

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08605

研究課題名(和文)線維化組織微小環境の制御による慢性腎臓病進展機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文)Clarification of CKD progression by regulating fibrotic microenvironment

研究代表者

坂井 宣彦 (SAKAI, NORIHIKO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：60377421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腎線維化組織微小環境に焦点をあて、細胞骨格依存性シグナル伝達の意義の解明を目的とした。全身MRTF-A欠損および線維芽細胞特異的MRTF-B欠損マウス(MRTFkoMRTFiFBKO)を用いて、慢性腎臓病モデルを作成した。MRTFkoMRTFiFBKOでは腎線維化の抑制を認めた。また接着斑構成因子や線維化惹起因子発現抑制も認めた。腎線維芽細胞における細胞外基質や接着斑構成因子の発現において、TGFβ1-MRTF-SRFシグナルが寄与することを見出した。以上より、MRTF-SRFシグナルが腎線維芽細胞において、接着斑や細胞外基質産生の誘導を介して腎線維化進展に関連することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞骨格に関連するMRTF-SRFシグナルが、腎臓を構成する線維芽細胞機能を調節することで腎不全の原因となる線維化に関与するかを試みた。その結果、腎線維芽細胞において、MRTF-SRFシグナルが、腎線維芽細胞を活性化させ、腎線維化進展に寄与することを明らかにした。これは腎障害の原因に関わらない共通進展機序であり、現在増加の一途を辿っている末期腎不全患者数の抑制につながる新規治療法開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is characterized by an excessive wound healing response to organ damage, causing extracellular matrix deposition and accumulation of fibroblasts/myofibroblasts. In the process of renal failure, various renal diseases are characterized by taking a common process which is renal fibrosis. In this study, we attempted to elucidate the significance of cytoskeleton-dependent signal for renal fibrosis by regulating the biological properties of renal fibroblasts. As a result, it was revealed that the cytoskeleton-dependent MRTF-SRF signal by TGF-β1 in renal fibroblasts contributes to the expression of focal adhesion components and extracellular matrix such as collagen and fibronectin. In addition, systemic MRTF-A- and fibroblast-specific MRTF-B- deficiency attenuates renal fibrosis by inhibiting the expression of focal adhesion components and extracellular matrix. These results suggest that MRTF-SRF signaling in fibroblast might be a target to combat renal fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：線維化 線維芽細胞 接着斑

## 1. 研究開始当初の背景

線維化は臓器障害に対する過度の創傷治癒反応、すなわち細胞外基質沈着と細胞外基質産生能を有する細胞の集積を特徴とする。しかし、これら過度の創傷治癒反応をもたらす分子生物学的基盤は完全には同定されていない。なかでも、本邦における末期腎不全による慢性透析患者は30万人を超え、増加の一途を辿っている。近年、末期腎不全の予備軍として慢性腎臓病(CKD)が注目されている。このCKDが進展し腎不全に至る過程において、各種腎疾患はその病因を問わず、糸球体硬化および間質線維化という共通のプロセスをとることを特徴とする。以上より腎間質線維化進展機序の解明は、CKD進展に対する新規治療法確立につながる治療の標的として重要である。

## 2. 研究の目的

これまで我々は、脂質メディエーターであるリゾフォスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)が臓器固有細胞である腹膜中皮細胞や腎尿細管上皮細胞において、connective tissue growth factor (CTGF)産生を制御する事で腹膜線維化、および腎間質線維化に関与することを報告してきた(Sakai, et al., FASEB J 2013, Sakai, et al, Kidney Int 2017)。その過程で、CTGF産生機序において、細胞骨格依存性シグナルであるmyocardin-related transcription factor (MRTF)-A/B-serum response factor (SRF)シグナルを介することを見出した。そこで本研究では、細胞骨格依存性シグナルであるMRTF-SRFシグナルが、腎固有細胞であり、線維化の中心的役割を担う腎線維芽細胞の生物学的特性を調節することで腎間質線維化にはたす意義の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

