

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08616

研究課題名(和文)メカノバイオロジーに基づく腎臓病の病態解明と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis and development of new diagnostic and therapeutic strategy of kidney disease based on mechanobiology

研究代表者

長瀬 美樹 (NAGASE, Miki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60302733

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)：腎臓の細胞は血流や血圧、尿流に起因する様々なメカノ刺激にさらされているが、その感知応答機構は不明な点が多い。今回、メカノセンサー分子Piezo2に着目し、正常腎においては糸球体メサンギウム細胞と傍糸球体細胞(レニン産生細胞)に限局して発現すること、発生過程ではFoxd1陽性の後腎間葉前駆細胞とそのリニエッジ細胞群に発現すること、脱水症や糸球体高血圧を伴う高血圧性腎障害モデルで細胞特異的に増減すること、降圧薬治療で腎障害の抑制とともに低減することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病・高血圧などを発症基盤とする慢性腎臓病(CKD)や、救急医療や集中治療室患者で頻度の高い急性腎障害(AKI)は、患者の生命予後やQOLに大きく影響する疾患であるが、未だ有効な治療法がない。現在Piezo2阻害の影響を解析しているが、メカノ感受応答システムの入り口にあたるメカノセンサーPiezo2は、腎臓病治療の新たな標的として有望と考えられる。CKDやAKIに対し、病態に基づく特効薬が開発されれば、透析を必要としない健康な長寿社会が期待される。

研究成果の概要(英文)：Kidney cells are exposed to various mechanical stimuli caused by blood flow, blood pressure, and urinary flow, but their sensing and response mechanisms remain largely elusive.

In this study, we focused on the mechanosensor molecule Piezo2, and found that in the normal kidney, Piezo2 expression was restricted to the glomerular mesangial cells and juxtaglomerular renin-producing cells. In the developing metanephros, Piezo2 was expressed in the Foxd1-positive mesenchymal progenitor cells and their lineage cells. In dehydration mice, its expression was decreased in the mesangial cells, while increased in the renin cells. In hypertensive nephrosclerosis models with glomerular hypertension, Piezo2 expression was enhanced in the mesangial cells, some renin-producing cells, and perivascular collagen-producing cells, which was normalized by antihypertensive treatment with mineralocorticoid receptor antagonist. These results suggest the role of Piezo2 in the pathogenesis of kidney diseases.

研究分野：腎臓病学

キーワード：メカノバイオロジー Piezo2 メサンギウム細胞 傍糸球体レニン産生細胞 血管外膜線維芽細胞 急性腎障害 慢性腎臓病 高血圧性腎障害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)や急性腎障害(acute kidney injury: AKI)が注目されている。CKDは蛋白尿や糸球体濾過量(GFR)の低下が慢性的に見られる病態で、糖尿病や高血圧が発症基盤となることが多く、患者数1300万人ともいわれるcommon diseaseである。CKDを放置すると最終的に末期腎不全で透析や腎移植が必要となり、また心脳血管疾患による死亡リスクが高まる。現在、慢性透析患者は33.4万人を突破し、透析にかかる医療費は年間約1兆5700億円に達する。そこで、CKDの段階で食い止め、心脳血管疾患による死亡、末期腎不全への移行を未然に防ごうという取り組みが推し進められている。一方、侵襲を契機に急性に腎機能が低下するAKIは、救急医療やICU患者で頻度が高く、多臓器不全や敗血症に併発する場合には致命率が極めて高い。AKIからCKDに移行する例もある。しかしながら、CKDにもAKIにも特効薬がないのが現状で、分子機序に根ざした新たな治療法の開発が喫緊の課題である。

最近のメカノバイオロジー研究の進歩により、メカノ刺激により開閉が制御されるイオンチャネルが続々と同定され、圧センサーの本体や疾病との関連が解明されてきた。腎臓の細胞は、血流や尿流に起因する様々なメカノ刺激(流れずり応力、伸展力、圧力など)に絶えずさらされており、メカノ刺激の変容がCKDやAKIの病態に寄与する可能性が推察されるが、腎細胞におけるメカノ感知応答機構は不明な点が多い。そこで本研究では、「メカノ感受応答システムの入りにあたるメカノセンサーを標的とした腎臓病の診断法・治療法開発は可能か?」という問いを設定した。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究ではメカノセンサー分子、特にPiezo2に着目し、正常成体マウス、胎生期マウス後腎、AKIやCKD疾患モデルを用いて、腎臓におけるPiezo2の発現を解析し、AKIやCKDの病態解明と新規診断法・治療薬開発を目指す。

