

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08263

研究課題名（和文）エリスロポエチンの腎線維化と間質浸潤マクロファージに及ぼす影響の検討

研究課題名（英文）Effects of erythropoietin on the evolution of renal fibrosis and interstitial macrophage infiltration

研究代表者

西田 眞佐志（Nishida, Masashi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員教授

研究者番号：50275202

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）：本研究ではマウスを用い片側尿管結紮により腎線維化を誘導し、腎線維化の出現後に造血ホルモンであるエリスロポエチン（EPO）を投与した場合にも腎線維化の進行が抑制されることを示した。同時にコラーゲンを産生する筋線維芽細胞の減少と遺伝子レベルでⅠ型コラーゲンの産生抑制がみられた。腎障害の早期より腎間質にマクロファージの浸潤がみられ、腎線維化の進展に重要な役割を演じていると考えられるが、EPO投与により間質浸潤マクロファージの極性に変化が認められ、腎線維化抑制効果に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎線維化は、末期腎不全に至る進行性の腎障害において共通にみられる病理組織像であるが、腎線維化に対する有効な治療法は未だ確立されていない。慢性腎臓病（CKD）は成人の8人に1人が罹患する国民病で、末期腎不全への進行は透析医療費の増大を招くだけでなく、CKD患者では脳心血管病の併発も多く、CKDに対し適切な治療介入を行うことは極めて重要な課題である。一方、エリスロポエチン（EPO）の腎保護作用が報告されているが、その詳細は未だ不明であり、本研究はEPOの作用が間質浸潤マクロファージを介する可能性およびEPOが進行性の腎機能障害に対する有効な治療法となり得る可能性を示した点で意義深いものである。

研究成果の概要（英文）：Renal fibrosis was induced in mice by unilateral ureteral obstruction (UUO) and we demonstrated that treatment with erythropoietin (EPO), a hematopoietic hormone, exerts antifibrotic effects against the evolution of renal fibrosis even after the emergence of established fibrosis. Treatment with EPO decreased myofibroblast accumulation and  $\alpha 1(I)$  collagen mRNA expression. The infiltration of macrophages into the cortical interstitium is the initial event observed in the UUO model, and infiltrating macrophages are considered to play a pivotal role in the development of renal fibrosis. In the present study, treatment with EPO also influenced the polarization of infiltrating macrophages, which may possibly contributed to the attenuated renal fibrosis.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：腎線維化 エリスロポエチン マクロファージ 片側尿管結紮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎系球体および間質の線維化は、原因の如何を問わずほぼすべての腎疾患において認められる最終的な病理組織像であり、この病変が拡がることにより臨床的に末期腎不全を呈する。近年、慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) の概念が提唱された背景として、CKDから透析療法が必要となる末期腎不全へと進行する患者が増加し、透析医療費の増大を招くばかりでなく、CKD患者では脳心血管病の併発が多く、脳卒中や虚血性心疾患の重大な危険因子となることがある。我が国においても成人の8人に1人はCKDであり、新たな国民病となっている。そのため、CKDに対し早期から適切な治療介入を行い、心血管イベントの発症を抑制するとともに、末期腎不全から透析への移行をくい止めることは極めて重要な課題となっている。

エリスロポエチン (EPO) は主に腎尿細管間質細胞で生成される造血因子であり、腎機能低下に伴い産生が低下し腎性貧血に陥るため、EPO製剤が慢性腎不全における腎性貧血に対する治療薬として広く用いられている。EPOはその赤血球造血機能が注目されてきたが、その後脳内で産生されたEPOが神経細胞保護作用を持つことや、心筋梗塞における心筋保護作用を持つことなど、EPOの赤血球以外の細胞や組織に対する作用が報告され、これらはEPOが当該組織において受容体と結合することによる細胞内シグナル伝達を介することが明らかとなった。腎においては、動物実験でEPOが虚血再灌流や薬剤による急性腎障害、片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction: UUO) による腎線維化などを軽減させることが報告され、EPOが貧血改善と独立した腎保護作用を有することが明らかとなり、EPOを用いた腎障害や腎線維化に対する治療応用が注目されている。一方その機序については、UUOによる腎線維化モデルにおいてEPOがTGF- $\beta$ 1により誘導されるepithelial-to-mesenchymal transition (EMT) を抑制する、dynamin-related protein-1 (Drp-1) の発現を抑制する、fibrocyteの蓄積を抑制するなどの報告があるが、その詳細は依然不明である。