まず、細胞骨格依存性シグナルであるMRTF-SRFシグナルの腎線維芽細胞にはたす意義を同定した。すなわち、線維化惹起分子の一つであるtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1で刺激し、コラーゲン架橋酵素であるlysyl oxidaseファミリー、細胞外基質(コラーゲン、ファイブロンネクチン)にはたす影響を検討した。さらに細胞骨格関連因子であり、細胞外周囲環境との情報伝達を担う接着斑構成因子(インテグリンやインテグリンキナーゼ; ILK)発現を検討した。くわえてCTGFや筋線維芽細胞への分化マーカーであるsmooth muscle actin (SMA)発現を検討した。最後に、線維芽細胞特異的にMRTF-Bを欠損するマウスをCol-creERT2とMRTF-B<sup>f/f</sup>マウスをかけあわせることで作成し、さらに全身MRTF-A欠損マウス(MRTF-A<sup>-/-</sup>)とかけ合わせることで、全身MRTF-A欠損かつ線維芽細胞特異的MRTF-B欠損マウス(MRTF-AkoMRTF-B<sup>iFBKO</sup>)を作成した。および対照マウス(MRTF-AwtMRTF-B<sup>f/f</sup>)を用いて、アデニン腎症マウスモデルを作成し、腎組織を採取、線維化に与える意義を検討した。

