

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16009

研究課題名（和文）急性腎障害から慢性腎臓病への進展における再生尿細管の線維化促進メカニズムの解明

研究課題名（英文）The role of regenerative tubules in progression from acute kidney injury to chronic kidney disease

研究代表者

松下 幸平（Matsushita, Kohei）

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号：60777796

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（CKD）の発症要因の一つとして、急性腎障害（AKI）からCKDへ移行するAKI to CKDという現象がある。AKIの主要な標的である尿細管上皮細胞は再生能力を有するが、その再生に異常が生じた場合、尿細管は線維化促進性の形質を獲得する。本研究では再生異常の生じた尿細管の線維化促進メカニズムを明らかにすることを目的とした。腎虚血再灌流モデルラットを用いた実験結果により、CD44が再生異常を来した尿細管に線維化に先立って発現すること、さらにCD44は尿細管の細胞外基質の分泌を誘導する可能性を示した。本研究により尿細管による腎線維化促進メカニズムの一端を明らかにすることができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病（CKD）は国民の10%以上が罹患する国民病であり、CKDの本態である腎線維化のメカニズム解明は重要な課題である。本研究結果は急性腎障害後に再生異常の生じた尿細管においてCD44が細胞外基質の産生を誘導する可能性を示した。これまでの国内外の研究により、再生異常を来した尿細管は線維芽細胞を活性化して間接的に線維化に寄与することが示されている。本研究結果は尿細管による細胞外基質産生の可能性を示しており、既知の知見とは異なる側面から腎線維化メカニズムの一端を明らかにすることができたと考えている。よって、本研究成果はCKDの新しい予防法および治療法の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Renal tubular epithelial cells (TECs) have regenerative capacity, whereas maladaptive repair of TECs after acute kidney injury (AKI) leads to fibrosis, resulting in chronic kidney disease (CKD). During AKI to CKD progression, failed-repair TECs acquire the ability to promote fibrosis. The purpose of this study is to investigate the role of failed-repair TECs in fibrogenesis. The results of this study suggested that CD44 was expressed in failed-repair TECs after AKI prior to fibrosis, and induced production of extracellular matrix in failed-repair TECs. Since fibrosis is a common pathway of development of CKD, the results of this study could contribute the development of novel methods for treatment and prevention of CKD.

研究分野：毒性病理学

キーワード：急性腎障害 慢性腎臓病 腎線維化 CD44 レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は国民の 10%以上が罹患する国民病であるが、現在 CKD に対する有効な治療法はない。CKD の原因は様々であるが、CKD に至る共通経路は間質の線維化であるため、腎線維化のメカニズムを理解することは新規の治療法および診断バイオマーカーの開発に繋がる可能性がある。

CKD の発症要因の一つとして、これまで一過性の病態であると考えられていた急性腎障害 (AKI) から CKD へ移行する AKI to CKD という現象がある。AKI の主要な標的である尿細管上皮細胞は再生能力を有しており、尿細管壊死による AKI が生じた際、壊死した細胞に隣接する尿細管は脱分化して再生尿細管となり、遊走・増殖して死細胞の脱落により生じた空隙を補填し、その後正常な尿細管に再分化して組織は修復される。一方、この再生プログラムが何らかの異常を来した場合、再生尿細管は線維化促進性の形質を獲得し、CKD への進展の起点となることが分かってきた。よって、AKI から CKD への進展過程における再生尿細管の役割を詳細に理解することは、腎線維化メカニズムの解明へ向けた有効なアプローチになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は CKD の病態形成における再生尿細管の特徴を明らかにし、その線維化促進メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

6 週齢雄性 SD ラットに 30 あるいは 60 分の片側腎虚血再灌流処置を施し、1、3、5、7、14 および 28 日後に、対照群には疑似処置を施して 28 日後に剖検を行った (各群 n=5)。剖検時に腎臓を採取して各解析に供した。