一方、近年マクロファージがEPO受容体を有し、EPOはマクロファージを介して種々の炎症の進展過程に影響を及ぼすことが報告されている。すなわち、EPOは受容体を介してマクロファージによる炎症性サイトカインの産生や、M1/M2マクロファージなどのphenotypeの変化などに作用し、さらにマクロファージの貪食能や遊走能を促進し、マクロファージの貪食作用による炎症の抑制にEPOシグナルが関与することなども報告されている。腎線維化の進展過程においても、間質浸潤マクロファージは炎症の惹起および線維化の進行の各ステージで重要な役割を果たしているが、EPOの腎線維化抑制作用におけるマクロファージを介する機序について検討した報告はない。

### 2. 研究の目的

本研究では、EPOの腎保護作用における間質浸潤マクロファージの関与に焦点を当てて検討することにより、EPOを用いた腎線維化抑制治療の開発に寄与することを目的とする。また腎線維化出現後のEPO投与による腎線維化の抑制効果についての報告はなく、依然不明である。本研究ではUUOモデルを用い、腎線維化出現後のUUO後期におけるEPO投与の効果についても検討する。

### 3. 研究の方法

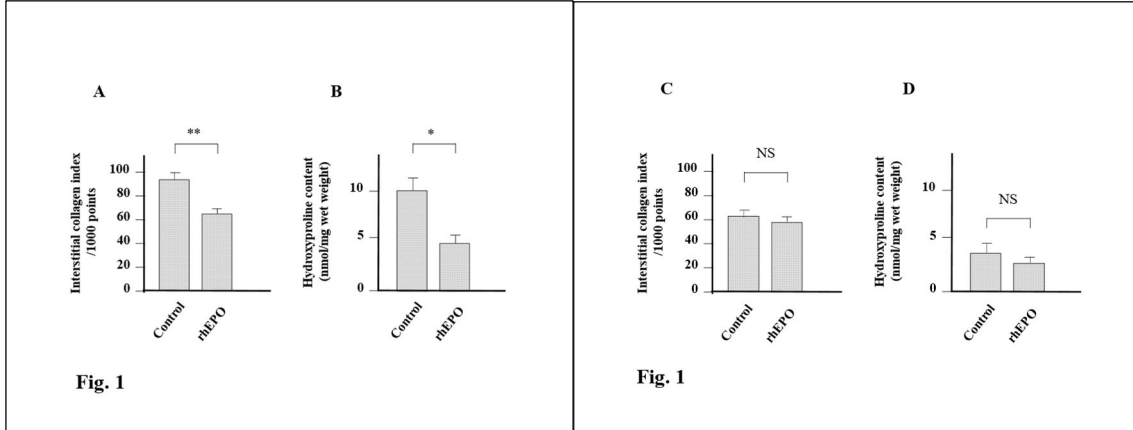
マウス片側尿管結紮 (UUO) モデルにおいて、遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン製剤 (rhEPO) を線維化の後期 (UUO day 7 から day 13) において投与し (1000 IU/kg/day を 1日1回腹腔内投与)、rhEPO投与群およびコントロール群でUUO day 14の腎組織における腎線維化の程度、myofibroblast蓄積量、間質浸潤マクロファージ数について検討した。また線維化の早期 (UUO day 0 から day 6) においても同様にrhEPO投与を行い、UUO day 7において同様の検討を行った。腎線維化については腎組織を用いたMasson染色およびコラーゲン含量の指標として腎組織中のハイドロキシプロリン量をHPLC法により測定した。Myofibroblast蓄積量、間質浸潤マクロファージ数および極性については腎組織の平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA)、F4/80、CD86、CD206の免疫染色およびウエスタンブロッティング解析により評価した。さらに腎組織から分離したRNAを用いtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1、 $\alpha$ 1(I) collagenのmRNA発現をreal time RT-PCR法により検討し、Keap1/Nrf2抗酸化経路の腎線維化および浸潤マクロファージの極性に対する影響を検討するため、腎組織中Keap1、腎組織核分画中Nrf2をウエスタンブロッティングにより解析した。またUUO後のday 0、day 7、day 14に尾静脈穿刺で血液サンプルを採取し、ヘマトクリットを測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 結果

