

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17269

研究課題名（和文）腎構成細胞における細胞死の感受性を決定するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms that determine the sensitivity to cell death in renal component cells

研究代表者

木島 真理恵（Kijima, Marie）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：70846310

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）：細胞死は様々な疾患や組織の損傷に関与するため、糖尿病関連疾患の発症や進展においても細胞死の起こりやすさが関わると考えられている。しかし、腎構成細胞における細胞死の感受性を規定する因子に関しては不明であった。本研究では、腎構成細胞でのリンカーヒストンH1タンパク（以下、H1）発現の調査とH1量に着目した腎構成細胞死のメカニズムの解明を目的とした。本研究結果より、糖尿病モデルマウスの腎臓におけるH1の発現領域を明らかにし、ポドサイトでのH1の局在が腎臓へのダメージの程度に相関する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、日本人の糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。とくに、糖尿病の合併症の一つである糖尿病性腎症は、透析導入患者の原疾患第一位であり、早急な対策が求められている。腎構成細胞における細胞死の感受性を規定する因子に関しては不明であり、かつ、腎構成細胞におけるH1の発現に関しても不明点が多かった。本研究結果により得られた、腎臓とH1の発現に関する知見により、H1の発現調節に着目した新たな糖尿病性腎臓病の治療法開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Since cell death is involved in various diseases and tissue damage, the susceptibility to cell death is thought to be involved in the onset and progression of diabetes-related diseases. However, the factors that determine the susceptibility of renal component cells to cell death are unknown. In this study, we investigated H1 expression in renal component cells and elucidated the mechanism of renal component cell death focusing on H1 levels. The results of this study revealed regions of H1 expression in the kidneys of diabetic mouse models, suggesting that the localization of H1 in podocytes may correlate with the extent of kidney damage.

研究分野：細胞死

キーワード：代謝疾患 腎臓 細胞死 ヒストンH1 糖尿病性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病は、慢性的な高血糖によって発症する細小血管障害の一つであり、活性酸素の産生増加、慢性的な微小炎症、血行動態異常等がその成因として挙げられている。これらの成因においては、腎構成細胞の増殖や細胞死等の機能の破綻が起こることが考えられる。細胞死は様々な疾患や組織の損傷に関与し、腎構成細胞においては、尿細管上皮細胞やポドサイトで細胞死が起こることが報告されている。そのため、細胞死は腎機能に大きく影響を与えることが予想され、糖尿病関連疾患の発症や進展においても細胞死の起こりやすさが関与することが考えられる。しかし、腎構成細胞における細胞死の感受性を規定する因子に関しては不明である。

リンカーヒストン H1 タンパク (以下、H1) は、全ての真核細胞に多量に存在し、クロマチンの高次構造に関与する。これまでに、アポトーシスの際に起こる現象に着目した研究の結果、H1 が DNA 断片化とクロマチン凝集に対する感受性を制御する因子であることが明らかになった。さらに、H1 量が少ない、あるいは無い細胞株では、DNA 断片化と小さいクロマチン凝集の形成を起こしやすいことが明らかになり、H1 量が細胞死の諸現象の感受性を規定している可能性が示唆された。これらの知見より、H1 量の少ない腎構成細胞は、細胞死に対する感受性が高いと予想した。しかし、腎構成細胞の細胞死における詳細なメカニズムは不明であり、H1 タンパク量との関連に関する報告は皆無である。

2. 研究の目的

H1 量が細胞死の際の現象の感受性を規定することが明らかになっている。しかし、腎構成細胞での H1 の発現は元より、腎構成細胞で起こる細胞死の詳細なメカニズムと H1 量との関連に関する報告はなされていない。本研究では、腎構成細胞での H1 の発現の調査と H1 量に着目した腎構成細胞死のメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

