

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17697

研究課題名（和文）慢性腎臓病における酸素状態の変化と、酸素勾配の生物学的意義の検討

研究課題名（英文）Examination of biological meaning of change in oxygen status and oxygen gradation in chronic kidney disease

研究代表者

平川 陽亮（Hirakawa, Yosuke）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10780736

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）：本研究で、申請者は培養尿細管細胞における酸素勾配の存在の意義について検討した。申請者は培養尿細管細胞における、酸素勾配を有する培養系を確立し、低酸素への細胞の反応である低酸素応答因子の挙動について検討した。均一な酸素状態においては、低酸素応答因子は低酸素であるほど発現が増加するが、酸素勾配を有する場合は極度の低酸素下では低酸素応答因子の発現がかえって減少する現象が認められた。この現象の理由としてpHが重要であることを発見し、低酸素応答因子の発現には酸素と酸塩基平衡の両者が密接に関与することを提唱した。この結果は学術論文として発表した(Physiol Rep. 2021 ;9:e14689)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病は未だ根治が得られていない疾患である。慢性腎臓病の進行には腎臓における低酸素が密接に関与することが既に知られているが、生体内において、実際にどの部位が低酸素を生じており、そして生体内で低酸素がどのような影響をもたらすのかは未だ明らかになっていない。申請者は、生体内酸素イメージング法を用いて生体の腎臓において酸素勾配が存在することを明らかにしており、これまでの培養細胞を用いた結果が正しく生体内の事象を模しているかに疑問を持った。本研究は、より生体を模した細胞の培養法を用いた検討で、従来の培養細胞とは異なる結果が得られており、今後の培養細胞を用いた検討のあり方に一石を投じるものである。

研究成果の概要（英文）：In this research, the importance of oxygen gradient in cultured renal tubular cells were examined. The applicant established culture method of tubular cells which contained oxygen gradient, and examined distribution of hypoxia-inducible factor (HIF). It is widely known that in homogenous oxygen tension, HIF accumulates inversely correlated to oxygen tension. However, the applicant found that HIF decreased in extreme hypoxia near anoxia, and also found that low pH attenuated HIF accumulation in extreme hypoxia. Combined together, it was proposed that both oxygen status and acid-base balance are closely involved in the accumulation of HIF. These results were published as a paper(Physiol Rep. 2021 ;9:e14689).

研究分野：腎臓内科学

キーワード：低酸素 低酸素応答因子 尿細管細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は国民の 13%が罹患する生活習慣病であり、末期腎不全のみならず心血管疾患のリスクファクターである。末期腎不全医療としての血液維持透析に加え、心血管疾患が日本の医療経済に及ぼす影響は多大であり、その対策が急務である。既存の慢性腎臓病対策として、血圧、血糖(糖尿病患者の場合)、蛋白尿などへの加療が重要であるが、これらによっても腎臓病の進行は十分には抑えられず、慢性腎臓病には新たな治療戦略が必要である。

腎臓は生体内で低酸素に晒されやすく、また尿細管細胞の低酸素が腎臓病の進行に深く関わる(1, 2)。近年では、低酸素に対する細胞応答のマスターレギュレーターである低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor: HIF)の活性化薬の臨床研究が進んでおり、低酸素に対する加療が今後慢性腎臓病進行の抑制戦略として発展すると期待されている。一方、低酸素の検出方法は限られており、動物実験レベルですら、臓器内の生体内の低酸素を精密に描出する方法は確立していない。申請者は、これまでりん光という発光現象の寿命に酸素依存性がある特性を活かし、りん光を用いて腎の細胞内の酸素状態を定量的に評価する方法を開発し、生体内で尿細管に酸素勾配が存在することを見出した(3, 4)。この研究を進展させ、申請者は腎疾患における低酸素の意義をより深く解明したいと考えた。

2. 研究の目的

慢性腎臓病における酸素勾配の存在の生体内での実証と、その生物学的な意味の検討

(i) 慢性腎臓病における、生体内での低酸素及び酸素勾配の実証

申請者は既に生体内では腎臓において酸素勾配が生じることを示したが、病腎において酸素勾配が続いて存在するか否か、あるいは低酸素が生じるとして、酸素勾配が増大するのか縮小するのかといった点についての検討は未だ行われていない。このため、(ii)にて検討する酸素勾配の生物学的意義について、生体内での慢性腎臓病の進行との関連について検討するため、慢性腎臓病動物モデルにおける酸素勾配について検討を行う。

(ii) 培養細胞における、酸素勾配が低酸素応答に与える影響の検討

申請者は生体内で酸素勾配が存在することを示し学術論文として報告しているが、その生物学的意義については示せていない。このため、低酸素に対する細胞応答のマスターレギュレーターである低酸素応答因子(Hypoxia-inducible factor:HIF)について、酸素勾配の存在がその分布に変化を来すかを検討するため、酸素勾配を有する培養系を確立し、検討を行う。

