

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17745

研究課題名（和文）細胞老化とオートファジーに介入する慢性腎臓病の治療法開発

研究課題名（英文）Developing a treatment for chronic kidney disease by intervening in cellular senescence and autophagy

研究代表者

岸 誠司（Seiji, Kishi）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10519507

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）：腎の大部分を占める近位尿細管は種々の内因性および外因性の要因により障害を受ける。そして腎予後を規定する間質の線維化において中心的な役割を果たす。申請者は、種々の内因性ストレスによって生じる近位尿細管DNA損傷とその修復機構に注目し、DNA損傷とつながりの深い細胞老化との関係を主として遺伝子改変動物を用いた研究により解析した。尿細管間質の線維化がひどいマウスにおいてはDNA損傷が増大しており、腎老化が促進されていた。尿細管には、細胞内オルガネラ複合体であるTASCCが形成されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化細胞を除去することで臓器機能を改善したり、生命延長ができることも近年明らかになってきた。したがって、腎の細胞老化を制御して腎不全治療ができる可能性を高める研究成果を提供できることになる。

研究成果の概要（英文）：The proximal tubules, which make up a significant portion of the kidney, are susceptible to various intrinsic and extrinsic factors that can lead to impairment. They play a central role in the fibrosis of the renal interstitium, which determines renal prognosis. The applicant focused on DNA damage and repair mechanisms in the proximal tubules caused by various intrinsic stresses, particularly in relation to cellular senescence, which is closely associated with DNA damage. The applicant conducted research using genetically modified animals to analyze these relationships. In mice with severe fibrosis in the tubulointerstitium, there was an increase in DNA damage that accelerated renal aging. The proximal tubules showed the formation of a cellular organelle complex called TASCC.

研究分野：腎臓内科学

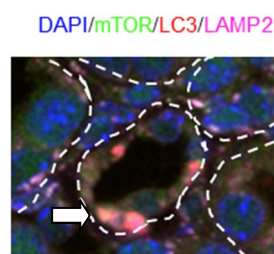
キーワード：線維化 DNA損傷 細胞老化 腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)の患者数は世界的にも年々増加傾向にあり、高齢化がその増加に拍車をかけている。悪性腫瘍や心血管疾患も早期治療やリスク因子への積極的介入によりコントロールがつく疾患となりつつあり、患者 QOL の維持や医療費抑制からも CKD 治療開発は急務である。さらに、近年増加しつつある急性腎障害 (AKI) が、その高い死亡率のみならず、CKD に移行すること、末期腎不全の高いリスク因子であることが疫学データからも基礎データからも示された (*J Am Soc Nephrol* 2009;20:223-8 *Kidney Int.* 2012;82(2):172-83. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(8):2393-406.)。ほとんどの AKI および CKD 進展 (尿細管間質の線維化) には腎実質の大半を占める近位尿細管が標的となる。AKI では障害をうけつつも生存できれば、その後脱分極し細分化し、増殖することで腎を修復することが fate tracing の手法により明らかにされている (*Cell Stem Cell.* 2008;2:284-91. *Am J Pathol.* 2010;176:85-97. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:9226-31)。すなわち、この過程の破綻が尿細管の不全修復のきっかけとなり、結果としてのちに CKD を発症し、不可逆性の腎機能低下が進行する。この不全修復時には近位尿細管の DNA 損傷と細胞周期 G2/M arrest が認められ、腎間質の線維化を増悪させる活性型筋線維芽細胞が誘導される (*Nat Med.* 2010;16:535-43)。しかしながら、それ以上の詳細なメカニズムの解明には至っておらず、その結果治療標的もまだ明らかにはなっていない。さらなる解明が治療標的すなわち創薬対象の創出をもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景に基づいて、本研究では、依然として根本治療の存在しない腎臓病の新たな治療標的を探索した。本研究では、細胞内にストレス由来の細胞老化において誘導されるオルガネラ複合体である TOR-autophagy spatial coupling compartment (TASCC: 粗面小胞体とゴルジ体、オートリソソーム、mTOR の空間的な統合によるタンパク質の分解と合成という急速な代謝回転が行われている領域)に注目し、TASCC と細胞老化および腎線維化との直接の関係を明らかにし腎不全進展抑制の新たな治療標的となることを証明する。



