CCN2 in Tubular Epithelium Cells with a Focus on Renal Fibrogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 411 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2744-0_28	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 Takenaka Tsuneo, Hasan Arif, Marumo Takeshi, Kobori Hiroyuki, Inoue Tsutomu, Miyazaki Takashi, Suzuki Hiromichi, Nishiyama Akira, Ishii Naohito, Hayashi Matsuhiko	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Klotho supplementation attenuates blood pressure and albuminuria in murine model of IgA nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000002845	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 Fukaya Daichi, Inoue Tsutomu, Kogure Yuta, Kajiyama Hiroshi, Ishizawa Keisuke, Seto Takeru, Hasegawa Hajime, Mimura Toshihide, Okada Hirokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Tocilizumab-induced immunocomplex glomerulonephritis: a report of two cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 318 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-020-00478-6	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 Bane Octavia, Mendichovszky Iosif A., Milani Bastien, Dekkers Ilona A., Deux Jean-Francois, Eckerbom Per, Grenier Nicolas, Hall Michael E., Inoue Tsutomu, Laustsen Christoffer, , Prasad Pottumarthi V.	4. 巻 33
2. 論文標題 Consensus-based technical recommendations for clinical translation of renal BOLD MRI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 199 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10334-019-00802-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 該当する

1. 著者名 Inoue Tsutomu, Luo Yankun, Seto Takeru, Suzuki Hiromichi, Okada Hirokazu	4. 巻 41
2. 論文標題 Glomerular solidification is associated with nephritis-related clinical parameters in IgA nephropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Renal Failure	6. 最初と最後の頁 893 ~ 898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/0886022X.2019.1665545	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 該当する

1. 著者名 Inoue Tsutomu, Kusano Takeru, Amano Hiroaki, Nakamoto Hidetomo, Okada Hirokazu	4. 巻 517
2. 論文標題 Cellular communication network factor 2 (CCN2) promotes the progression of acute kidney injury to chronic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 96 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.024	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 深谷大地、井上勉、天野博明、岡田浩一
2. 発表標題 CCN2/CTGFはintegrin/FAKを介して腎線維化を進行する
3. 学会等名 日本分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷大地、井上勉、天野博明、岡田浩一
2. 発表標題 腎線維化の進行にはCCN2-integrinを介したFAKのリン酸化が関与する
3. 学会等名 日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷 大地, 天野 博明, 井上 勉, 草野 武, 岡田 浩一
2. 発表標題 CCN2/CTGFはintegrin/FAKを介して腎線維化を進行する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Fukaya, Tsutomu Inoue, Hiroaki Amano, Yusuke Watanabe, Hirokazu Okada
2. 発表標題 CCN2/CTGF Causes Renal Fibrosis Progression Through the Integrin/FAK Signal Pathway
3. 学会等名 Kidney Week 2021, Annual Meeting of American Society of Nephrology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Amano, Tsutomu Inoue, Hirokazu Okada
2. 発表標題 CCN2 Module IV-Derived Decoy Peptides Attenuate Renal Fibrogenesis Through Inhibition of FAK Pathway in the Tubular Epithelium
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野博明、井上勉、草野武、岡田浩一
2. 発表標題 CCN2 module 4はFAKのリン酸化を介して腎線維化を促進する
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019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	岡田 浩一 (Okda Hirokazu) (60233342)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

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