(iii) 尿からのヒト尿細管細胞の取得と低酸素応答の検討

慢性腎臓病においては、動物モデルとヒト疾患の間に乖離があることが大きな問題と考えられており、本研究で得られた成果をヒト検体で実証することは重要である。他方、腎臓サンプルのヒトからの採取は大きな侵襲があり、腎臓そのもののサンプルを使用することはできない。申請者は、ヒト尿細管細胞が尿中に逸脱することを踏まえ、ヒト尿検体から尿細管細胞を抽出し遺伝子解析などを行うことで、ヒト尿細管細胞での低酸素応答が実証できないか検討することを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(i) 慢性腎臓病における、生体内での低酸素及び酸素勾配の実証

本検討は群馬大学理工学府との共同研究として行った。慢性腎臓病モデルとしては糖尿病性腎臓病モデルを採用し、KKaY マウスを用いた。対照としては KK マウスを用いた。りん光色素 BTP を水溶化した水溶性りん光プローブを経静脈的に投与し、血中及び尿中のりん光寿命から酸素分圧を測定した(5)。

(ii) 培養細胞における、酸素勾配が低酸素応答に与える影響の検討

培養細胞における検討は特に記載のない限りヒト尿細管不死化細胞である HK2 細胞で行った。10cm ディッシュ上に HK2 細胞を培養し、酸素勾配の形成には丸型カバーガラス(直径 15mm)を用いた。具体的には、一度カバーガラス上に HK2 細胞を培養し、片面に HK2 細胞が付着したカバーガラスを反転させカバーガラスディッシュに圧着させることで、カバーガラスとカバーガラスディッシュに挟まれた低灌流モデルを作成した。低酸素の存在の確認と酸素分圧の定量化には、

細胞内分布性りん光プローブである BTPDM1 を用いた。また免疫染色での低酸素領域の識別にはピモニダゾールを用い、低酸素応答因子 HIF1a との染色領域の関連を調べた。また、比較のために均一酸素培養下での HIF1a の評価のために、抗 HIF1a 抗体を用いたウェスタンブロッティング及び HIF1a 結合配列である Hypoxia-responsive element (HRE) を用いたのルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。これらの検討は multi gas incubator ないしは無酸素培養バッグを用いた酸素分圧変化下、及び塩酸ないし水酸化ナトリウムを用いた pH 変化下での変化を観察した。

(iii) 尿からのヒト尿細管細胞の取得と低酸素応答の検討

本研究は東京大学大学院医学系研究科において倫理承認を得て行った(倫理申請番号 11930)。慢性腎臓病で通院中の患者さんの尿検体を上乗せ採取させていただき、得られた尿検体を 1000g で遠心し得られた尿沈渣サンプルについて、検討を行った。尿細管細胞検出については近位尿細管細胞に特異的に発現する酵素である GGT (gamma-glutamyl transerase) にて切断され蛍光色素 HMRG を生じる ProteoGREEN-gGlu を用いて FACS にて解析を行った。

4. 研究成果

(i) 慢性腎臓病における、生体内での低酸素及び酸素勾配の実証

本検討においては、水溶化されたりん光色素が血中及び尿中に滞留し、細胞内に移行しないことを期待して検討を行った。しかし生体内りん光イメージング法(4)を用いて検討を行ったところ、観察時間に応じて血中/尿中のりん光色素強度は減弱し、尿細管細胞内のりん光強度は増強した。もともと水溶性りん光色素は速やかに尿中に排泄されるため、血中・尿中排泄の減弱は想定範囲内であったが、尿細管細胞内への蓄積は想定外であり、血中・尿中のみのりん光寿命の測定が困難であった。また、マウス尿検体を用いたりん光寿命測定では、同一酸素分圧下でのりん光寿命が一定せず、りん光寿命と酸素分圧の検量線が作成できない結果となった。以上の問題を解決する見通しが立たなかったため、今後の研究は(ii)に注力することとした。