本研究目的が達成されると、Piezo2の活性制御薬が、AKI・CKD・難治性高血圧に対する新規治療標的につながる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、上記目的を達成するため、メカノセンサー分子、特にPiezo2に着目し、腎臓内局在や上流・下流因子の決定、急性腎障害や慢性腎臓病の動物モデルや阻害薬、遺伝子改変マウスを用いた解析など、戦略的にアプローチする。

目標 : 正常マウスの腎臓や発生過程の後腎におけるPiezo2の発現局在の解析

腎臓におけるPiezo2 mRNA発現をRNAscope in situ hybridization法で解析した。Piezo2-GFPレポーターマウスを用いて、Piezo2の蛋白レベルでの発現を解析した。発現細胞の同定には細胞特異的マーカーとの二重染色を行った。

目標 : 糸球体内圧が増減する腎障害病態モデルにおけるPiezo2の発現の解析

腎臓のPiezo2発現がどのような腎障害モデルで増減するか、糸球体内圧が低下する脱水モデルと、糸球体内圧が上昇する高血圧性腎障害ラットを用いて解析し、降圧薬治療の影響についても検討した。

目標 : 遺伝子改変マウスを用いたPiezo2の機能解析

発現細胞特異的Piezo2 KOマウスの樹立を進め、腎障害モデルを作製し、表現型を対称マウスと比較し、腎病変におけるPiezo2の機能的役割を解析した。

4. 研究成果

まず、正常マウス (C57BL/6J) の腎臓における Piezo2 mRNA 発現の局在を RNAscope in situ hybridization 法で解析したところ、糸球体に限局して発現していた。尿細管、集合管の細胞には発現していなかった。糸球体における発現細胞を同定するために細胞特異的マーカーとの二重染色を行ったところ、Piezo2 は主にメサンギウム細胞と傍糸球体レニン産生細胞に局在していた。糸球体内皮細胞にも若干発現していたが、ポドサイトには発現していなかった。Piezo2-GFP レポーターマウスを用いた検討で、Piezo2 が蛋白レベルでもメサンギウム細胞と傍糸球体レニン産生細胞に発現していることが確認された。胎生期には、後腎の Foxd1 陽性間葉系前駆細胞と、そこから派生するメサンギウム細胞、レニン産生細胞に発現が認められた。

脱水モデルを作製すると、メサンギウム細胞における Piezo2 発現は減弱し、レニン産生細胞ではレニン発現領域拡大とともに Piezo2 発現は増強した。

培養レニン産生細胞 (As4.1 細胞) で Piezo2 をノックダウンすると、静的培養条件でもストレッチ負荷条件下でも Ren1 発現は減少した。

以上、Piezo2 がメサンギウム細胞とレニン産生細胞に発現することが mRNA、蛋白レベルで示された。糸球体や輸入細動脈の内圧・血流量が低下するマウスモデルにおいて、Piezo2 発現が細胞特異的に増減し、特にレニン産生と密接に関わっていたことから、Piezo2 が腎臓の糸球体濾過や体液バランスの制御において重要な役割を担うことが推察された。