## 4. 研究成果

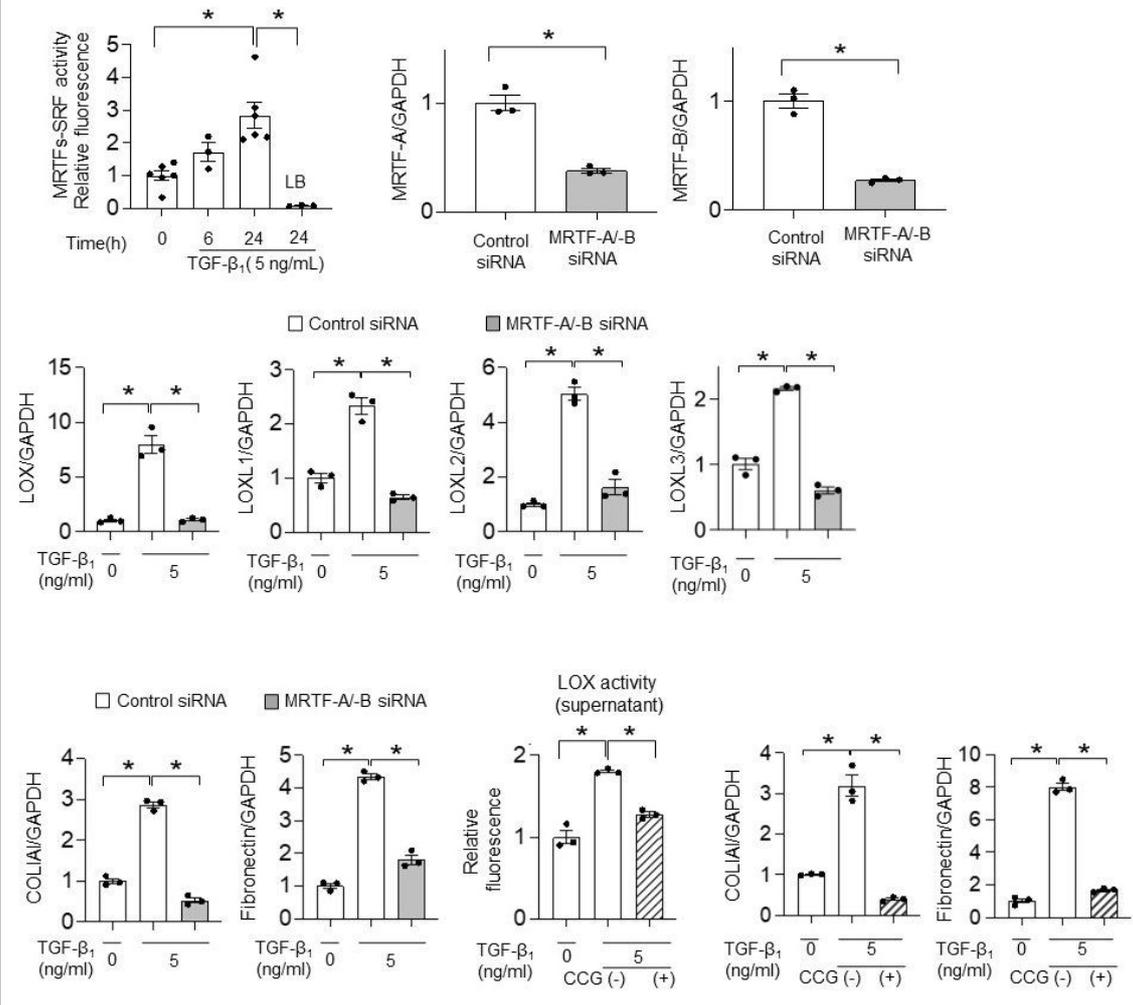
### (1) 腎線維芽細胞

まずTGF- $\beta$ 1刺激により、MRTF-SRFシグナル活性が上昇することをプロモーターアッセイにて確認した。またその増強はアクチン重合阻害因子latrunculin B処理にて抑制された。続いてTGF- $\beta$ 1刺激によりLOXファミリーおよび細胞外基質発現は増強した。一方で、これらはMRTF-A/BsiRNAダブルトランスフェクションにより、各々の発現は低下した(図1)。また各種インテグリンやILK発現もTGF- $\beta$ 1刺激により増加し、一方、MRTF-A/BsiRNAダブルトランスフェクションにより低下した(図2)。また、接着斑構成因子の抑制、すなわちILK阻害剤Cpd-22投与や各種インテグリンsiRNA処理によるMRTF-SRFシグナルにはたす役割を検討した。その結果、ILKや各種インテグリン阻害によるMRTF-SRFシグナル活性抑制、LOXファミリーや細胞外基質発現抑制を認めた(図3-4)。