腎臓へのダメージや細胞死がどの時期から発生するかを調べるべく、週齢の異なる糖尿病モデルマウス *db/db* とその対照マウス *db/+m* を用意した。普通餌あるいは特殊餌を用いて飼育した後、腎臓を採取して解析を行った。評価方法としては、主に組織染色を行い、パラフィン切片を使用した。細胞死の評価には、HE 染色と TUNEL 染色、抗 cleaved caspase-3 (CC3) 抗体を用いた DAB 染色を行い、腎臓標本の全体像の評価には、PAS 染色を行った。また、H1 とポドサイトの観察には、抗 H1 抗体と抗 WT1 (Wilms Tumor1) 抗体を用いた蛍光染色を行い、評価した。

4. 研究成果

(1) 普通餌を用いたマウスの解析

まず、10 週齢の *db/db* マウスと *db/+m* マウスの腎臓を採取し、解析を行った。PAS 染色と TUNEL 染色、抗 CC3 抗体を用いた DAB 染色を行ったが、糸球体構造の異常や死細胞はほとんど検出されなかった。また、DAB 染色により H1 の発現領域を評価した結果、H1 は近位尿細管、遠位尿細管、ポーマンのう上皮、メサンギウム細胞、ポドサイトで発現していることが明らかになった。これらの結果は、30 週齢のマウスでも同様であった。

次に、42 週齢のマウスを解析した。H1 の発現領域に関しては、上記と同様の結果であったが、*db/db* マウスの腎臓では、*db/+m* マウスの腎臓に比較して発色が強い領域が多く見られる傾向にあった。TBARS で腎臓の過酸化脂質を調べると、*db/db* マウスでは *db/+m* マウスに比べて値が高いことがわかり、糖尿病状態では酸化ストレスの影響が大きいことが示された。また、DAB 染色により CC3 の発現を観察すると、*db/db* マウスの尿細管領域でわずかに DAB 陽性領域が見られた。これらの結果より、普通餌を用いる場合は、42 週齢辺りから腎臓へのダメージが入りつつあることが示唆された。

(2) 特殊餌を用いたマウスの解析

次に、細胞死が検出しやすい条件を検討すべく、*db/db* マウスと *db/+m* マウスに高脂肪食を 9 週間与え、腎臓の解析を行った。その結果、顕著な細胞死領域や免疫細胞の蓄積はほとんど見られなかったが、*db/db* マウスの過酸化脂質の値が *db/+m* マウスに比べて高いことがわかった。

これまでに得られた結果より、予想に反して腎臓での細胞死があまり起きていないことがわかってきたため、高脂肪食をより長期に与える実験系を実施した。*db/db* マウスと *db/+m* マウス

に高脂肪食を 12 週間あるいは 20 週間与え、腎臓を解析した。その結果、一部の *db/db* マウスでは血尿が認められ、一方の腎臓が肥大して内部に水が蓄積された水腎症様の症状が見られた。さらに、いずれの *db/db* マウスにおいて、メサンギウム細胞の輪郭が不鮮明であり、糸球体の構造が崩壊している様子が見られ、糸球体変性が進行している結果が示された。また、細胞死を評価した結果、TUNEL 陽性はメサンギウム細胞の一部と尿細管で見られた。

最後に、ポドサイトにおける H1 の発現を蛍光染色により観察した結果、*db/db* マウスでは、ポドサイトに局在する H1 が *db/+m* マウスに比べて多い傾向にあることがわかった。この結果より、ポドサイトでの H1 の局在が腎臓へのダメージの程度に相関する可能性が示唆された。

本研究結果より、糖尿病モデルマウスの腎臓における H1 の発現領域を明らかにし、ポドサイトでの H1 の局在が腎臓へのダメージの程度に相関する可能性が示唆された。

腎臓での細胞死に関しては、普通餌ではあまり誘導されないことがわかった。一方で、長期に高脂肪食を給餌した場合は、一方の腎臓が水腎症様の症状になる等、腎臓へのダメージが大きいことがわかった。そして、一方の腎臓が機能不全に陥った場合であっても、もう一方の腎臓に著しい細胞死が起きるのではなく、わずかに細胞死が検出されるにとどまった。

腎構成細胞における H1 の発現調節に関しては不明点が多かったが、本研究結果より、糖尿病性腎臓病の発症・進展に H1 の発現調節が関与する知見の提供に貢献できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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