4. 研究成果

再生異常の生じた尿細管の特徴

シリウスレッド染色標本により腎線維化を評価した結果、60 分群の術後 14 日以降に線維化面積の有意な増加が認められた (図 1)。HE 染色による病理形態観察では、30 および 60 分群ではともに 1 日に尿細管壊死が認められた。30 分群では 3 日から好塩基性で cuboidal な細胞質を有する再生尿細管が認められ、28 日にかけて組織が修復される様子が観察された (図 2)。一方、60 分群では 3 日以降に高度に拡張した尿細管が多数観察され、線維化病変内では萎縮した尿細管も観察された (図 2)。細胞増殖マーカー bromodeoxyuridine および DNA 損傷マーカー H2AX の免疫染色では、各因子に陽性を示す尿細管の数が 30 分群では 1 日に一過性に上昇したことに対し、60 分群においてはそれらの発現上昇が 3 日まで遅延した。また 60 分群では細胞周期停止マーカー p21 に陽性を示す尿細管が 3 日に一過性に認められ、細胞老化マーカー β -galactosidase に陽性を示す尿細管が 7 日以降に認められた。

以上、AKI 後の転機が 30 分群では修復、60 分群では線維化であったこと、またそれぞれの群では AKI 後の尿細管の形態や再生異常に関わるとされる種々の因子の発現動態が異なっていたことから、60 分群の尿細管では AKI 後に再生異常が生じていると考えられた。また再生異常の生じた尿細管は DNA 損傷応答による細胞周期停止を経て細胞老化に至ることが示唆された。

再生異常の生じた尿細管の病態生理学的な意義

対照群の正常尿細管および 60 分群・28 日の線維化病変における拡張/萎縮尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、マイクロアレイを行った。発現上昇を示した因子のうち CD44 に着目し、免疫染色によりその発現動態を検索した。その結果、CD44 は 60 分群の 3 日以降における拡張/萎縮尿細管の細胞膜に発現を認めた (図 3)。パスウェイ解析では CD44 は線維化関連因子の上流因子として抽出された (図 4)。CD44 の下流因子のうち fibronectin 1 (*Fn1*) に着目し、*in situ* hybridization および免疫染色を実施したところ、*Fn1* mRNA は拡張/萎縮尿細管の細胞質内に発現が亢進していたことに対し、フィブロネクチンタンパクはこれらの尿細管の周囲間質に沈着していた (図 5)。

以上より、再生異常の生じた尿細管は CD44 発現を介して細胞外基質を産生・分泌し、腎線維化に寄与している可能性が示唆された。

得られた成果と今後の展望

これまでの結果から、再生異常の生じた尿細管の腎線維化における病態生理学的役割の一端を明らかにすることができた。さらに CD44 をはじめとした種々の因子の検索結果から、尿細管の再生異常は AKI の直後から生じることも明らかとなり、実験条件下においてそのタイミングを同定することができた。今後は AKI 直後の再生異常の生じた尿細管の特徴を詳細に解析することにより、AKI to CKD のメカニズム解明検討および予測バイオマーカーの探索を行う予定である。

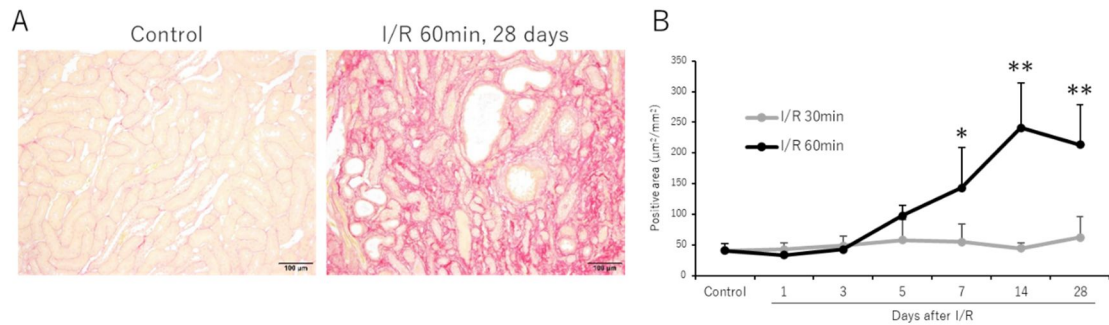


図1. 虚血再灌流障害 (I/R) モデルラット腎臓における線維化の評価。
 (A) シリウスレッド染色の組織像。(B) シリウスレッド陽性面積の画像解析。
 *, **: $p < 0.05, 0.01$ 。

