

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09433

研究課題名（和文）移植腎線維化における低酸素誘導因子の役割と治療法の確立に向けた研究

研究課題名（英文）The role of hypoxia inducible factor on renal transplantation-induced fibrosis and the establishment of its therapeutic strategies

研究代表者

内田 潤次（Uchida, Junji）

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40343412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：移植後腎の長期的な生着率の改善において移植腎の線維化病態を抑制することは必須である。本研究ではHIF-PH阻害薬により誘導される腎線維化抑制関連分子を同定することを試みた。尿細管間質の線維化モデルであるアデニン負荷による慢性腎不全腎線維化モデルを用い、モデル腎組織の単一細胞網羅的遺伝子発現解析を施行することにより、線維化早期に発現する線維化関連分子を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、腎移植後に起こる腎組織の線維化の病態形成に関わる早期評価指標、さらには腎線維化抑制関連分子の同定に繋がる基礎研究の位置付けと考えている。今後は、抽出されたこれら候補分子の腎線維化早期指標としての可能性について動物実験にて確認すると共に、並行して腎移植患者の尿・血液・組織検体から得られる臨床データを解析することにより当該分子群の意義を明確化さらに検証することにより臨床応用への基盤研究に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）： It is essential for prolonged-survive of transplanted kidneys to suppress their fibrosis. In this study, we tried to identify the renal fibrosis suppression molecules induced by HIF-PH inhibitors. We have extracted the fibrosis related molecules expressed from the early stage through the single cell analyses of the fibrotic kidneys induced by adenine loaded.

研究分野：腎移植

キーワード：腎線維化 腎移植 シングルセル解析 HIF-PH阻害薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎移植成績において短期的な移植腎生着率は飛躍的に改善した。しかしながら、現在も長期的な移植腎予後は改善したとは言えず、克服すべき課題として移植腎長期生着が挙げられる。様々な因子が移植腎にダメージを与えるが移植腎機能不全に至る過程で共通して認められる病態が腎線維化である。腎障害が進行する過程で腎組織が低酸素に陥り低酸素誘導性因子 Hypoxia inducible factor (HIF) が活性化され様々な遺伝子発現を誘導することが知られている。また、HIF を持続活性化させることが知られているプロリン水素化酵素阻害剤；HIF-PH 阻害薬が現在腎性貧血の治療薬として臨床応用されているが、腎線維化への影響については現時点において未だ十分検証されていない懸案事項である。最近、腎線維化に病態に先立ち腎組織への鉄の蓄積が線維化促進様の遺伝子発現変化を引き起こすことが明らかになってきた(文献 1)。また、腎移植後の腎線維化の病態形成の初期過程は、移植腎後の線維化病態を特徴付けるものでありその初期病変の解析は特徴ある治療標的の検索に重要な位置づけにあると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、腎移植後の予後を規定する腎線維化病態における各細胞の機能を明らかにすることにより、移植後腎の線維化に関連する機能性分子や分子マーカーの抽出を目指す。とくに線維化病態における HIF シグナル分子経路の解析を線維化初期病変相に焦点を当てて行う。まずは動物実験モデルから抽出された候補分子群を腎移植および透析に関わる臨床検体による検証を通して移植後腎の線維化に特徴的な線維化関連分子を同定することを目指す。

### 3. 研究の方法

片側尿管閉塞による UUO 線維化モデルおよび尿細管間質の線維化モデルであるアデニン負荷による慢性腎不全腎線維化モデルを用いた。同時に導入した periostin 発現細胞が標識される動物モデル (periostin-Cre; Rosa26-LSL-tomatodt マウス) をベースに確立した線維化モデルを作製した。そして腎線維化形成の時系列変化と tomato 蛍光標識を指標に periostin 発現細胞の数と発現領域の相関について解析することにより、periostin 発現細胞を組織より採取する病態ポイントを決定する。また、腎組織から単一細胞網羅的遺伝子発現解析を施行することにより、線維化早期に発現する線維化マーカー候補分子を抽出する。

#### 1. UUO とアデニン動物モデル (腎線維化モデル) の作成と解析について

腎線維化病態モデルは 8-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いて作製を行った。片側尿管閉塞 (UUO) モデルは麻酔科にて右腎尿管結紮後、3、7、14 日後に屠殺後両腎を摘出し、サンプルとした。アデニンモデルは 1 日おきにアデニン水溶液を 100mg/kg にて腹腔内投与することにより作製し、1、2、3、4 週後に屠殺し両腎を摘出し、サンプルとした。摘出した腎臓は 4% パラホルムアルデヒドにて 24 時間振盪固定後、パラフィン包埋し、4 $\mu$ m の薄切片スライドを作製し、HE およびマッソントリクローム染色を行うことにより組織評価を行った。