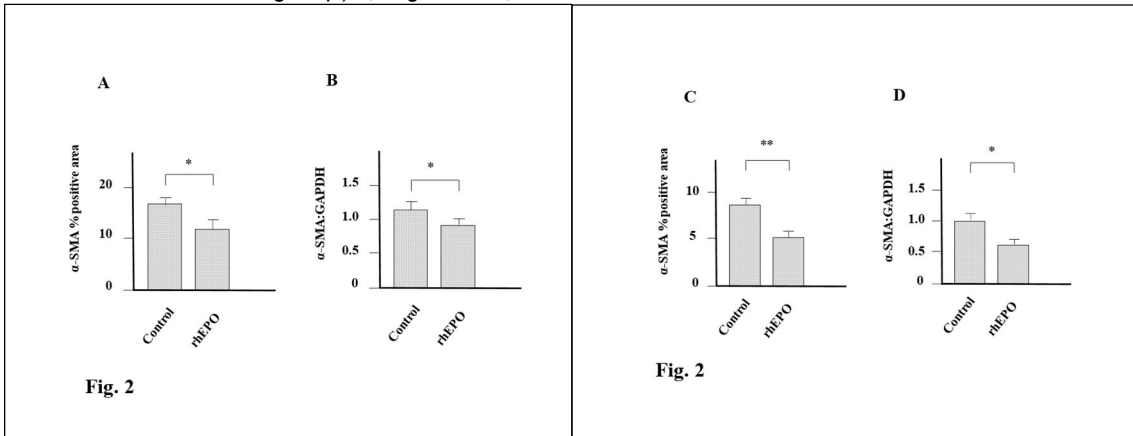
##### rhEPO 投与の腎線維化に対する影響

rhEPO投与により、UUO day 14においてMasson point count法による間質collagen indexはコントロール群と比べ有意に減少し( $93 \pm 6$  vs.  $63 \pm 4$  / 1000 points,  $P < 0.01$ ,  $n = 9$  in each group)、HPLC法による腎組織中コラーゲン量も有意に減少した(hydroxyproline;  $9.8 \pm 1.7$  vs.  $4.6 \pm 1.1$  nmol/mg wet weight,  $P < 0.05$ ,  $n = 9$  in each group) (Fig. 1A,B)。しかしUUO day 7においてはrhEPO投与によりいずれも有意差を認めなかった(Masson point count法;  $62 \pm 6$  vs.  $58 \pm 4$  / 1000 points, NS,  $n = 9$  in each group; hydroxyproline;  $3.6 \pm 1.2$  vs.  $2.3 \pm 0.6$  nmol/mg wet weight, NS,  $n = 9$  in each group) (Fig. 1C,D)。