このことからMRTF-SRFシグナル依存性に発現した接着斑構成因子は、さらにMRTF-SRFシグナルを活性化するというポジティブフィードバック機構によりLOXファミリーや細胞外基質などの線維化関連因子が継続産生されることが示唆された。

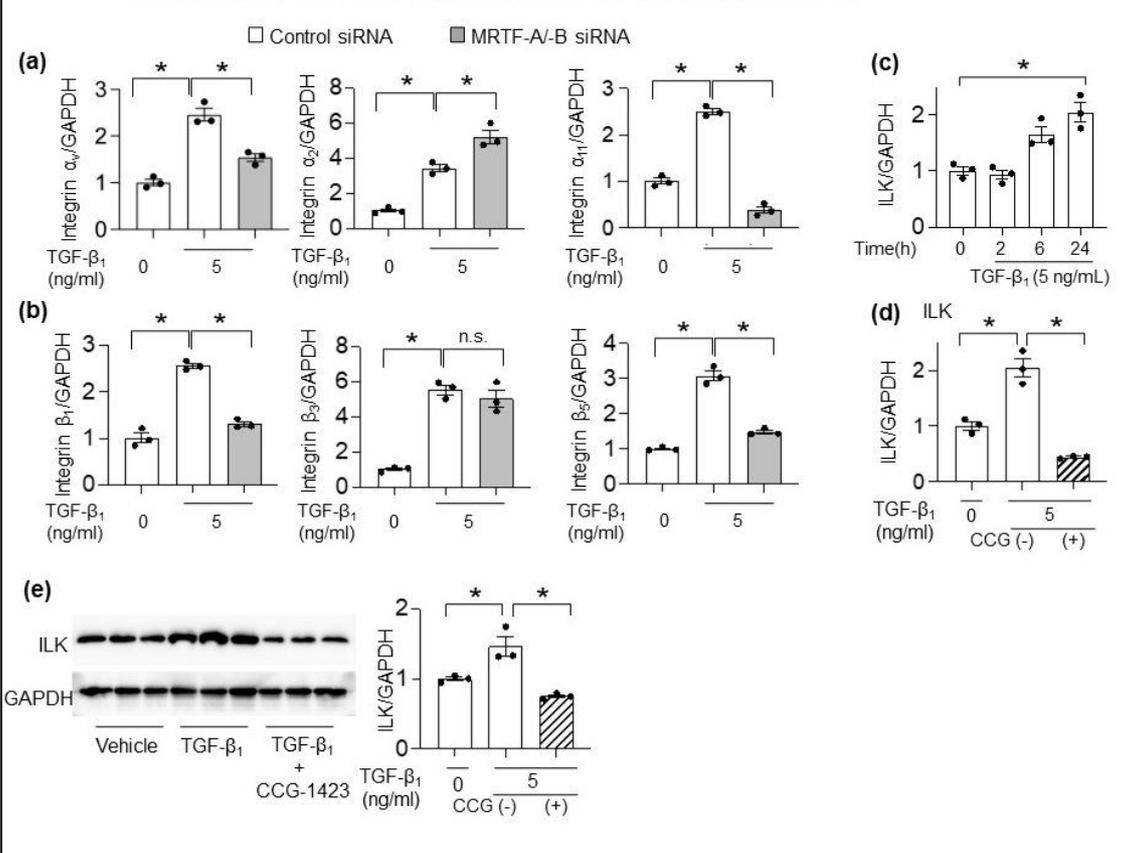
(2) アデニン腎症マウスモデル: アデニン経口投与によりアデニン腎症を作成した。腎ハイドロキシプロリン量およびI型プロコラーゲン発現量は経時的に発現増大を認めた。一方で、(MRTF-AkoMRTF-B<sup>iFBKO</sup>)においては(MRTF-AwtMRTF-B<sup>f/f</sup>)に比してその発現は低下した(図5)。また、腎内各種インテグリンやLOXファミリー発現に関しても、(MRTF-AkoMRTF-B<sup>iFBKO</sup>)においては(MRTF-AwtMRTF-B<sup>f/f</sup>)に比してその発現は低下した(図6)。