3. 研究の方法

主として、遺伝子改変動物を作成し、それらのマウスに腎障害を起し、腎の表現系を解析することで研究を行なった。

- 1) 腎臓病進展に重要な高血圧と高率に合併しうる脂質異常症を模倣するモデルマウスを作成する。具体的には、endothelial nitric oxide synthase(eNOS) ^{+/-}マウスおよび apolipoprotein E (ApoE) ^{+/-}マウスを交配し、Wild Type, eNOS ^{+/+}; ApoE ^{+/+} (WT)、eNOS ^{+/+}; ApoE ^{-/-} (ApoE KO)、eNOS ^{-/-}; ApoE ^{-/-} (DKO) の3種類のマウスを作成した。これらのマウスを評価することで、高血圧症と脂質異常症の相互作用が観察可能となる。

8-10 週齢のオスマウスを用いて、それぞれの血圧・脂質を確認した。その後に腎臓の線維化モデルである片側尿管結紮術 (UUO) を行い、day10 で屠殺し、尿細管障害、線維化および腎老化を 3 群間で評価した。

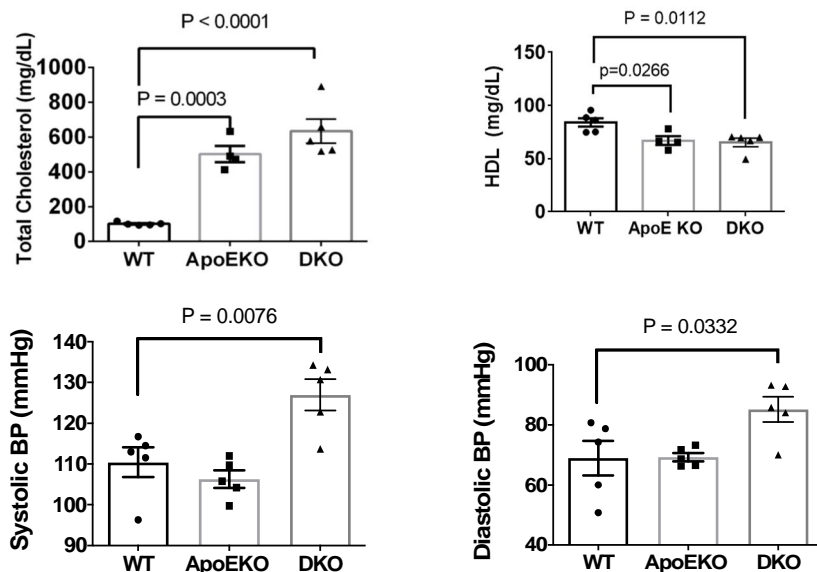
2) DNA 損傷応答機構の最上流に存在するマスター遺伝子である ATM and Rad3- related (ATR) と SLC34A1-GCE マウスとの交配にて作成する近位尿細管的コンディショナルノックアウトマウス(ATR^{RPTC-/-})。

4. 研究成果

(1) WT、 ApoE KO、 DKO 各マウスの血圧と脂質

UUO を実施する前に、血圧と脂質プロファイルを測定した。

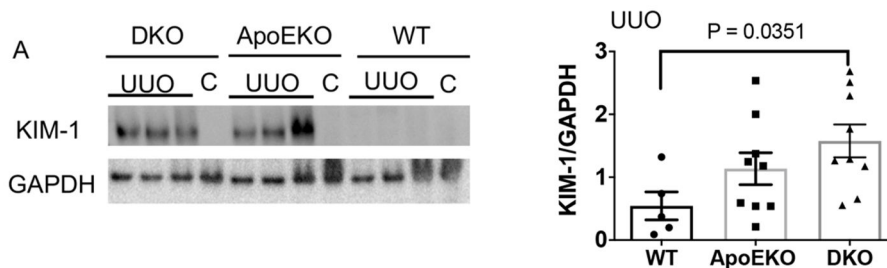
ApoEKO マウスは WT マウスに比べ、総コレステロール、HDL コレステロール、非 HDL コレステロールが高値であった。DKO マウスは WT マウスに比べ、血圧上昇、総コレステロール、非 HDL コレステロールが最も高く、HDL コレステロールが最も低かった。以上のことから、DKO マウスは脂質異常症および高血圧を示した。



