

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08633

研究課題名(和文)慢性腎臓病進展における心腎連関の機序解明

研究課題名(英文)Evaluation of cardiorenal syndrome in progression of chronic kidney disease

研究代表者

横井 秀基 (Yokoi, Hideki)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90378779

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)：本研究では心腎連関の分子機序解明を目的として、dnNRSF-Tg心不全マウスにおいて、片腎摘を行った後に腎動脈の虚血再灌流を行った。心不全マウスにおいては野生型マウスと比して、血清Crと血清BUNは有意な上昇を認め腎機能が悪化していた。また心不全マウスでは、全腎RNAにおいてCcl2、Lcn2の発現上昇を認め、炎症ならびに尿細管障害が増強していることが示唆された。これらの結果から心不全状態において腎障害が発症すると炎症反応の増悪を伴い腎機能がさらに悪化することが示された。さらに全腎のマイクロアレイではPsma1, Lrit1, Sdr16c6が増加することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性心不全がある患者さんは腎機能が悪いことが多く、また心不全の増悪時には腎機能も悪化することが分かっていました。本研究は心不全状態の場合に、腎動脈を一時的に阻血し再灌流することにより腎臓に障害を与えるモデルを使用して、腎機能がなぜ悪くなるのかについての機序解明を目的とした研究です。本研究の成果により、心不全患者の腎機能を早期に発見するマーカーの検出や、機序解明により腎機能悪化防止できる治療法の開発につなげることを目標としています。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed ischemia-reperfusion of the renal arteries after unilateral nephrectomy in dnNRSF-Tg heart failure mice in order to elucidate the molecular mechanism of the cardio-renal connection. Serum Cr and serum BUN were significantly elevated in heart failure mice compared to wild-type mice, indicating that renal function was aggravated in heart failure mice. Moreover, in heart failure mice, increased expression of Ccl2 and Lcn2 was observed in total renal RNA, suggesting enhanced inflammation and tubular damage. These results indicate that renal function worsens with exacerbation of inflammatory reaction when renal injury develops in heart failure. In addition, we performed microarray study showing the elevation of Psma1, Lrit1, and Sdr16c6 expression in the whole kidney.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：心腎連関 慢性心不全 急性腎障害 虚血再灌流障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において、心不全の増加も注目され (De Meyer, et al. Heart Fail Rev 2010;15:423)、近年、心臓と腎臓の生理学的・病理学的な密接な関係性を「心腎連関」と呼称し、包括的な病態理解・治療介入探索が検討されるようになってきている。心臓・腎臓の一方に生じた障害が、他方にも影響して障害を引き起こす cardio-renal syndrome (CRS) という疾患概念も広く受け入れられている (Ronco, et al. J Am Col Cardiol 2008;52:1527)。本研究は、慢性心不全が慢性の腎機能障害をきたす CRS type2 のメカニズムに注目した。CRS type2 の病態においては、心不全による全身の慢性炎症、交感神経活性化、renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) 活性化、心拍出量低下、全身静脈圧上昇などが腎臓に波及

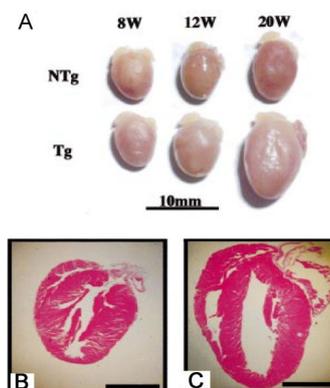


図 1 dnNRSF-Tg マウスの心臓の肉眼所見 (A の Tg) と顕微鏡所見 (B: nonTg, C: Tg) (Kuwahara. EMBO J 2003;22:6310 より)

し、腎障害を生じると考えられているが (Cruz, et al. Contrib Nephrol 2013;182:117)、不明な点も多い。臨床的に慢性心不全患者において慢性腎障害の発症は多いが、臨床試験からみた治療標的は明確でない点がある。RAS 阻害薬は慢性腎臓病ならびに心不全治療として有用であり、一例として SOLVD 試験では血清 Cr 上昇を起しやすいが腎予後は変えず、生命予後を改善させたとされる (Bowling et al. Int J Cardiol 2013;167:151)。一方 ATLAS 試験では ACE 阻害薬群は腎機能低下や高 K 血症を認め、RAAS 阻害薬は万能ではないことを示している (Massie et al. Arch Intern Med 2001;161:165)。近年注目を集めている neprilysin/ARB は、ナトリウム利尿ペプチドを増加させる薬剤である。PARADIGM-HF において neprilysin/ARB は蛋白尿を増加させるが eGFR の低下速度を減少させたと報告され (Voors et al. Eur J Heart Fail 2015;17:510)、腎保護の機序解明が期待されている。