#### 2. シングルセル解析について

アデニン投与 1 週間後のマウスより腎臓を摘出し、酵素処理によりシングルセル化後、セルソーターにて生細胞を分取し、サンプルとした。シングルセル RNA シーケンス scRNA-seq は KOTA1 バイオテクノロジー株式会社へ委託し行った。解析は Cellenics®ソフトウェアを用いて行った。

### 4. 研究成果

#### 1. 動物モデルの確立とモデルの解析結果

腎線維化モデルとして汎用されている UUO モデルにて腎線維化の検討を行った。組織学的に確認を行い、UUO 処置後 3 日目には明らかな尿細管の拡張および線維化が確認され、組織のリモデリングが急速に進行することが確認された。しかしながら、本研究目的においては緩徐に線維化が進行する病態モデルが適していると考えられたため、別の腎線維化病態モデルであるアデニン腎症モデルにて腎線維化についても検討を行った。その結果、アデニン投与 2 週間後には尿細管拡張が認められ、線

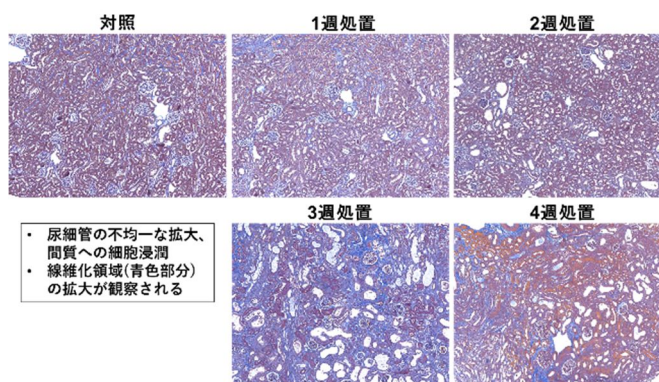


図 1. アデニン腎症モデルの経時的腎組織像  
UUO 腎病理組織像 (マッソントリクローム染色)

維化が生じている組織像を呈し始めるが、アデニン投与1週間後においては明らかな尿細管の拡張や線維化は染色組織像からはうかがえなかった。(図1)アデニン腎症モデルはUUOモデルより、緩徐に線維化が進行することが示唆された。しかしながら、これらのアデニン投与マウスの腎組織にてqRT-PCRを行ったところ、線維化マーカーのCollagen3a1遺伝子発現の有意な増加やTGF- $\beta$ 1遺伝子の発現増加傾向などが認められ(図2)、線維化進行が生じていることが示唆された。これらのことから、線維化早期の状態を検討するために、アデニン腎症モデル1週間後の腎組織を用いて更なる解析を行うこととした。

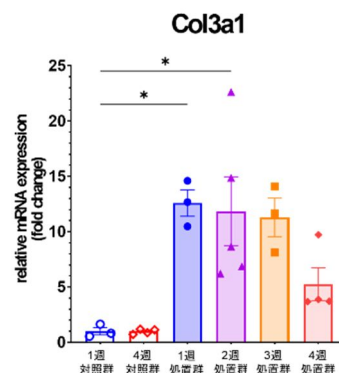


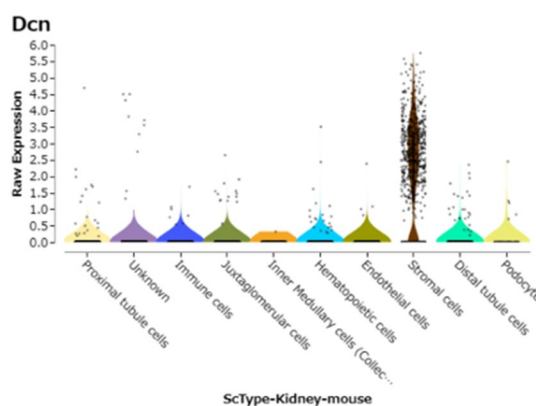
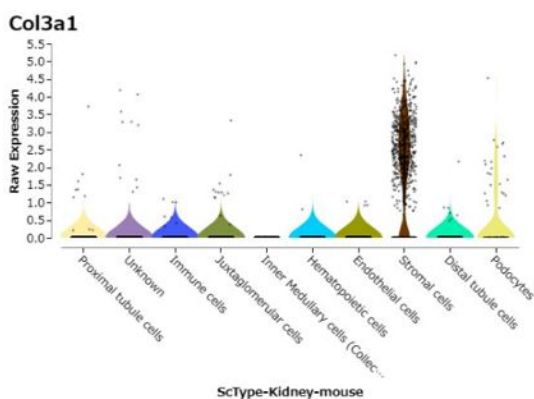
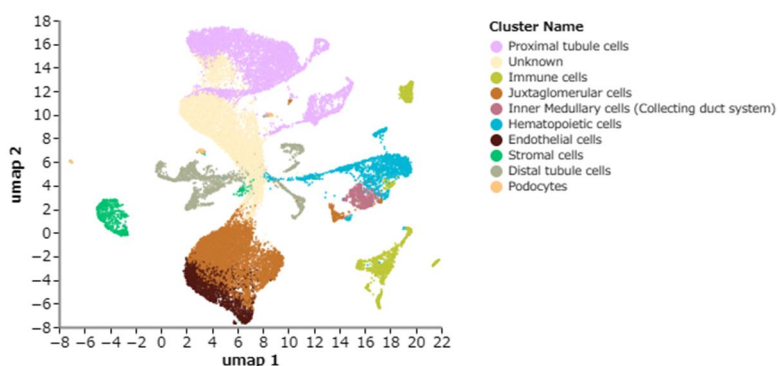
図2. アデニン腎症モデルにおけるCol3a1遺伝子の経時的発現変化