以上より、MRTF-SRFシグナルは、腎線維芽細胞におけるTGF- $\beta$ 1誘導性のポジティブフィードバック活性上昇により、接着斑構成因子やLOXファミリー、細胞外基質産生を介して腎間質線維化に寄与することを明らかにした(FASEB J, in press)。

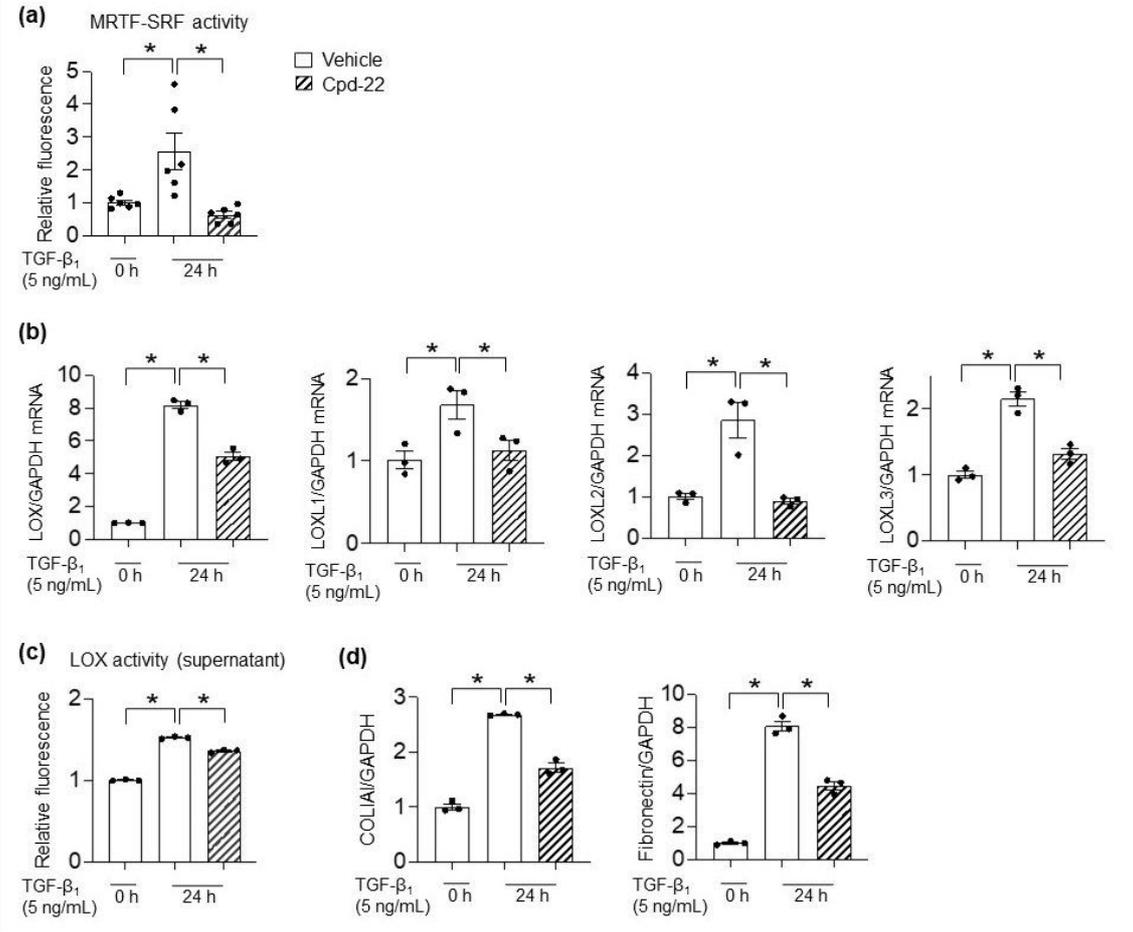
**Figure 1** TGF- $\beta_1$ -induced expressions of LOXs and ECM required the MRTF-SRF pathway.



**Figure 2** Knockdown of MRTF-A and MRTF-B suppressed the expressions of ECM-related integrins, ILK, and other FA components by TGF- $\beta_1$  stimulation.



**Figure 3** TGF- $\beta_1$ -induced activation of MRTF-SRF pathway and expressions of LOXs and ECM were dependent on ILK.



