

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17288

研究課題名(和文)アポトーシス制御に着目した急性腎障害の予防法および治療法の創出

研究課題名(英文) Basic research to elucidate strategies for prevention and treatment against acute kidney injury through regulating apoptosis.

研究代表者

森永 潤 (Morinaga, Jun)

熊本大学・病院・病院教員

研究者番号：50459210

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)：急性腎障害は慢性腎臓病への進展のリスクや患者死亡率を上昇させ、健康増進へ大きな障害となることから、当該疾患に対する予防法および治療法の確立が急務である。最近、申請者は全身性ノックアウトマウスを用いた解析から、急性腎障害の病態進展においてアンジオポエチン様因子の1つが腎保護的な作用をもち、その発現量低下が腎障害進展に関与する可能性を見出した。本申請研究では、当該分子がどのようなメカニズムを介して急性腎障害の病態進展に関与するかを明らかにするための研究を行う。本研究は急性腎障害の病態解明及び治療法開発のため重要な基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害は世界的な健康問題であり、人口10万人当りのAKIの発症頻度は、透析が必要ない症例と透析が必要な症例でそれぞれ約200～500件年、約20～30件年と高い。本研究において申請者は、アンジオポエチン様因子を介した急性腎障害進展のメカニズムを一部明らかにすることで、当該疾患に対する予防法および治療法のための分子基盤構築に寄与し、医学へ貢献することが可能である。

研究成果の概要(英文)：Acute kidney injury is a risk for developing chronic kidney disease and shortening the life span of people. Thus, finding strategies for prevention and treatment of the acute kidney injury is desired. Currently, the applicant of this grant found that a family member of angiopoietin-like protein (ANGPTL) have a favorable effect on the progression of acute kidney injury. In this project, the applicant will explore the molecular mechanism of acute kidney injury through the ANGPTL mediated mechanisms.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：急性腎障害

## 1. 研究開始当初の背景

急性腎障害は世界的な健康問題であり、人口 10万人当りの急性腎障害の発症頻度は、透析が必要なかった症例と透析が必要となった症例でそれぞれ約 200～500 件年、約 20～30 件年と高い (Kidney Int Suppl 2 : 1-132, 2013)。急性腎障害は慢性腎臓病への進展のリスクや患者死亡率を上昇させ、人々の健康増進への障害となる。さらに、急性腎障害治療に要する医療費は経済的にも多大な負担となることから、当該疾患に対する予防法および治療法の確立が急務である。

アンジオポエチン様因子 (Angiopietin-like protein: ANGPTL) は血管新生作用などで知られる Angiopietin に構造が類似するものの、その特異的受容体 (Tie1 や Tie2) に結合しない分泌蛋白ファミリーである。申請者はこれまで腎尿細管における ANGPTL の機能に着目し基礎的検討を行い、これまでの解析から、ANGPTL2 は慢性腎臓病において尿細管細胞から過剰に分泌され、TGF- $\beta$  と正の増幅サイクルを形成すること、また、腎臓内へのマクロファージ浸潤を誘導することで腎線維化病態を促進することを明らかにした (Morinaga., Kidney Int. 2016)。しかし、ANGPTL2 が腎臓病の急性期においてどのような役割をもつのかは不明であった。

このような中、申請者は腎虚血再灌流 (Ischemic reperfusion injury: IRI) モデルを用い ANGPTL2 の急性腎障害における役割を検討した。その結果、1. 野生型マウスに比し全身性 Angptl2 ノックアウトマウスにおいて、急性腎障害病態進展の程度が有意に異なること、2. 同マウスにおいて急性腎障害時に死に至る腎構成細胞数が異なることが明らかとなった。本検討の結果から、腎虚血再灌流において、腎保護作用を持つ ANGPTL2 の発現低下が細胞死シグナルを制御し、急性腎障害の病態進展に寄与する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本課題研究において、申請者は「急性腎障害の病態進展において、ANGPTL2 がどのような役割を持つか」という問いを解き明かすべく研究を行う。これまで申請者が行った予備検討から、腎臓の ANGPTL2 発現変化が AKI 病態に関与する可能性が示唆されたが、メカニズムを明らかにするためには再現性も含めさらなる検討が必要である。本研究において、申請者は主に以下に示す学術的な問いを明らかにすべく実験を行い、AKI の予防法および治療法の確立を目指す。1. 急性腎障害進展において腎臓 ANGPTL2 発現を変化させるメカニズムは何か、2. 急性腎障害進展に関与する ANGPTL2 の由来はどこか、3. ANGPTL2 が細胞死に関与するメカニズムは何か。