研究当初 CRS type2 の病態をマウスで実証することを目的として、心不全を発症する Dominant-negative neuron-restrictive silencer factor (NRSF) トランスジェニック (dnNRSF-Tg) マウスに着目した (Kuwahara, et al. EMBO J 2003;22:6310)。NRSF は atrial natriuretic peptide (ANP) などの胎児型心筋遺伝子の抑制因子であり、dominant negative 体を用いて抑制することによりこれらの遺伝子発現が上昇し、dnNRSF-Tg マウスは生後 12-20 週に心筋肥大と心収縮不全を発症し EF は 30% 程度に低下し、不整脈を発症する (図 1)。この心不全マウスの腎病変については報告されていない。

慢性心不全状態が腎疾患にどのような影響を与えるのかは明らかではない。また、動物モデルも transverse aortic constriction (TAC) による心不全モデルが報告されているが (Zhao et al. Kidney Int 2019;95:815)、TAC は急速に腎血流を変化させるために、臨床に近いモデルとは考えにくい。

これまで心腎連関の重要な因子の一つとして注目されてきた分子として ナトリウム利尿ペプチドがある。ナトリウム利尿ペプチドは心不全で増加し、腎臓に作用しナトリウム・水利尿と血管拡張による血圧低下作用を示す。さらに申請者らは、ナトリウム利尿ペプチドはポドサイトにも作用し、RAAS 系に拮抗することも示してきた (図 2, Kato, Yokoi et al. Sci Rep 2017)。しかしながら心腎連関においてナトリウム利尿ペプチドがど

の程度重要であるかについては不明であった。

そのため、研究当初における学術的な問いとしては以下の通りであった。

(1) ゆっくり進行する**慢性心不全動物モデル**において腎病変はどのようなものであるか。

(2) 慢性心不全モデルに**閉塞性腎障害、虚血再灌流障害**を起こすことでどのような腎病変となるのか。

(3) また変化があるとすれば**心腎連関の分子メカニズム**はどのようにになっているか。

2. 研究の目的

慢性心不全動物モデルにおいて種々の腎障害を惹起し、腎病変の変化を検討し、心腎連関を構成する因子を同定し、その分子の機能解析を行うことを目的とする。

dnNRSF-Tg マウスに一側尿管結紮、虚血再灌流を行い、慢性心不全時における腎障害の変化を詳細に検討する。心臓と腎臓をつなぐ因子を解析するために、**腎臓のマイクロアレイ**を行い、候補因子を探索することとした。

3. 研究の方法

1) 心不全マウスの腎病変の検討

dnNRSF-Tg マウスの生後 16 週令の血清 Cr、尿量、全腎の mRNA 発現と腎組織学的解析を行う。

2) 心不全マウスの一側尿管結紮における腎病変の解析

10 週令の dnNRSF-Tg マウスもしくは野生型マウスに一側尿管結紮もしくは偽手術を行い、10 日後の腎病変を検討する。一側尿管結紮は主に尿細管間質病変を起こすことから主にその病変を中心に解析する。変化がある場合は、炎症細胞浸潤や遺伝子発現変化を詳細に検討する。

3) 心不全マウスの虚血再灌流障害における腎病変の解析

16 週令の dnNRSF-Tg マウスもしくは野生型マウスに右腎摘出を行い 7 日後に 45 分の腎動脈虚血を起こした後再灌流もしくは偽手術を行い、その 3 日後に解析した。さらに、全腎組織を用いて、マイクロアレイによって野生型と dnNRSF-Tg マウスとの間で変化の大きい遺伝子群を抽出し、解析を行った。

4. 研究成果

1) 心不全マウスの腎病変の解析

16 週令の dnNRSF-Tg マウスの腎組織所見は正常であり (図 2) 尿蛋白もコントロールマウスと比較して差を認めなかった。全腎における遺伝子発現の解析で、TGF- β 1, fibronectin, IL-1 β , TNF- α , CCL2 は差を認めない。

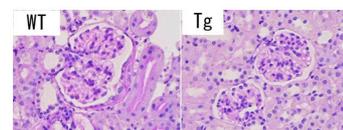


図 2 dnNRSF-Tg マウスの腎組織 PAS 染色所見、Tg マウスの光顕所見は正常である。

2) 心不全マウスの一側尿管結紮における腎病変の解析

10 週令の dnNRSF-Tg マウスもしくは野生型マウスに左尿管の一側尿管結紮を行い、10 日後に腎病変を検討した。結紮腎の腎重量、体重、全腎の IL-1 β 、Col1a1、TGF- β 1、Emr1 の遺伝子発現を検討したところ、両群に差を認めなかった。