**Figure 4** Blockade of MRTF-regulated integrins suppressed TGF- $\beta_1$ -induced activation of MRTF-SRF pathway and expressions of LOXs and ECM.

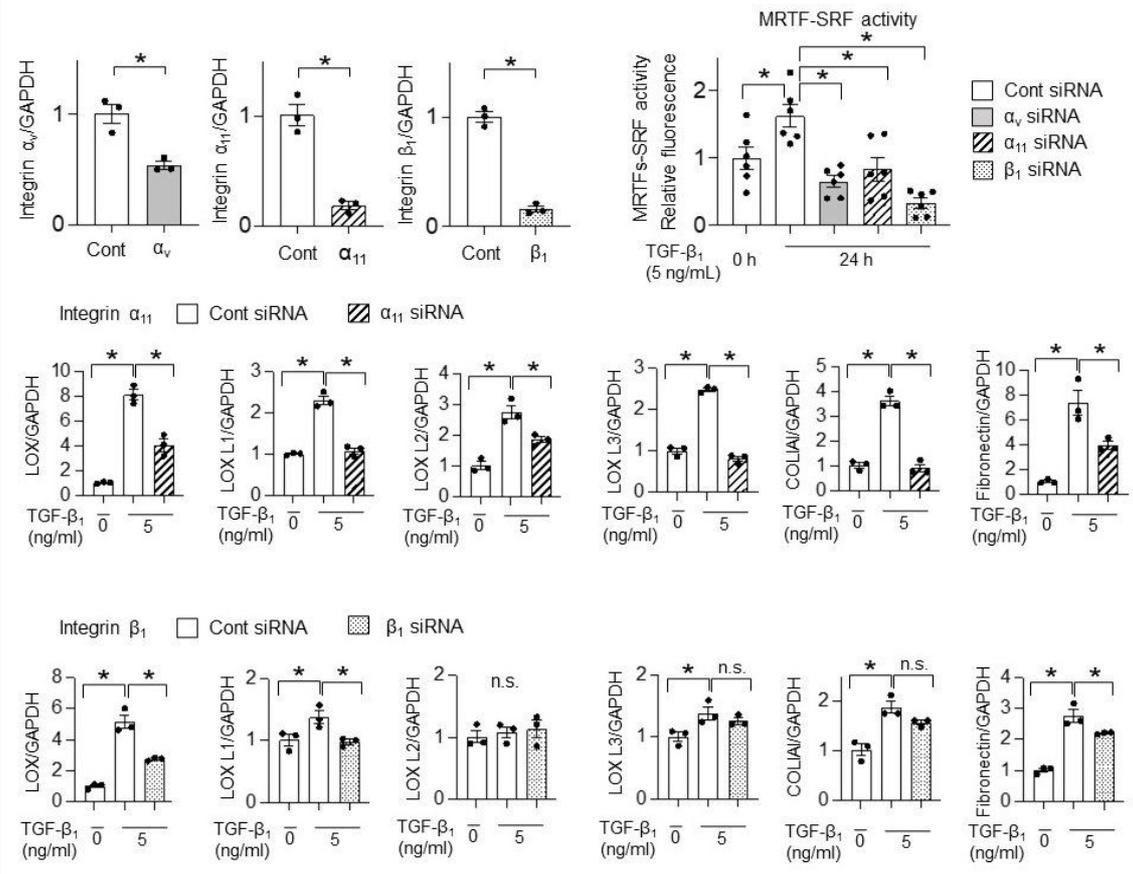


Figure 5 MRTF-SRF pathway in kidney has major roles in progressive renal fibrosis.