次に高血圧性腎障害モデルにおける Piezo2 発現の変化を検討した。非ステロイド型鉱質コルチコイド受容体 (MR) 拮抗薬エサキセレノンの効果も解析した。4 週齢の Dahl 食塩感受性ラットを以下の 3 群にランダムに割り当てた。1) 0.3% NaCl 食投与群 (DSN)、2) 8% NaCl 食投与群 (DSH)、3) 8% NaCl 食 + エサキセレノン (1 mg/kg/日相当 混餌) 投与群 (DSH+E)。6 週間後、食塩負荷 Dahl 食塩感受性ラット (DSH) は高血圧、アルブミン尿、糸球体硬化、血管障害、炎症細胞浸潤、血管周囲線維化、間質線維化を呈した。エサキセレノンは血圧を部分的であるが有意に低下させ、アルブミン尿や腎障害を改善した。DSN ラットでは Piezo2 は Pdgfrb 陽性メサンギウム細胞および Ren1 陽性細胞に発現しており、これらの細胞における Piezo2 発現は DSH ラットで増強した。さらに DSH ラットの腎内小動脈および細動脈周囲の外膜層に Piezo2 陽性細胞が集積していた。これらの血管周囲の細胞は Pdgfrb、Col1a1、および Col3a1 陽性だったが、Acta2 (SMA) 陰性であった。すなわち、筋線維芽細胞とは異なる間葉系細胞に発現していた。ED1 (マクロファージマーカー)、CD3 (T 細胞マーカー)、TUBB3 (神経マーカー) とは重ならなかった。DSH 群における Piezo2 発現増加はエサキセレノン治療によって正常化した。

雌ラットでも雄ラットと同様の結果が得られた。

他の高血圧モデルとして、自然発症高血圧ラット (SHR)、食塩負荷脳卒中易発症自然発症高血圧ラット (SHRSP-H) と対照群の Wistar Kyoto ラット (WKY) の腎臓でも検討した。10 週齢の時点では WKY、SHR とともにアルブミン尿の増加なく、腎病理像もほぼ正常であった。Piezo2 の発現はメサンギウム細胞やレニン産生細胞に限局していた。一方、食塩負荷 SHRSP (SHRSP-H) は DSH と同様、高血圧、アルブミン尿、糸球体硬化、血管・間質障害、線維化を発症していた。メサンギウム細胞やレニン産生細胞での Piezo2 発現は増加し、血管外膜の Pdgfrb 陽性、Collagen 1/3 陽性の間葉系細胞 (おそらく線維芽細胞) にも強発現していた。

食塩負荷 Dahl 食塩感受性ラットや食塩負荷 SHRSP は全身血圧上昇とともに糸球体高血圧を生じやすく、糸球体障害易発症性に深く関わること、一方、本態性高血圧症のモデルである SHR では全身血圧は上昇するが糸球体高血圧は生じにくい。糸球体障害、間質障害も発症しにくいとされている。今回の結果から、Piezo2 の糸球体における発現は糸球体内圧と関連する可能性が示唆された。

培養細胞を用いた検討も行った。ATCC より購入したマウスメサンギウム細胞株 (MES 13) では Piezo2 発現は糸球体分画での発現に比べかなり低かった。そこで C57BL/6J マウスより初代培養メサンギウム細胞を調整して解析したところ、Piezo2 は糸球体分画と同程度に高発現していた。Piezo2 siRNA トランスフェクションでは、Piezo2 ノックダウンにより Tgfb1 発現は上昇し、Piezo2 ノックダウンと周期的伸展刺激により Tgfb1 発現は相加的に上昇した。