## 3. 研究の方法

本研究において、申請者は上記の問いに対しそれぞれ以下の方法で検討を行う。

### 1. 急性腎障害進展において腎臓 ANGPTL2 発現を変化させるメカニズムは何か

本検討では、IRI によるマウス急性腎障害モデルの腎臓における ANGPTL2 の遺伝子および蛋白レベルを、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用いて評価する。

### 2. 急性腎障害進展に関与する ANGPTL2 の由来はどこか

本検討では、生理的状态およびIRIモデルのマウス腎臓を用い、in situ hybridization法による評価を行う。

### 3. ANGPTL2が細胞死に関与するメカニズムは何か。

本検討では、急性腎障害の病態進展において重要とされる複数の細胞内シグナルについて、腎組織を用いたウェスタンブロット法により評価を行う。

## 4. 研究成果

本申請研究で申請者は、若手研究の資金を用い実験を行った成果として、以下のことを見出した。

### 1. 急性腎障害進展において腎臓ANGPTL2発現を変化させるメカニズムは何か

マウス虚血再灌流モデルは多くの研究に用いられている動物モデルであるが、申請者はまず、この虚血再灌流モデルの虚血時間と再灌流時間の急性腎障害進展に対する影響を血清学的・組織学的に評価した。その結果、虚血時間は用量依存的に腎障害を増悪することを明らかにし、最適な腎障害モデルの条件を見つけた。また、虚血再灌流モデル作成後24時間のwhole腎臓を用いた検討から、急性腎障害時にANGPTL2の遺伝子転写レベルと蛋白含有量は低下することを明らかにした。本検討から、急性腎障害時にANGPTL2発現が低下することが、当該病態進展に関与する可能性が示唆されたが、同病態におけるANGPTL2発現制御メカニズムを明らかにするまでには至らなかった。加えて、腎局所におけるANGPTL2の発現変化の評価も試みたが、これもまだ確定した結果を得ることが出来ず、更なる条件検討を必要とすると考えられた。

本研究では、急性腎障害時にANGPTL2発現低下が、急性腎障害進展に関与する可能性が示唆されたことから、全身性ANGPTL2ノックアウトマウスを用いた虚血再灌流モデルの検討を行った。その結果、ANGPTL2ノックアウトマウスでは同モデルにおいて複数の条件下で共通して急性腎傷害が増悪していたことから、ANGPTL2が急性腎障害進展に拮抗的に作用することが再現性をもって確認された。

### 2. 急性腎障害進展に関与するANGPTL2の由来はどこか

近位尿細管は急性腎障害における病変の首座であることが知られている。申請者は過去に尿細管細胞においてANGPTL2遺伝子が発現することを明らかにしたが、近位尿細管細胞に同分子が発現するかは未だ不明であった。本検討ではIn situ Hybridization法を用い、生理的状态でANGPTL2が近位尿細管細胞マーカー陽性細胞と共発現することを見出し、腎虚血再灌流障害で感受性の高い近位尿細管に同遺伝子が発現することを明らかにした。

### 3. ANGPTL2が細胞死に関与するメカニズムは何か。

急性腎障害モデルの病態進展にはアポトーシスやネクローシス等の細胞死が強く関与している。申請者は本検討により、ANGPTL2ノックアウトマウス虚血再灌流モデルの組織学的評価を行った結果、腎尿細管の核が顕著に薄く、周囲に強い浮腫が観察された。これは、同マウスにおいて当該細胞が急性尿細管壊死に至っていることを示唆する所見であると考えられた。更に、whole腎組織を用いたウェスタンブロット法による検討から、複数の虚血条件に共通し再現性をもってANGPTL2ノックアウトマウスでは腎組織内でアポトーシスに拮抗する複数のシグナルが変化していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukami Hirota, Morinaga Jun, Okadome Yusuke, Nishiguchi Yoshihiko, Iwata Yasunobu, Kanki Tomoko, Nakagawa Terumasa, Izumi Yuichiro, Kakizoe Yutaka, Kuwabara Takashige, Horiguchi Haruki, Sato Michio, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Tajiri Tetsuya, Oike Yuichi, Mukoyama Masashi	4. 巻 315
2. 論文標題 Circulating angiotensin-like protein 2 levels and arterial stiffness in patients receiving maintenance hemodialysis: A cross-sectional study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 18 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.890	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 迪夫, 森永 潤, 向山 政志, 尾池 雄一
2. 発表標題 血液透析患者における血中ANGPTL2値と血管老化指標の関連
3. 学会等名 日本抗加齢医学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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