3) 心不全マウスの虚血再灌流障害における腎病変の解析

16週令の dnNRSF-Tg マウスもしくは野生型 (wild-type; WT) マウスに右腎摘出を行い7日後に45分の腎動脈虚血もしくは偽手術を起こした後再灌流 (ischemic reperfusion injury; IRI) を行い、その3日後に解析した。IRI dnNRSF-Tg マウスはIRI WT に対して血清Cr値が有意に上昇しており腎機能低下が認められた(図3)。さらにIRI dnNRSF-Tg マウスではIRI後の死亡率が有意に高かった。また、組織学的検討についてもIRI dnNRSF-Tg マウスは腎間質に円柱の形成、尿細管の拡張・脱落、KIM-1陽性面積の増加、マクロファージ浸潤増加が認められた。マイクロアレイで検討したところ、*Psm1*, *Lrit1*, *Sdr16c6* などの遺伝子発現が増加していた。

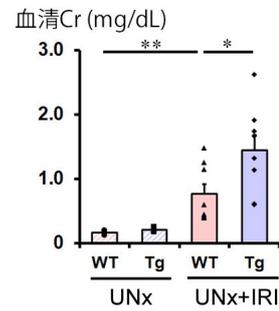


図3 血清Cr値。IRI心不全マウスはIRIWTマウスに比較して有意にCrが高い。Tg; dnNRSF-Tgマウス、WT;野生型マウス、UNx;片腎摘出、IRI;虚血再灌流。
*P < 0.05, **P < 0.01。