(2) UUO 後の腎障害の評価

次に UUO day10 の腎組織の評価を行なった。

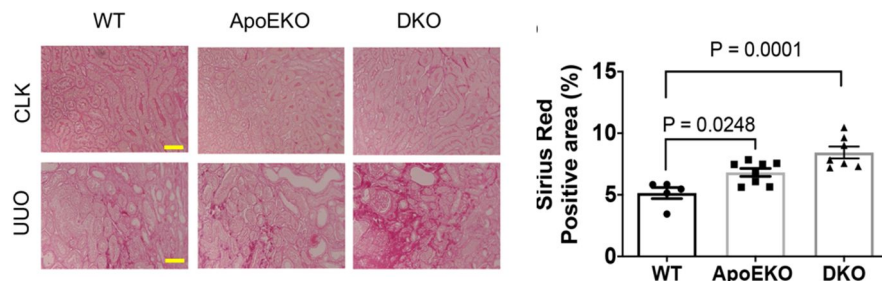
障害近位尿細管のみに発現する KIM-1 のタンパク量をウエスタンブロットで評価したところ、WT 群では発現が消失していることに対して、DKO 群で有意に発現が持続しており、DKO マウス群での遷延する近位尿細管障害が確認された。



(3) 間質線維化の評価

UUO を行うと最終的には腎間質に線維化が生じる。

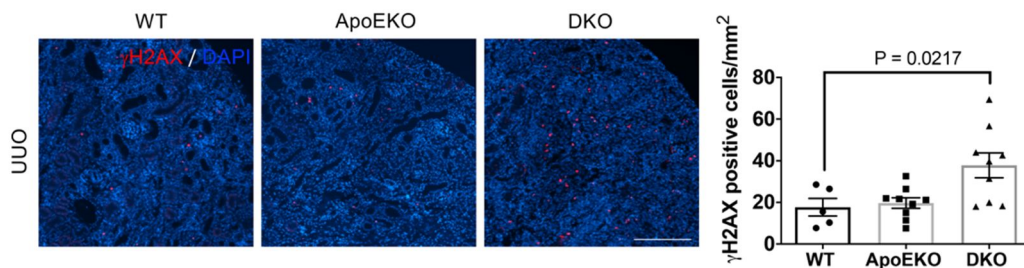
3 群のマウスの線維化の程度を細胞外基質を染色するシリウスレッド染色で定量化した細胞外マトリックスコラーゲン沈着は、WT マウスと比較して ApoEKO マウスおよび DKO マウスの両方で増加した。その差は DKO マウスで有意であった。また、間質性線維症に関連する遺伝子 (TGF- β 、CTGF、Col1a1) の mRNA レベルは、ApoEKO マウスと DKO マウスの両方で WT マウスと比較して増加した。これらの mRNA は、DKO マウスで最も高かった。



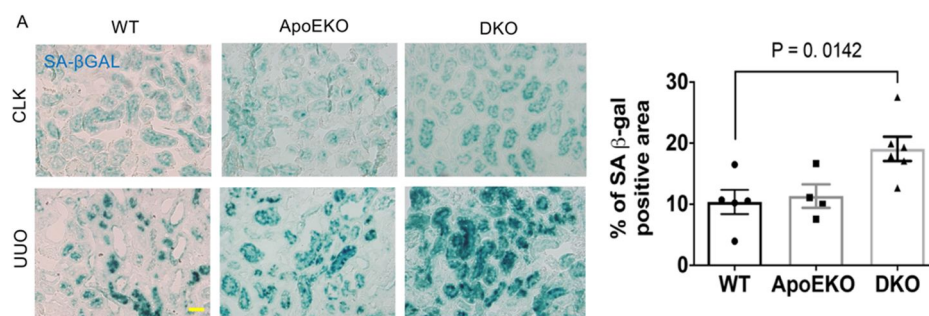
(4) 近位尿細管の DNA 損傷と腎老化

腎組織の DNA 障害と老化の評価を行った。

UUO 後の障害尿細管の評価では、WT マウスと比較して、 γ H2AX で標識された DNA 損傷が有意に増加していた



分泌型老化細胞のマーカである老化関連 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 活性の評価では、ApoEKO マウスと DKO マウスの両方で腎臓尿細管細胞で上昇していることが判明したが、DKO マウスでは、UUO10 日後に WT マウスと比較して有意に活性が上昇していた。