以上より、Piezo2 が高血圧性糸球体硬化や血管障害、腎硬化の発症過程に関与する可能性が示唆された。

現在、メサンギウム細胞を含む Piezo2 KO マウスの樹立を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mochida Y, Ochiai K, Nagase T, Nonomura K, Akimoto Y, Fukuhara H, Sakai T, Matsumura G, Yamaguchi Y, Nagase M	4. 巻 12
2. 論文標題 Piezo2 expression and its alteration by mechanical forces in mouse mesangial cells and renin-producing cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-07987-7	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 Nagase M, Nagase T, Tokumine J, Saito K, Sunami E, Shiokawa Y, Matsumura G.	4. 巻 97
2. 論文標題 Formalin-free soft embalming of human cadavers using N-vinyl-2-pyrrolidone: perspectives for cadaver surgical training and medical device development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁 273-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-022-00664-9	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 Miyamoto M, Nagase M, Watanabe I, Nakagawa H, Karita K, Tsuji DH, Montagnoli AN, Matsumura G, Saito K.	4. 巻 97
2. 論文標題 Excised human larynx in N-vinyl-2-pyrrolidone-embalmed cadavers can produce voiced sound by pliable vocal fold vibration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁 347-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-021-00646-3	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 Watanabe K, Tokumine J, Lefor AK, Nakazawa H, Yamamoto K, Karasawa H, Nagase M, Yorozu T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Photoacoustic needle improves needle tip visibility during deep peripheral nerve block.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87777-9	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 Ochiai Koji, Mochida Yuki, Nagase Takashi, Fukuhara Hiroshi, Yamaguchi Yoshihiro, Nagase Miki	4. 巻 46
2. 論文標題 Upregulation of Piezo2 in the mesangial, renin, and perivascular mesenchymal cells of the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rats and its reversal by esaxerenone	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1234 ~ 1246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-023-01219-9	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 長瀬 美樹	4. 巻 54
2. 論文標題 インタビュー 肉眼解剖学実習の意義と基礎研究を続けることの大切さ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 杏林医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11434/kyorinmed.54.11	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 長瀬 美樹	4. 巻 53
2. 論文標題 『医学部基礎医学教室の最前線 肉眼解剖学教室』Part . 肉眼解剖学教室の研究紹介	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 杏林医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 131 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11434/kyorinmed.53.131	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 長瀬 美樹	4. 巻 53
2. 論文標題 『医学部基礎医学教室の最前線?肉眼解剖学教室』Part . 解剖学教育と学生のリサーチマインド育成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 杏林医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11434/kyorinmed.53.139	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 長瀬 美樹	4. 巻 53
2. 論文標題 『医学部基礎医学教室の最前線 肉眼解剖学教室』Part . 解剖学実習における新たな取り組み	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 杏林医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 147 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11434/kyorinmed.53.147	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 大庭 梨菜、長瀬 美樹	4. 巻 93
2. 論文標題 特集 尿管と腎線維化 【腎線維化を理解するための基礎】 尿管と間質の構造と機能	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 822 ~ 828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24479/kd.0000000543	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 長瀬美樹
2. 発表標題 鉍質コルチコイド受容体活性化と食塩感受性高血圧、慢性腎臓病
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長瀬美樹
2. 発表標題 MR関連高血圧の新たな展開
3. 学会等名 第51回日本腎臓学会 東部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長瀬美樹
2. 発表標題 鉍質コンチコイド受容体活性化と慢性腎臓病
3. 学会等名 第56回日本高血圧関連疾患モデル学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagase M
2. 発表標題 Mechanical forcees acting on renal cells and their sensing mechaniam.s .
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 126th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists the 98th Annial Meeting of the Physiological Society（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagase M
2. 発表標題 Physiological and pathological roles of Piezo2 in the kidney.
3. 学会等名 International symposium on mechanobiology for human health : 8 years progress in the AMED-CREST/PRIME project on mechanobiology.（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野仁之、長瀬美樹
2. 発表標題 腎系球体上皮細胞におけるMyo10の機能解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 持田勇希, 長瀬美樹, 山口芳裕
2. 発表標題 メカノセンサーPiezo2の体液恒常性維持への関与
3. 学会等名 第50回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mochida Y, Ochiai K, Nagase M
2. 発表標題 Piezo2 expression and its alteration by mechanical forces in mouse mesangial cells and renin-producing cells.
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 持田勇希, 落合剛二, 長瀬美樹
2. 発表標題 Piezo2は糸球体メサンギウム細胞とレニン産生細胞に発現し、糸球体内圧低下に伴い細胞特異的に増減する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長瀬美樹
2. 発表標題 解剖学でキャリアをどう築くか？内科医から転向した解剖学教員からの提言.
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長瀬美樹
2. 発表標題 高血圧性腎障害モデルにおけるポドサイト障害とそのメカノ感受応答機構
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会・第36回日本生体磁気学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 長瀬美樹（分担）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 疾患に挑むメカノバイオロジー	

1. 著者名 長瀬美樹（分担）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 436
3. 書名 非腫瘍性疾患病理アトラス 腎	

〔産業財産権〕

〔その他〕

腎臓におけるメカノチャネルPiezo2の発現とその役割の解明 http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/news/2022/03/news220330piezo2.php

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