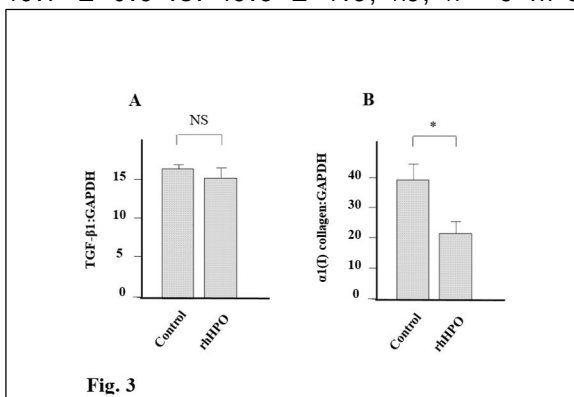
##### rhEPO 投与の myofibroblast 蓄積量に対する影響

rhEPO投与により、UUO day 14において  $\alpha$ -SMA免疫染色による間質myofibroblast蓄積量はコントロール群と比べ有意に減少し(% positive area;  $17.1 \pm 0.7$  vs.  $12.0 \pm 1.7$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 9$  in each group)、ウエスタンブロッティング解析でも同様に  $\alpha$ -SMA蛋白量の有意な減少を認めた(ratio to GAPDH protein expression;  $1.14 \pm 0.11$  vs.  $0.89 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 10$  in each group) (Fig. 2A,B)。またUUO day 7においても同様にrhEPO投与によりいずれも有意な減少を認めた(% positive area;  $8.5 \pm 0.8$  vs.  $5.1 \pm 0.7$ ,  $P < 0.01$ ,  $N = 9$  in each group;  $\alpha$ -SMA ratio to GAPDH protein;  $1.01 \pm 0.12$  vs.  $0.59 \pm 0.06$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 8$  in each group) (Fig. 2C,D)。



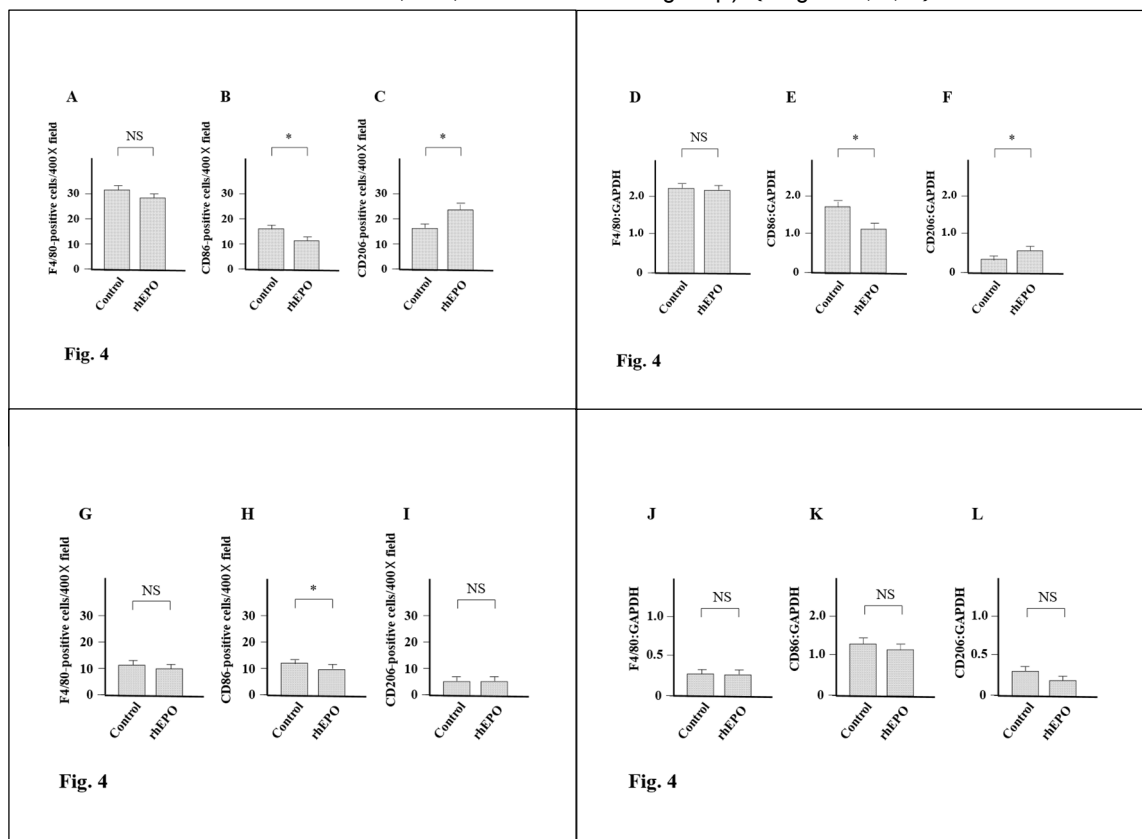
##### rhEPO 投与の TGF- $\beta$ 1, $\alpha$ 1(I) collagen の mRNA 発現に対する影響