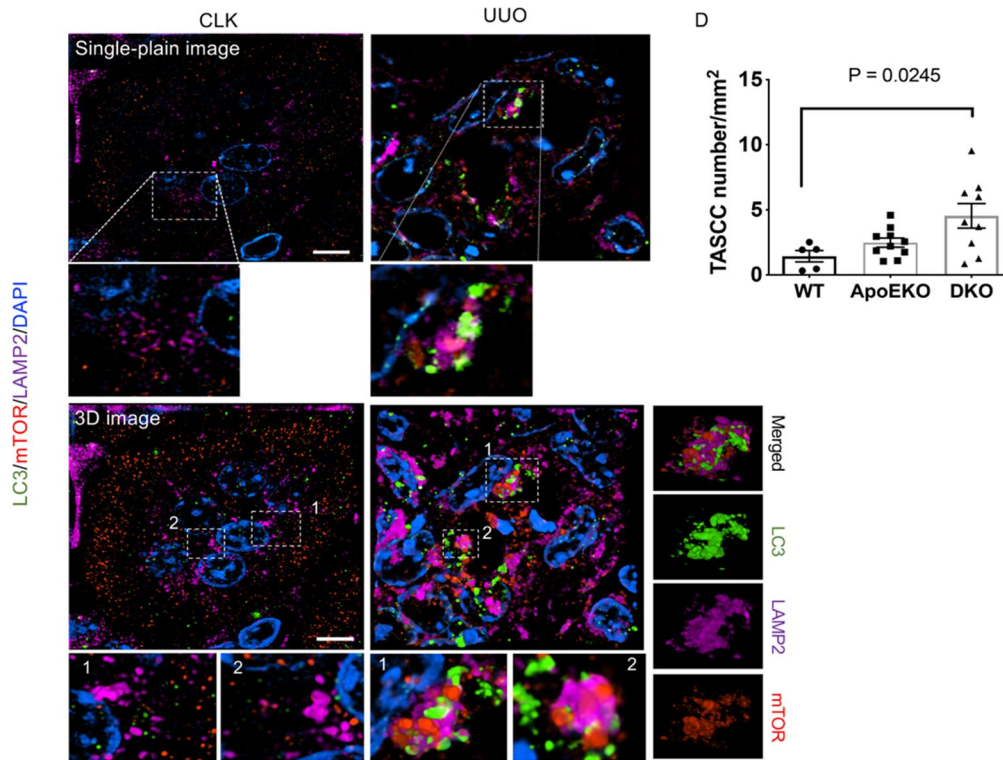


(5) 腎障害

後の TASCC 形成

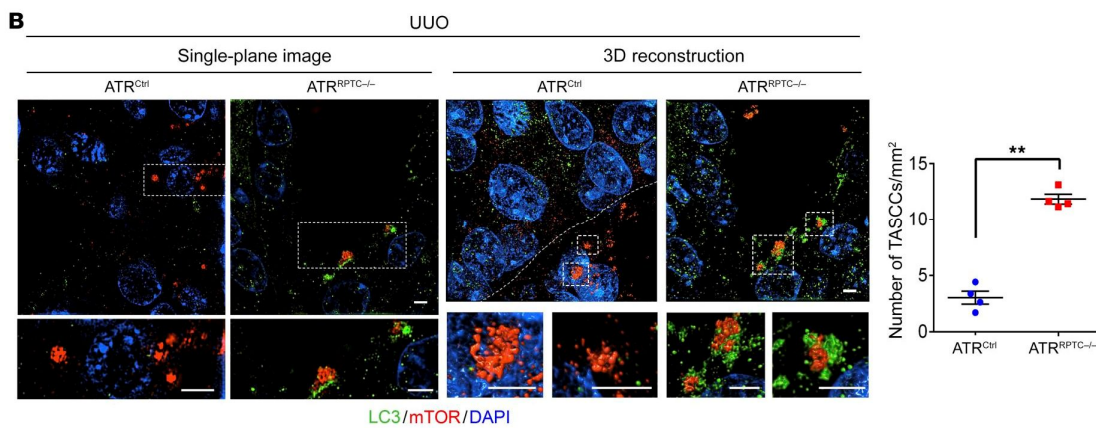
2011 年、成田らは、target of rapamycin-autophagy spatial coupling compartments (TASCC) の形成が、老化に伴う分泌表現型の重要な構成要素であると報告し、我々は最近、DNA 損傷の増加が近位尿細管の TASCC 形成を促進し、腎の線維化が増悪することを明らかにしてきた。我々は、eNOS と ApoE の二重欠失が、UUO 後の DNA 損傷と TASCC 形成を増加させるかどうかを検討した。