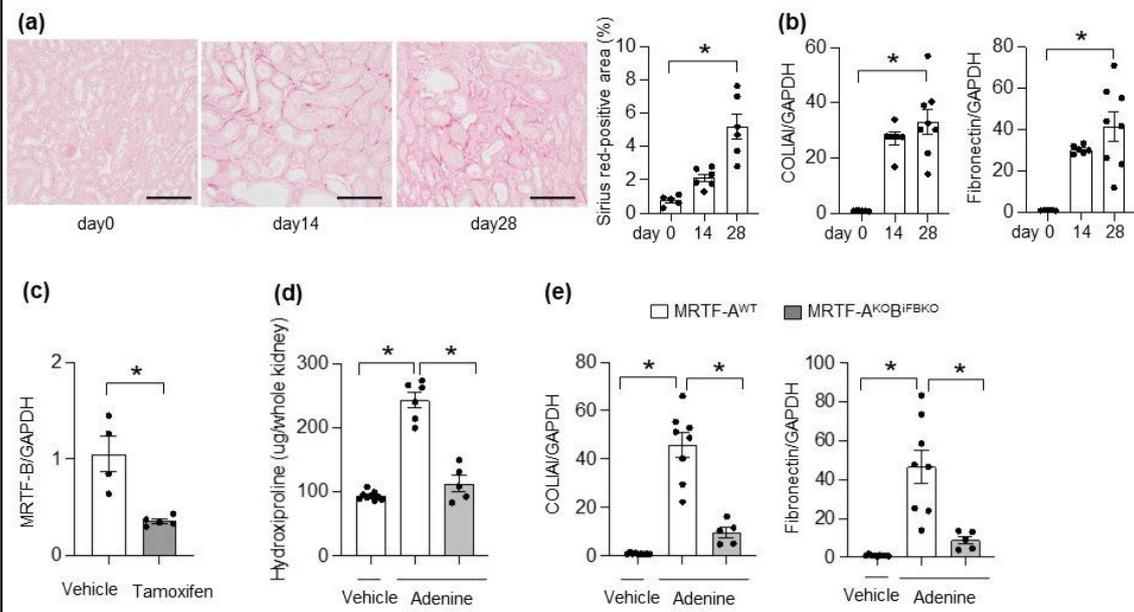
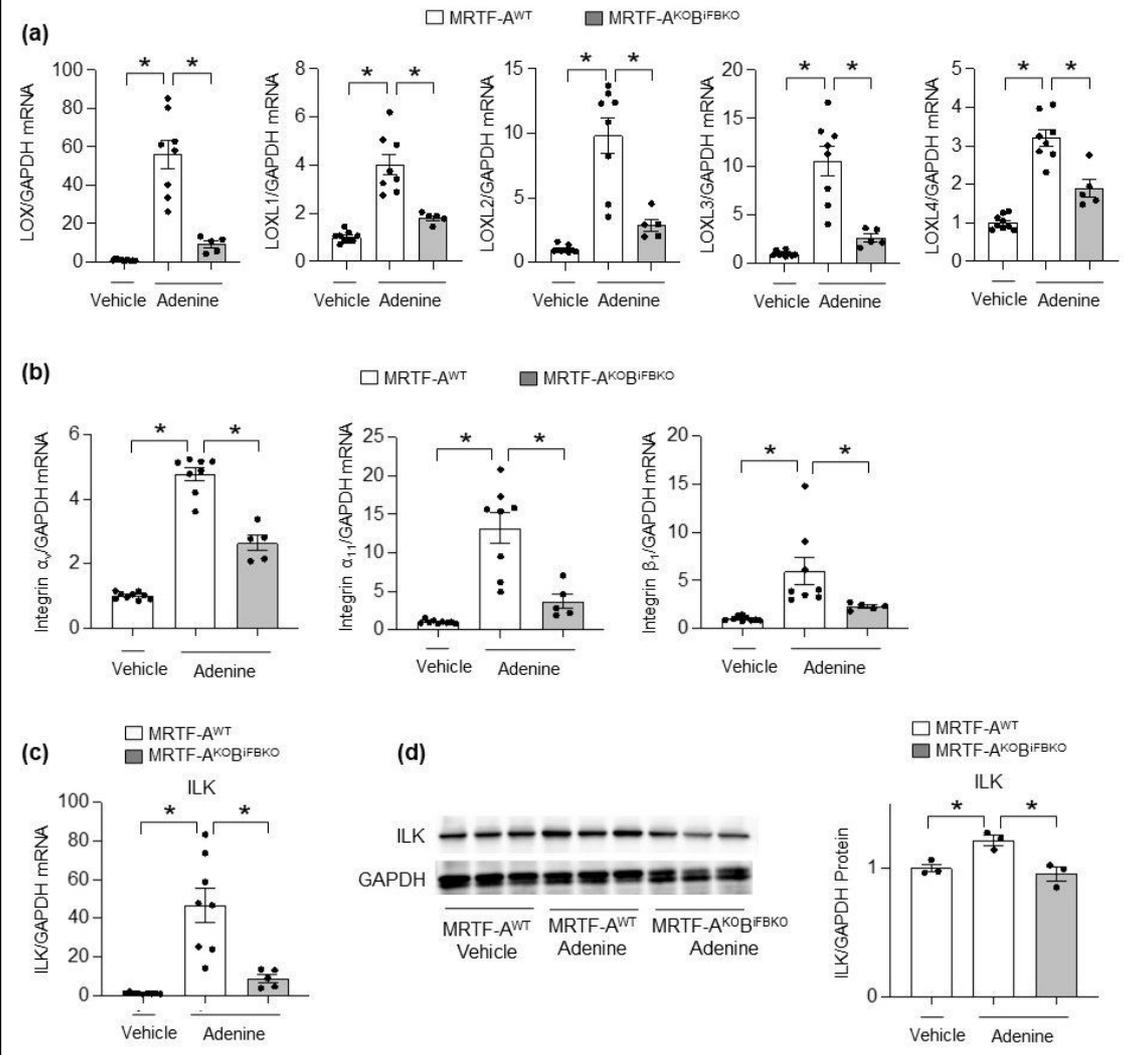


Figure 6 Upregulation of LOXs and FA components induced in renal fibrosis model required MRTF-A and MRTF-B.