rhEPO投与により、UUO day 14において  $\alpha$ 1(I) collagen mRNA発現の有意な減少を認めたが、TGF- $\beta$ 1 mRNA発現については有意な変化を認めなかった(ratio to GAPDH mRNA expression;  $\alpha$ 1(I) collagen:  $39.6 \pm 7.0$  vs.  $21.4 \pm 4.0$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 8$  in each group; TGF- $\beta$ 1:  $16.7 \pm 0.5$  vs.  $15.3 \pm 1.3$ , NS,  $N = 8$  in each group) (Fig. 3A,B)。



### rhEPO投与の間質マクロファージ浸潤に対する影響

rhEPO投与により、UUO day 14におけるF4/80陽性間質浸潤マクロファージ数はコントロール群と比べ有意な変動を認めなかった( $31.2 \pm 1.2$  vs.  $27.8 \pm 1.2/\times 400$  field, NS,  $N = 6$  in each group)。一方、rhEPO投与によりUUO day 14において間質浸潤CD86陽性細胞 (M1マクロファージ) 数は有意に減少し、間質浸潤CD206陽性細胞 (M2マクロファージ) 数は有意に増加した(CD86-positive cells:  $16.1 \pm 1.0$  vs.  $11.9 \pm 0.9/\times 400$  field,  $P < 0.05$ ,  $N = 6$  in each group; CD206-positive cells:  $16.6 \pm 1.0$  vs.  $23.0 \pm 1.8/\times 400$  field,  $P < 0.05$ ,  $N = 6$  in each group) (Fig. 4A,B,C)。ウエスタンブロッティング解析でも同様にrhEPO投与により、UUO day 14におけるF4/80蛋白の発現はコントロール群と比べ有意な変動を認めなかったが、CD86蛋白の発現は有意に減少し、CD206蛋白の発現は有意に増加した(ratio to GAPDH protein expression; F4/80:  $2.20 \pm 0.15$  vs.  $2.15 \pm 0.18$ , NS,  $N = 10$  in each group; CD86:  $1.72 \pm 0.19$  vs.  $1.13 \pm 0.19$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 10$  in each group; CD206:  $0.36 \pm 0.02$  vs.  $0.52 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 10$  in each group) (Fig. 4D,E,F)。またUUO day 7においては、rhEPO投与により、間質浸潤CD86陽性細胞数の有意な減少を認めたが(CD86-positive cells:  $12.4 \pm 0.4$  vs.  $9.4 \pm 1.2/\times 400$  field,  $P < 0.05$ ,  $N = 6$  in each group)、F4/80陽性間質浸潤マクロファージ数および間質浸潤CD206陽性細胞数については有意な変動を認めず(F4/80-positive cells:  $10.6 \pm 0.6$  vs.  $9.4 \pm 0.4/\times 400$  field, NS; CD206-positive cells:  $4.5 \pm 0.4$  vs.  $4.6 \pm 0.4/\times 400$  field, NS,  $N = 6$  in each group) (Fig. 4G,H,I)、ウエスタンブロッティング解析ではrhEPO投与によりUUO day 7において、F4/80、CD86、CD206のいずれも有意な変動を認めなかった(ratio to GAPDH protein; F4/80:  $0.25 \pm 0.02$  vs.  $0.23 \pm 0.01$ , NS; CD86:  $1.28 \pm 0.20$  vs.  $1.16 \pm 0.18$ , NS; CD206:  $0.32 \pm 0.11$  vs.  $0.18 \pm 0.02$ , NS;  $N = 8$  in each group) (Fig. 4J,K,L)。