UUO 後、近位尿細管で TASCC 形成が誘導された。この差は、超解像構造化照明顕微鏡で評価すると、DKO マウスで有意であった。



(6) DNA 損傷応答機構と TASC の関係

ATR^{RPTC-/-} マウスおよびその littermate (ATR^{ctrl}) に UUO を行い、近位尿細管 DNA に損傷を引き起こしたのちにマウスを屠殺し、TASC 形成を超解像構造化照明顕微鏡にて評価した。DNA 損傷が増大する ATR^{RPTC-/-} マウスにおいて、UUO 後の腎線維化は増加しており、TASC 形成が増加していた。



【結論】高血圧症とアテローム性動脈硬化症の相互作用は腎障害への感受性を増加させ、傷害後の DNA 損傷の増加に伴って生じる TASC 形成を誘導することにより、傷害後の線維化の増悪をきたすことが示された。

文献

J Clin Invest. 2019 Nov 1;129(11):4797-4816.

Biochem Biophys Res Commun . 2021 Jun 4;556:142-148.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikeda Yasumasa, Funamoto Masafumi, Kishi Seiji, Imanishi Masaki, Aihara Ken-ichi, Kashiwada Yoshiki, Tsuchiya Koichiro	4. 巻 103
2. 論文標題 The novel preventive effect of a Japanese ethical Kampo extract formulation TJ-90 (Seihaito) against cisplatin-induced nephrotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytomedicine	6. 最初と最後の頁 154213 ~ 154213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phymed.2022.154213	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 岸 誠司	4. 巻 93
2. 論文標題 特集 尿細管と腎線維化 【線維化を誘導する尿細管障害】 尿細管DNA損傷応答と腎線維化の関係	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 862 ~ 867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24479/kd.0000000550	査読の有無 無
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 Nishimura Kenji, Taguchi Kensei, Kishi Seiji, Brooks Craig R., Ochi Arisa, Kadoya Hiroyuki, Ikeda Yasumasa, Miyoshi Masashi, Tamaki Masanori, Abe Hideharu, Aihara Ken-ichi, Kashihara Naoki, Nagai Kojiro	4. 巻 556
2. 論文標題 Dual disruption of eNOS and ApoE gene accelerates kidney fibrosis and senescence after injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 142 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.111	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 該当する

1. 著者名 岸 誠司	4. 巻 64
2. 論文標題 【腎臓学この1年の進歩】 AKI研究をめぐる課題と今後の治療法への展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Mori Yutaro, Ajay Amrendra K., Chang Jae-Hyung, Mou Shan, Zhao Huiping, Kishi Seiji, Li Jiahua, Brooks Craig R., Xiao Sheng, Woo Heung-Myong, Sabbisetti Venkata S., Palmer Suetonia C., Galichon Pierre, Li Li, Henderson Joel M., Kuchroo Vijay K., Hawkins Julie, Ichimura Takaharu, Bonventre Joseph V.	4. 巻 33
2. 論文標題 KIM-1 mediates fatty acid uptake by renal tubular cells to promote progressive diabetic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 1042 ~ 1061.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2021.04.004	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 該当する

1. 著者名 Hamano H, Ikeda Y, Goda M, Fukushima K, Kishi S, Chuma M, Yamashita M, Niimura T, Takechi K, Imanishi M, Zamami Y, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Miyamoto L, Ishizawa K, Fujino H, Tamaki T, Aihara Ki, Tsuchiya K	4. 巻 99
2. 論文標題 Diphenhydramine may be a preventive medicine against cisplatin-induced kidney toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 885 ~ 899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.10.041	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 Kishi Seiji, Matsumoto Takuya, Ichimura Takaharu, Brooks Craig R.	4. 巻 57
2. 論文標題 Human reconstructed kidney models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 133 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-021-00548-8	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 該当する