## 2. シングルセル解析の結果

アデニン腎症モデルを用いてアデニン投与1週間後の腎組織を用いてscRNA-seqを実施し投与群と非投与群にて比較検討を行った。その結果、Collagen3a1やTGF- $\beta$ 1などの一部の線維化マーカー特定の細胞集団において発現上昇することが確認された。また、細胞集団解析から、これらの集団が間質系細胞である可能性が示唆された(下図)。

## 3. 抽出された候補分子の性状

これらの特定された細胞集団における遺伝子発現解析および遺伝子オンロジー解析を行い、炎症、細胞外マトリックス、線維化に関連する種々の遺伝子が抽出されてきた。また、これらの遺伝子にはCollagen3a1、Collagen1a1などの各種コラーゲン遺伝子、TGF- $\beta$ 1、Spp1、Dcnなど、線維化に関連があるとされる遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の他にも骨形成に関わる遺伝子も抽出されており、腎線維化への寄与度が高い集団であることが遺伝子解析の結果から推察された。これらのことから、これらの細胞集団に着目するとともに、抽出された遺伝子にも着目し、さらなる解析を行う予定としている。



## 引用文献

文献1. Iron accumulation drives fibrosis, senescence and the senescence-associated secretory phenotype.  
Maus M, et al., Nat Metab. 5:2111-2130 (2023).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Kosoku A, Iwai T, Masuda H, Kabei K, Nishide S, Uchida J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Kidney transplantation for a transgender male.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CEN Case Rep.	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) 10.1007/s13730-023-00773-y	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 Machida Y, Yoshiuchi H, Kitano Y, Kamizuru M, Uchida J	4. 巻 44
2. 論文標題 Laparoscopic ureteroneocystostomy for iatrogenic ureterovaginal fistula after modified radical hysterectomy: A case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urol Case Rep	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) 10.1016/j.eucr.2022.102144	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 Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otsoshi T, Yamasaki T, Kuratsukuri K, Uchida J	4. 巻 40
2. 論文標題 A retrospective study on optimal number of cycles of the first-line platinum-based chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urol Oncol.	6. 最初と最後の頁 194.e7-194.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2021.10.013	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 Kosoku A, Iwai T, Ishihara T, Kabei K, Nishide S, Maeda K, Hanayama Y, Ishimura E, Uchida J	4. 巻 41
2. 論文標題 Influence of protein intake on the changes in skeletal muscle mass after kidney transplantation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Nutr.	6. 最初と最後の頁 1881-1888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clnu.2022.07.028	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 Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H.	4. 巻 113
2. 論文標題 The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of -catenin signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2642-2653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15467.	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 Masuda H, Kato M, Yoshiuchi H, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Kuratsukuri K, Uchida J.	4. 巻 68
2. 論文標題 A Case of Metastatic Urothelial Carcinoma with Pseudoprogression of Liver Metastasis during the Treatment with Pembrolizumab	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hinyokika Kiyo	6. 最初と最後の頁 117-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14989/ActaUrolJap_68_4_117	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 Machida Y, Yoshiuchi H, Kitano Y, Kuroki Y, Kamizuru M, Uchida J.	4. 巻 28
2. 論文標題 Novel Technique for Hand-Assisted Laparoscopic Nephrectomy for Advanced Renal Cell Carcinoma with Renal Vein and Inferior Vena Cava Thrombi: Three Case Reports.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Rep Urol.	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) 10.1155/2022/8177947	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 Hirayama Y, Kato M, Kimura K, Otoshi T, Yamasaki T, Uchida J	4. 巻 45
2. 論文標題 Successful case of olaparib treatment for castration-resistant prostate cancer with multiple DNA repair gene mutations: Use of comprehensive genome profiling for treatment-refractory cases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urol Case Rep	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) 10.1016/j.eucr.2022.102210	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 Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J	4. 巻 -
2. 論文標題 Irradiation plus myeloid- derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Cancer	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/s41416-023-02244-8	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 Kosoku Akihiro, Iwai Tomoaki, Jogo Atsushi, Yamamoto Akira, Uchida Junji	4. 巻 33