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yuta Yamamura, Norihiko Sakai, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Myocardin-related transcription factor contributes to renal fibrosis through regulation of extracellular microenvironment surrounding fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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） 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 該当する
1. 著者名 Iwata Yasunori, Nakade Yusuke, Kinoshita Masashi, Sabit Hemragul, Nakajima Riho, Furuichi Kengo, Mita Masashi, Nakane Maiko, Sakai Norihiko, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Intra-Brain and Plasma Levels of L-Serine Are Associated with Cognitive Status in Patients with Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney Diseases	6. 最初と最後の頁 118 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000527798	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 Nakade Yusuke, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Mita Masashi, Nakane Maiko, Hamase Kenji, Suda Wataru, Toyama Tadashi, Kitajima Shinji, Hara Akinori, Shimizu Miho, Ogushi Chikako, Furuichi Kengo, Koshino Yoshitaka, Morita Hidetoshi, Hattori Masahira, Wada Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Increased levels of oral Streptococcus-derived d-alanine in patients with chronic kidney disease and diabetes mellitus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-022-26175-1	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 Hara Akinori, Wada Takashi, Muso Eri, Maruyama Shoichi, Kato Sawako, Furuichi Kengo, Yoshimura Kenichi, Toyama Tadashi, Sakai Norihiko, et al.	4. 巻 52
2. 論文標題 Effect of Low-Density Lipoprotein Apheresis on Quality of Life in Patients with Diabetes, Proteinuria, and Hypercholesterolemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Purification	6. 最初と最後の頁 373 ~ 381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000527900	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 Yamamura Yuta, Iwata Yasunori, Furuichi Kengo, Kato Takahiro, Yamamoto Naoki, Horikoshi Keisuke, Ogura Hisayuki, Sato Koichi, Oshima Megumi, Nakagawa Shiori, Miyagawa Taro, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Hara Akinori, Sakai Norihiko, Shimizu Miho, Horike Shinichi, Daikoku Takiko, Nishinakamura Ryuichi, Wada Takashi	4. 巻 36
2. 論文標題 Kif26b contributes to the progression of interstitial fibrosis via migration and myofibroblast differentiation in renal fibroblast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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) 10.1096/fj.202200355R	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 Axelsson Raja Anna, Wakimoto Hiroko, DeLaughter Daniel M., Reichart Daniel, Gorham Joshua, Conner David A., Lun Mingyue, Probst Clemens K., Sakai Norihiko, et al.	4. 巻 119
2. 論文標題 Ablation of lysophosphatidic acid receptor 1 attenuates hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2204174119	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 Sako Keisuke, Furuichi Kengo, Makiishi Shohei, Yamamura Yuta, Okumura Toshiya, Le Hong Thu, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Hara Akinori, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Shimizu Miho, Niimura Fumio, Matsusaka Taiji, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 102
2. 論文標題 Cyclin-dependent kinase 4-related tubular epithelial cell proliferation is regulated by Paired box gene 2 in kidney ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 45 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2022.03.022	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 Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Nakajima Yuki, Oshima Megumi, Nakagawa-Yoneda Shiori, Ogura Hisayuki, Sato Koichi, Minami Taichiro, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Yamamura Yuta, Miyagawa Taro, Hara Akinori, Shimizu Miho, Furuichi Kengo, Wada Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Anti-fibrotic potential of erythropoietin signaling on bone marrow derived fibrotic cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	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) 10.1186/s12882-021-02411-0	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 Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Yoneda Ikuko, Senda Yasuko, Sakai-Takemori Yukiko, Oshima Megumi, Nakagawa-Yoneda Shiori, Ogura Hisayuki, Sato Koichi, Minami Taichiro, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Yamamura Yuta, Miyagawa Taro, Hara Akinori, Shimizu Miho, Furuichi Kengo, Matsushima Kouji, Wada Takashi	4. 巻 537
2. 論文標題 D-Serine inhibits the attachment and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 50 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.078	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 Makiishi Shohei, Furuichi Kengo, Yamamura Yuta, Sako Keisuke, Shinozaki Yasuyuki, Toyama Tadashi, Kitajima Shinji, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Shimizu Miho, Hirose-Sugiura Tomoko, Kaneko Shuichi, Kato Yukio, Wada Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Carnitine/organic cation transporter 1 precipitates the progression of interstitial fibrosis through oxidative stress in diabetic nephropathy in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-88724-4	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 Yamamura Yuta, Furuichi Kengo, Murakawa Yasuhiro, Hirabayashi Shigeki, Yoshihara Masahito, Sako Keisuke, Kitajima Shinji, Toyama Tadashi, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Hosomichi Kazuyoshi, Murphy Philip M., Tajima Atsushi, Okita Keisuke, Osafune Kenji, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of candidate PAX2-regulated genes implicated in human kidney development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-88743-1	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 Miyake Taito, Sakai Norihiko, Tamai Akira, Sato Koichi, Kamikawa Yasutaka, Miyagawa Taro, Ogura Hisayuki, Yamamura Yuta, Oshima Megumi, Nakagawa Shiori, Sagara Akihiro, Shinozaki Yasuyuki, Toyama Tadashi, Kitajima Shinji, Hara Akinori, Iwata Yasunori, Shimizu Miho, Furuichi Kengo, Kaneko Shuichi, Wada Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Trehalose ameliorates peritoneal fibrosis by promoting Snail degradation and inhibiting mesothelial-to-mesenchymal transition in mesothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71230-4	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 Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Yoneda Ikuko, Satou Kenji, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 The increased frequency of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with low MIC of beta-lactam antibiotics isolated from hospitalized patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 604 ~ 610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.01.016	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 Hara Akinori, Shimizu Miho, Hamaguchi Erika, Kakuda Hirokazu, Ikeda Kenzo, Okumura Toshiya, Kitagawa Kiyoki, Koshino Yoshitaka, Kobayashi Motoo, Takasawa Kazuya, Hisada Yukimasa, Toyama Tadashi, Iwata Yasunori, Sakai Norihiko, Wada Takashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Propagandism administration for patients with type 2 diabetes and nephropathy: A randomized pilot trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology, Diabetes & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e00159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edm2.159	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 Iwata Yasunori, Kitajima Shinji, Yamahana Junya, Shimomura Shuji, Yoneda Nakagawa Shiori, Sakai Norihiko, Furuichi Kengo, Ogura Hisayuki, Sato Koichi, Toyama Tadashi, Yamamura Yuta, Miyagawa Taro, Hara Akinori, Shimizu Miho, Ohkawa Ryunosuke, Kurano Makoto, Yatomi Yutaka, Wada Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Higher serum levels of autotaxin and phosphatidylserine specific phospholipase A in patients with lupus nephritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 231 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14031	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清水美保、宮川太郎、北島信治、遠山直志、原章規、岩田恭直、坂井宣彦、和田隆志
2. 発表標題 糖尿病性腎症における腎イベント発症例の心血管予後に、高血圧と腎組織における細動脈内膜肥厚が及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川詩織、岩田恭宜、大島恵、小倉央行、佐藤晃一、山村雄太、宮川太郎、北島信治、遠山直志、原章規、坂井宣彦、清水美保、和田隆志
2. 発表標題 ISN/RPS改訂組織分類によるループス腎炎の長期予後の検討
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井宣彦、和田隆志
2. 発表標題 造血器腫瘍性疾患における腎障害
3. 学会等名 日本腎臓学会西部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井宣彦、和田隆志
2. 発表標題 発症機序に基づいた、薬剤性腎障害へのアプローチ
3. 学会等名 日本内科学会北陸地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川詩織、北島信治、加治貴彰、大島恵、小倉央行、佐藤晃一、山村雄太、宮川太郎、遠山直志、原章規、北川清樹、岩田恭宜、坂井宣彦、清水美保、和田隆志
2. 発表標題 RPGNを呈するループス腎炎に対するアフェレシス療法の意義
3. 学会等名 日本アフェレシス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀越 慶輔, 坂井 宣彦, 小倉 央行, 佐藤 晃一, 宮川 太郎, 山内 博行, 北島 信治, 遠山 直志, 原 章規, 岩田 恭宜, 清水 美保, 大田 聡, 石田 陽一, 和田 隆志
2. 発表標題 短時間腹膜平衡試験による腹膜機能評価および予後予測
3. 学会等名 日本透析医学会
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
研究分担者	和田 隆志  (WADA TAKASHI)  (40334784)	金沢大学・その他部局等・その他    (13301)	

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		
米国	マサチューセッツ総合病院		