(ii) 培養細胞における、酸素勾配が低酸素応答に与える影響の検討

カバーガラスを用いた培養は、既報でも酸素勾配を形成することが提唱されていた(6)。今回のりん光プローブを用いた検討においても、同様に酸素勾配が形成されることが確認された。通常は、HIF1a は酸素分圧と逆相関を示すと考えられている。しかし驚くべきことに、カバーガラス下の酸素勾配を有する培養条件下では、カバーガラスの中心の無酸素に近い条件においてはむしろ HIF1a の蓄積は減弱することが明らかになった。カバーガラスの大きさを変更した場合同様にこの HIF1a の蓄積領域は中心に収縮するため、カバーガラスの物理的的刺激よりも、特定の酸素分圧下で生じる現象であることが示唆された。りん光寿命測定による酸素分圧測定を行ったところ、10mmHg 程度の酸素分圧を呈する領域で HIF1a の蓄積は最大化していた。この現象が均一酸素分圧下では見られないことの確認のため、通常の培養方法で常酸素下、2%及び 1%酸素下、無酸素下での HIF1a の挙動を確認したところ、ウェスタンブロット及びレポーターアッセイいずれにおいても均一酸素分圧下では HIF1a の蓄積は無酸素状態が最大で、1%酸素分圧下、2%酸素分圧下、常酸素の順に減弱していくことが明らかになった。すなわち、無酸素領域で HIF1a の蓄積が減弱するのは酸素勾配を有する培養条件下に特異的な現象であることが明らかになった。このメカニズムとして、pH 変化に着目した。カバーガラス下の培養では、低灌流や酸素分圧の影響で中心部に向けて pH が低下する。pH 変化が HIF1a に与える影響についての既報は乏しいため、まず均一酸素分圧下において pH 変化が HIF1a に与える影響を確認したところ、同一の酸素分圧下でも、酸性条件下では HIF1a の蓄積が抑制された。この結果から、酸素勾配下における特徴的な HIF1a の分布については、無酸素領域では低酸素であるにも関わらず pH が低下することが HIF1a の蓄積を抑制するという仮説を立てた。この実証のため、カバーガラス下での培養に際し培地の pH を酸性、塩基性に調整し HIF1a の蓄積を評価したところ、酸性条件下では HIF1a の陽性領域は外側に遷移し、塩基性条件下では内側に遷移した。これらの結果から、酸素勾配下での HIF1a の特徴的な蓄積は、酸素分圧と pH の両者により制御された結果であることが示された。これらの結果は、腎臓は生体内で酸素勾配を有していることを勘案すると、生体内での低酸素応答を模するためには低灌流などによる酸素勾配を有した培養が重要であることを示している。これらの結果は学術論文として報告を行った(7)。

(iii) 尿からのヒト尿細管細胞の取得と低酸素応答の検討

ヒト尿検体を用いて、GGT 活性による近位尿細管細胞分離を試みたが、複数回施行した結果、proteoGREEN-gGlu によって明確に近位尿細管細胞を区別することは困難であった。GGT により産生された HMRG は細胞内移行性が強いいため近傍の細胞内に集積するが、HMRG が産生された時点で近位尿細管細胞以外の細胞内にも、細胞間の距離に応じて少量分布してしまうためと考えられた。本検討による生細胞の分離は困難と考え、検討を終了した。

< 文献 >

- (1) Nat Rev Nephrol. 2010 Nov;6(11):667-78. doi: 10.1038/nrneph.2010.124
- (2) Front Physiol. 2017 Feb 21;8:99. doi: 10.3389/fphys.2017.00099
- (3) Sci Rep. 2015 Dec 8;5:17838. doi: 10.1038/srep17838
- (4) Kidney Int. 2018 Jun;93(6):1483-1489. doi: 10.1016/j.kint.2018.01.015.
- (5) Hydrophilic Ir(III) Complexes for In vitro and In vivo Oxygen Imaging, Yoshihara T, Hirakawa Y, Nangaku M, Tobita S, RSC Detection Science: Quenched-phosphorescence Detection of Molecular Oxygen: Applications in Life Sciences, ed. D. B. Papkovsky and R. I. Dmitriev, Royal Society of Chemistry, 2018, Chap. 4, pp.71-90. DOI: 10.1039/9781788013451
- (6) Am J Physiol Cell Physiol. 2010 Dec;299(6):C1318-23. doi: 10.1152/ajpcell.00254.2010.
- (7) Physiol Rep. 2021 Jan;9(1):e14689. doi: 10.14814/phy2.14689.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honda Tomoko, Hirakawa Yosuke, Mizukami Kiichi, Yoshihara Toshitada, Tanaka Tetsuhiro, Tobita Seiji, Nangaku Masaomi	4. 巻 9
2. 論文標題 A distinctive distribution of hypoxia inducible factor 1 in cultured renal tubular cells with hypoperfusion simulated by coverslip placement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14689	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本田智子、平川陽亮、水上輝市、吉原利忠、田中哲洋、飛田成史、南学正臣
2. 発表標題 酸素勾配を有する尿細管細胞培養系の確立と特徴的なHIF1 の分布
3. 学会等名 検索結果 ウェブ検索結果 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hirakawa, Tomoko Honda, Tetsuhiro Tanaka, Kiichi Mizukami, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 A unique distribution of hypoxia-inducible factor in cultured tubular cells with hypoperfusion
3. 学会等名 World Congress of Nephrology 2020（国際学会）
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
---------	---------