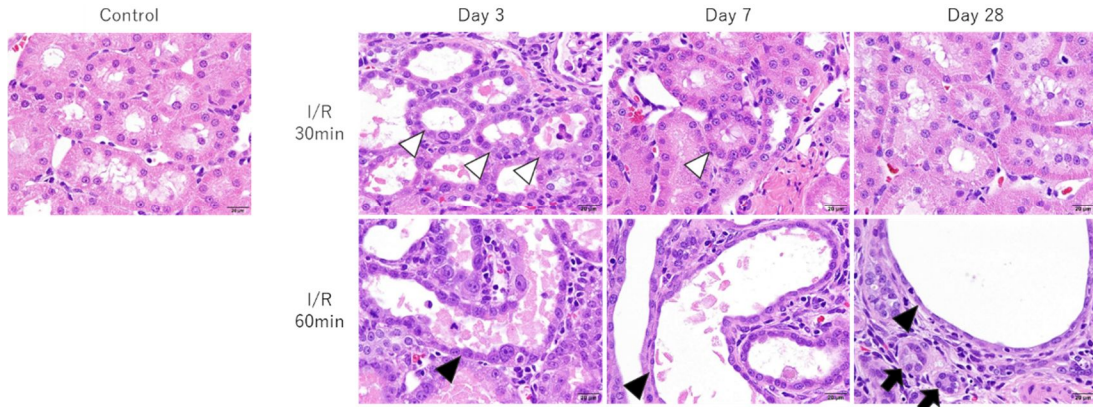


図2. HE 染色標本における虚血再灌流障害 (I/R) 後の尿細管の形態変化。白矢頭：再生尿細管。黒矢頭：拡張尿細管。黒矢印：萎縮尿細管。

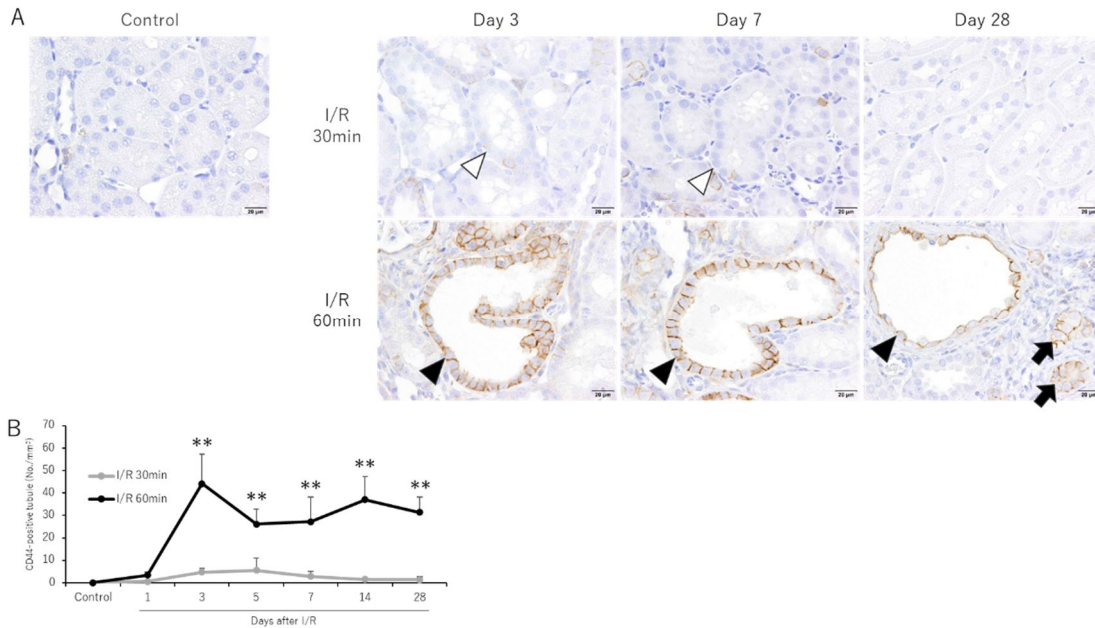


図3. 虚血再灌流 (I/R) 後の CD44 の発現。(A) CD44 免疫染色。白矢頭：再生尿細管。黒矢頭：拡張尿細管。黒矢印：萎縮尿細管。(B) CD44 陽性尿細管数の推移。**: $p < 0.01$ 。

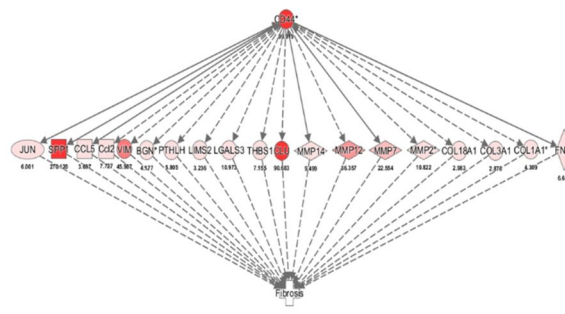


図4. マイクロアレイデータを用いたパスウェイ解析。

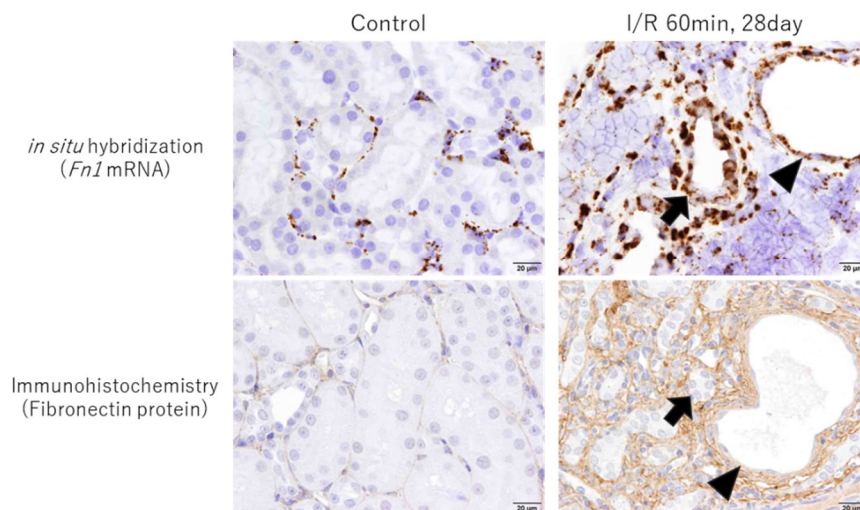


図5. Fibronectin1 (*Fn1*) mRNA およびフィブロネクチンタンパクの局在解析。黒矢頭：拡張尿細管。黒矢印：萎縮尿細管。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松下幸平
2. 発表標題 薬剤性腎障害の可逆性を予測する新規バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第143回日本薬学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松下幸平
2. 発表標題 腎障害の慢性化メカニズムに関する研究：安全性評価への応用を目指して
3. 学会等名 第3回医薬品毒性機序研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松下幸平、豊田武士、山田貴宜、森川朋美、小川久美子
2. 発表標題 急性腎障害から慢性腎臓病への進展におけるCD44の役割
3. 学会等名 第37回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松下幸平、豊田武士、山田貴宜、森川朋美、小川久美子
2. 発表標題 腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下幸平、豊田武士、山田貴宜、森川朋美、小川久美子
2. 発表標題 急性腎障害から慢性腎臓病への進展を早期に予測する新規評価分子の探索
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下幸平、豊田武士、山田貴宜、森川朋美、小川久美子
2. 発表標題 慢性腎臓病における再生機構の破綻した尿細管による線維化促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第2回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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