2. 論文標題 Therapeutic Intranodal Lymphangiography for Chyluria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Vascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 357 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvir.2021.12.014	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 Naganuma Toshihide, Iwai Tomoaki, Takemoto Yoshiaki, Uchida Junji	4. 巻 54
2. 論文標題 Experience With the Use of a Novel Agent, Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor, for Posttransplant Anemia in Renal Transplant Recipients: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 544 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.10.022	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 Kosoku Akihiro, Iwai Tomoaki, Kabei Kazuya, Nishide Shunji, Maeda Keiko, Kumada Norihiko, Uchida Junji	4. 巻 54
2. 論文標題 Hyperpolypharmacy and Frailty in Kidney Transplant Recipients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 367 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.11.026	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 Kosoku Akihiro, Iwai Tomoaki, Uchida Junji	4. 巻 54
2. 論文標題 Clinical Outcomes of Everolimus With Reduced-Dose Tacrolimus vs Mycophenolate Mofetil With Standard-Dose Tacrolimus in De Novo ABO-Incompatible Kidney Transplant Recipients: 1-Year Follow-up	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 293 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.08.062	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 Kosoku Akihiro, Ishihara Takuma, Iwai Tomoaki, Nishide Shunji, Kabei Kazuya, Maeda Keiko, Kumada Norihiko, Uchida Junji	4. 巻 54
2. 論文標題 The Change in Muscle Mass Among Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 346 ~ 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.08.064	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 Yamamoto Shoma, Kato Minoru, Takeyama Yuji, Yukimatsu Nao, Hirayama Yukiyo, Otoshi Taiyo, Yamasaki Takeshi, Kuratsukuri Katsuyuki, Uchida Junji	4. 巻 -
2. 論文標題 A retrospective study on optimal number of cycles of the first-line platinum-based chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	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) 10.1016/j.urolonc.2021.10.013	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 Kato Minoru, Uchida Junji, Japan Urological Oncology Group	4. 巻 28
2. 論文標題 Impact of the objective response to and number of cycles of platinum based first line chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma on overall survival of patients treated with pembrolizumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14686	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 Tsuda Akihiro, Mori Katsuhito, Nakatani Shinya, Machiba Yuri, Uedono Hideki, Kurajoh Masafumi, Yamada Shinsuke, Morioka Tomoaki, Inaba Masaaki, Ishimura Eiji, Uchida Junji, Emoto Masanori	4. 巻 44
2. 論文標題 Dissociation of Glycated Albumin and HbA1c Is Associated With a Decline of Glomerular Filtration Rate as Evaluated by Inulin Clearance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes Care	6. 最初と最後の頁 e188 ~ e189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/dc21-1218	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 Naganuma Toshihide, Kabata Daijiro, Takemoto Yoshiaki, Uchida Junji, Shintani Ayumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Impact of stroke history on the presence of cerebral microbleeds in hemodialysis patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Neurology	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/s12883-021-02320-7	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 Naganuma Toshihide, Kabata Daijiro, Takemoto Yoshiaki, Uchida Junji, Shintani Ayumi	4. 巻 90
2. 論文標題 Antiplatelet therapy and future intracerebral hemorrhage in hemodialysis patients with cerebral microbleeds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2021.05.068	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 Kuroki Yoshikazu, Kimura Kaoru, Harimoto Koji, Nishikawa Keiichiro, Hosaka Naoki, Uchida Junji	4. 巻 38
2. 論文標題 A case of primary retroperitoneal amyloidoma resected laparoscopically	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urology Case Reports	6. 最初と最後の頁 101711 ~ 101711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eucr.2021.101711	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 -



〔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
研究 分 担 者	鞍作 克之  (Kuratsukuri Katsuyuki)  (70364007)	大阪公立大学・大学院医学研究科・講師   (24405)	
研究 分 担 者	大年 太陽  (Otoshi Taiyo)  (40749214)	大阪公立大学・大学院医学研究科・助教   (24405)	

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