### rhEPO投与のKeap1/Nrf2蛋白量に対する影響

rhEPO投与により、UUO day 14においてウエスタンブロッティング解析でKeap1蛋白および核内のNrf2蛋白のいずれも有意な変動は認めなかった(ratio to histone H3 protein expression; Nrf2:  $0.29 \pm 0.05$  vs.  $0.28 \pm 0.07$ , NS,  $N = 6$  in each group; ratio to GAPDH protein expression; Keap1:  $0.36 \pm 0.08$  vs.  $0.40 \pm 0.11$ , NS,  $N = 6$  in each group)。

### rhEPO投与の末梢血ヘマトクリット値に対する影響

rhEPO投与により、UUO day 0, day 7, day 14のいずれにおいても末梢血ヘマトクリット値の有意な変動を認めなかった(control vs. rhEPO group: day 0;  $45.7 \pm 1.5$  vs.  $42.3 \pm 2.6$ , NS; day 7;  $46.5 \pm 1.5$  vs.  $43.1 \pm 1.7$ , NS; day 14;  $45.2 \pm 0.8$  vs.  $42.2 \pm 1.3$ , NS;  $N = 10$  in each group)。

## (2) 考察

UUO モデルでは、間質細胞浸潤（主としてマクロファージ）、myofibroblast の増加、間質における細胞外基質蓄積などの腎線維化に関連した細胞分子学的事象は、UUO 後 1 週間以内に発現する。今回の結果より、rhEPO は UUO 後 7 日目の腎線維化出現後より投与を開始した場合も線維化の進行を抑制しうるということが明らかとなった。本研究では rhEPO 投与により、UUO day 14 において myofibroblast 蓄積量の減少、 $\alpha 1(I)$  collagen mRNA 発現の低下が認められ、腎線維化抑制の機序として myofibroblast により産生される  $\alpha 1(I)$  collagen の減少が示唆された。過去の報告においても、UUO モデルにおいて EPO 投与によるコラーゲンと myofibroblast 蓄積量の減少が報告されており、今回の結果と合致していた。一方、TGF- $\beta 1$  mRNA については過去の報告において、本研究と同様に EPO 投与により有意な変化を認めなかったとするものと、有意な減少を認めたとする報告の両者がみられている。これに関連して、過去において Madin-Darby canine kidney 細胞で EPO 投与により TGF- $\beta 1$  刺激による Smad-2 リン酸化が抑制され、これによる上皮間葉転換の抑制がみられたとの報告や、fibrocyte において EPO 投与により TGF- $\beta 1$  刺激によるミトコンドリア活性酸素種の産生が抑制され、コラーゲン産生が低下したなどの報告がある。本研究においても、このような EPO の TGF- $\beta 1$  シグナルの下流に対する作用が腎線維化の軽減に寄与した可能性がある。

UUO モデルにおいて間質のマクロファージ浸潤は UUO 後早期からみられ、これらの浸潤マクロファージは腎線維化の進展において重要な役割を演じていると考えられる。今回の結果では、UUO day 14 において、rhEPO 投与により F4/80 陽性間質浸潤マクロファージ数に有意な変化を認めなかったが、間質浸潤 CD86 陽性細胞（M1 マクロファージ）数の減少と、間質浸潤 CD206 陽性細胞（M2 マクロファージ）数の増加を認めた。以前より、間質浸潤マクロファージの M1/M2 極性が UUO 腎において腎線維化を引き起こす炎症反応の惹起とその制御に深くかかわっていることが報告されており、EPO がマクロファージの M1/M2 極性変化に直接関与しているとの報告もみられる。すなわち、過去において横紋筋融解症による急性腎障害モデルにおいて、EPO 投与により浸潤マクロファージの M2 phenotype への転換がみられ、傷害の軽減がみられたとの報告や、腹腔内マクロファージを用いた *in vitro* の研究で、EPO 投与が JAK2/STAT3 シグナル伝達経路を介して M2 マクロファージの増加と M1 マクロファージの減少を引き起こし、高血糖に関連する炎症を軽減させたなどの報告がある。今回の我々の研究においても、UUO day 14 において rhEPO 投与が間質浸潤マクロファージの極性を M1 マクロファージの減少と M2 マクロファージの増加の方向に変化させ、これにより炎症反応の終息と腎線維化の軽減をもたらした可能性が考えられる。