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 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Handa Takaya, Mori Keita P., Ishii Akira, Ohno Shoko, Kanai Yugo, Watanabe-Takano Haruko, Yasoda Akihiro, Kuwabara Takashige, Takahashi Nobuyuki, Mochizuki Naoki, Mukoyama Masashi, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteocrin ameliorates adriamycin nephropathy via p38 mitogen-activated protein kinase inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01095-8	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 Nishiguchi Yoshihiko, Hata Yusuke, Date Ryosuke, Fujimoto Daisuke, Umemoto Shuro, Kanki Tomoko, Yokoi Hideki, Mori Keita P, Handa Takaya, Watanabe-Takano Haruko, Kanai Yugo, Yasoda Akihiro, Izumi Yuichiro, Kakizoe Yutaka, Mochizuki Naoki, Mukoyama Masashi, Kuwabara Takashige	4. 巻 37
2. 論文標題 Osteocrin, a bone-derived humoral factor, exerts a renoprotective role in ischemia/reperfusion injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 444 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfab286	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 Sato Noriaki, Uchino Eiichiro, Kojima Ryosuke, Sakuragi Minoru, Hiragi Shusuke, Minamiguchi Sachiko, Haga Hironori, Yokoi Hideki, Yanagita Motoko, Okuno Yasushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Evaluation of Kidney Histological Images Using Unsupervised Deep Learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 2445 ~ 2454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2021.06.008	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 Tamura Takeshi, Kodama Takahiro, Sato Katsuhiko, Murai Kazuhiro, Yoshioka Teppei, Shigekawa Minoru, Yamada Ryoko, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Akita Hirofumi, Eguchi Hidetoshi, Johnson Randy L., Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 131
2. 論文標題 Dysregulation of PI3K and Hippo signaling pathways synergistically induces chronic pancreatitis via CTGF upregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e143414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI143414	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 Fuseya Sayaka, Suzuki Riku, Okada Risa, Hagiwara Kozue, Sato Takashi, Narimatsu Hisashi, Yokoi Hideki, Kasahara Masato, Usui Toshiaki, Morito Naoki, Yamagata Kunihiro, Kudo Takashi, Takahashi Satoru	4. 巻 523
2. 論文標題 Mice lacking core 1-derived O-glycan in podocytes develop transient proteinuria, resulting in focal segmental glomerulosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.033	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 Hata Yusuke, Kuwabara Takashige, Mori Kiyoshi, Kan Youngna, Sato Yuki, Umemoto Shuro, Fujimoto Daisuke, Kanki Tomoko, Nishiguchi Yoshihiko, Yokoi Hideki, Kakizoe Yutaka, Izumi Yuichiro, Yanagita Motoko, Mukoyama Masashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Ablation of Myeloid Cell MRP8 Ameliorates Nephrotoxic Serum-induced Glomerulonephritis by Affecting Macrophage Characterization through Intraglomerular Crosstalk	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59970-9	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 Yoshibayashi Mamoru, Kume Shinji, Yasuda-Yamahara Mako, Yamahara Kosuke, Takeda Naoko, Osawa Norihisa, Chin-Kanasaki Masami, Nakae Yuki, Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Asanuma Katsuhiko, Maegawa Hiroshi, Araki Shin-ichi	4. 巻 525
2. 論文標題 Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 319 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.088	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 Usui T, Morito N, Shawki HH., Sato Y, Tsukaguchi H, Hamada M, Jeon H, Yadav MK, Kuno A, Tsunakawa Y, Okada R, Ojima T, Kanai M, Asano K, Imamura Y, Koshida R, Yoh K, Usui J, Yokoi H, Kasahara M, Yoshimura A, Muratani M, Kudo T, Oishi H, Yamagata K, Takahashi Sa	4. 巻 98
2. 論文標題 Transcription factor MafB in podocytes protects against the development of focal segmental glomerulosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 391 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.02.038	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 Uchino Eiichiro, Suzuki Kanata, Sato Noriaki, Kojima Ryosuke, Tamada Yoshinori, Hiragi Shusuke, Yokoi Hideki, Yugami Nobuhiro, Minamiguchi Sachiko, Haga Hironori, Yanagita Motoko, Okuno Yasushi	4. 巻 141
2. 論文標題 Classification of glomerular pathological findings using deep learning and nephrologist?AI collective intelligence approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Informatics	6. 最初と最後の頁 104231 ~ 104231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijmedinf.2020.104231	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 Ozawa Shota, Matsubayashi Masaya, Nanaura Hitoki, Yanagita Motoko, Mori Kiyoshi, Asanuma Katsuhiko, Kajiwara Nobuyuki, Hayashi Kazuyuki, Ohashi Hiroshi, Kasahara Masato, Yokoi Hideki, Kataoka Hiroaki, Mori Eiichiro, Nakagawa Takahiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of Podocin by Matriptase exacerbates podocyte injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16002 ~ 16012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013721	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 Yamada Hiroyuki, Shirata Naritoshi, Makino Shinichi, Miyake Takafumi, Trejo Juan Alejandro Oliva, Yamamoto-Nonaka Kanae, Kikyo Mitsuhiro, Empitu Maulana A., Kadariswantiningsih Ika N., Kimura Maiko, Ichimura Koichiro, Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Hotta Akitsu, Nishimori Katsuhiko, Yanagita Motoko, Asanuma Katsuhiko	4. 巻 99
2. 論文標題 MAGI-2 orchestrates the localization of backbone proteins in the slit diaphragm of podocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 382 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.09.027	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石村拓也, 石井 輝, 大崎啓介, 戸田尚宏, 森 慶太, 半田貴也, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 Matrix metalloproteinase-10欠損マウスにおける腹膜の炎症・線維化の抑制効果の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	杉岡清香, 山田博之, 石井 輝, 加藤有希子, 森 慶太, 大崎啓介, 徳留 健, 松阪泰二, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題	ポドサイト特異的p38 MAPK欠損はアルドステロン投与GC-Aノックアウトマウスの 糸球体障害を悪化させる
3. 学会等名	第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	半田貴也, 森 慶太, 石井 輝, 金井有吾, 八十田明宏, 栗原孝成, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題	オステオクリンはNPR1signalを促進し、リン酸化p38を抑制することで足細胞に保護的に作用する
3. 学会等名	第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	石村拓也, 石井 輝, 大崎啓介, 戸田尚宏, 森 慶太, 半田貴也, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題	Role of Matrix Metalloproteinase-10 in Macrophages and Peritoneal Fibrosis
3. 学会等名	第27回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	半田貴也, 森慶太, 石井輝, 大野祥子, 金井有吾, 八十田明宏, 栗原孝成, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題	オステオクリンはP38MAPKのリン酸化抑制を介してアドリアマイシン腎症を改善する
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 杉岡清香, 加藤有希子, 石井輝, 森慶太, 大崎啓介, 徳留健, 松阪泰二, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 アルドステロン誘導性糸球体障害に対する足細胞のp38 MAPK欠失の影響
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 大崎啓介, 加藤有希子, 石井輝, 森慶太, 森潔, 笠原正登, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 MMP-10欠損による抗GBM腎炎の改善
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科 腎臓内科学 https://www.kidney-kyoto-u.jp/ 京都大学大学院医学研究科 腎臓内科学 https://www.kidney-kyoto-u.jp/
--

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