1. 著者名 Murakami Taichi, Nishimura Kenji, Ono Hiroyuki, Ueta Sayo, Shibata Eriko, Kishi Seiji, Tamaki Masanori, Miya Keiko, Shima Hisato, Tashiro Manabu, Inoue Tomoko, Kawahara Kazuhiko, Nagai Kojiro, Abe Hideharu, Minakuchi Jun, Doi Toshio	4. 巻 67
2. 論文標題 Clinical characteristics associated with 1-year tolvaptan efficacy in autosomal dominant polycystic kidney disease with a wide range of kidney functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 315 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.315	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 -

1. 著者名 Kishi Seiji, Matsumoto Takuya, Ichimura Takaharu, Brooks Craig R.	4. 巻 57
2. 論文標題 Human reconstructed kidney models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 133 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-021-00548-8	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 Kishi Seiji, Brooks Craig R., Taguchi Kensei, Ichimura Takaharu, Mori Yutaro, Akinfolarin Akinwande, Gupta Navin, Galichon Pierre, Elias Bertha C., Suzuki Tomohisa, Wang Qian, Gewin Leslie, Morizane Ryuji, Bonventre Joseph V.	4. 巻 129
2. 論文標題 Proximal tubule ATR regulates DNA repair to prevent maladaptive renal injury responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4797 ~ 4816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI122313	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 Canaud Guillaume, Brooks Craig R., Kishi Seiji, Taguchi Kensei, Nishimura Kenji, Magassa Sato, Scott Adam, Hsiao Li-Li, Ichimura Takaharu, Terzi Fabiola, Yang Li, Bonventre Joseph V.	4. 巻 11
2. 論文標題 Cyclin G1 and TASC2 regulate kidney epithelial cell G2-M arrest and fibrotic maladaptive repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaav4754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aav4754	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

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kenji Nishimura, Seiji Kishi
2. 発表標題 Dual disruption of eNOS and ApoE gene accelerates kidney fibrosis and aging after injury
3. 学会等名 Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Kishi
2. 発表標題 ENHANCED KIDNEY FIBROSIS AND AGING AFTER UUO IN ENOS/APOE DOUBLE KNOCKOUT MOUSE
3. 学会等名 56th ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Kishi
2. 発表標題 Dual Disruption of Endothelial Nitric Oxide Synthase and ApoE Gene Accelerates Kidney Fibrosis and Aging After Injury
3. 学会等名 ISH2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸 誠司
2. 発表標題 急性腎障害とその後を考える
3. 学会等名 日本医工学治療学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiji Kishi
2. 発表標題 Dual Disruption of Endothelial Nitric Oxide Synthase and ApoE Gene Accelerates Kidney Fibrosis and Aging After Injury
3. 学会等名 ISH2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸 誠司
2. 発表標題 腎臓病の運命決定機構におけるDNA損傷応答機構の役割
3. 学会等名 日本腎臓学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸 誠司
2. 発表標題 「AKI基礎研究の最前線 究極のアンメットニーズへの挑戦」
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸 誠司
2. 発表標題 AKI to CKD transition トータルマネジメント～発症予防から移行の制御まで～
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会西部学術大会 セッション：シンポジウム2（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸 誠司
2. 発表標題 複雑臓器障害の分子メカニズムの解明、腎臓研究から発信する全身臓器障害メカニズム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiji Kishi
2. 発表標題 Disruption of DNA Damage Response Drives TOR-Autophagy Spatial Coupling Compartment (TASCC) Formation and Kidney Fibrosis through p53-Cyclin G1 Upregulation
3. 学会等名 APCN2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiji Kishi
2. 発表標題 Cyclin G1 and TOR-autophagy spatial coupling compartments (TASCC) regulate pro-fibrotic secretory phenotypes in kidney tubule cells in the G2/M phase of the cell cycle
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Brooks CR, Kishi S, Taguchi K, Bonventre JV
2. 発表標題 ATR Deletion Drives TOR-Autophagy Spatial Coupling Compartment (TASCC) Formation and Kidney Fibrosis .
3. 学会等名 Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>APCN 2020 Awards https://apcn2020.hk/awards.html?fbclid=IwAR04jtlIys0DrfB3E2JvB8S8Q4e88MNzo9EiVaImX8MfjJ92F_azcMjj9HBI</p>
--

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