また今回、UUO 後早期の rhEPO 投与が間質浸潤マクロファージの極性と腎線維化の進展に及ぼす影響を検討するため、UUO day 0 から day 6 においても同様に連日 rhEPO 投与を行い、UUO day 7 において同様の検討を行った。この検討では、rhEPO 投与により UUO day 7 において myofibroblast 蓄積量の有意な減少を認めたが、腎線維化については有意な変化を認めなかった。さらに rhEPO 投与群で免疫染色による間質浸潤 CD86 陽性細胞の有意な減少を認めたが、ウェスタンブロッティング解析では CD86 に有意な変化はなく、F4/80 陽性間質浸潤マクロファージ、CD206 陽性細胞については rhEPO 投与による有意な変化は認めなかった。UUO 後早期の rhEPO 投与による腎線維化に対する影響については、実験プロトコールによる差異なども考えられ、今後の検討課題である。

過去の報告では、虚血/再灌流による急性腎障害動物モデルにおいて EPO が Keap1/Nrf2 抗酸化経路を介して腎保護作用を発揮することが報告されており、一方 UUO モデルにおいても Keap1/Nrf2 抗酸化経路が腎線維化の進展を抑制することが報告されている。さらに UUO モデルにおいて Nrf2 が浸潤マクロファージの M1/M2 極性に影響することも報告されている。これらを踏まえて、今回我々は UUO day 14 において Keap1、核内 Nrf2 蛋白量の評価を行った。しかし rhEPO 投与によりこれらに有意な変化は認めず、rhEPO 投与による浸潤マクロファージの極性の変化や腎線維化の軽減に Keap1/Nrf2 抗酸化経路の関与は否定的であった。

腎線維化は末期腎不全に至る CKD の進展において共通して認められる病理組織像であるが、腎線維化を抑制する治療が CKD における腎機能悪化の進行をくい止め、末期腎不全を回避できるか否かについては未だ不明な点も多い。しかし、そのような進行性の腎機能障害において“point of no return”の存在が想定されており、それに至る前に腎線維化の進展をくい止めることが出来れば、末期腎不全に至る腎機能の増悪を回避できる可能性がある。EPO 投与の腎線維化に対する影響とその機序についてはさらなる研究が必要であるが、今回の結果より、腎線維化出現後より EPO 投与を開始した場合にも腎線維化の進展を抑制し得ることが示され、その機序に浸潤マクロファージの極性変化が関与している可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nishida Akihiro, Nakagawa Norio, Nishida Masashi, Akioka Shinji, Iehara Tomoko	4. 巻 64
2. 論文標題 Pauci immune glomerulonephritis with recurrent hematuria and normal renal function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e15289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.15289	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 西田眞佐志, 奥村保子	4. 巻 5
2. 論文標題 小児の腎機能の見方と腎障害バイオマーカー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 京都第一赤十字病院医学雑誌	6. 最初と最後の頁 3-10
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 Nishida Akihiro, Nishida Masashi, Iehara Tomoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Delayed treatment with erythropoietin attenuates renal fibrosis in mouse model of unilateral ureteral obstruction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.15427	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田明弘, 西田眞佐志, 家原知子
2. 発表標題 マウスUUOモデルにおけるエリスロポエチン投与の腎間質マクロファージ浸潤に及ぼす影響と腎線維化抑制効果の検討
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田明弘、西田眞佐志、細井創
2. 発表標題 エリスロポエチンの腎線維化と間質マクロファージ浸潤に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第56回日本小児腎臓病学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	西田 明弘  (Nishida Akihiro)	京都府立医科大学・小児科学教室・大学院生  (24303)	
研究協力者	家原 知子  (Iehara Tomoko)	京都府立医科大学・小児科学教室・教授  (24303)	

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