

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16181

研究課題名(和文) ALOX15を軸とした腎内脂質メディエーターの網羅的解析と慢性腎臓病への応用

研究課題名(英文) Comprehensive Analysis of Renal Lipid Mediators Focusing on ALOX15 and Its Application to Chronic Kidney Disease

研究代表者

松浦 喜明(Matsuura, Yoshiaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90880518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：5/6 Nx腎ではcontrol腎と比較して、Alox15のmRNA及びタンパク発現量共に増加していた。Alox15-/- CKDマウスは野生型CKDマウスよりもBUN及び血清Creが低値であり、良好な腎機能を示した。リビドミクスによって腎組織中の脂肪酸代謝物を網羅解析したところ、野生型CKD腎と比較してAlox15-/- CKD腎ではPGD2のみが有意に上昇していた。TGF- β 1で刺激したNRK-52E細胞でPGD2はI型コラーゲン及びSMAの発現を有意に抑制した。以上の結果を、Clin Exp Nephrol誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALOX15の阻害またはPGD2の投与は、CKDの有望な治療標的となり得る。

本研究により、Alox15のmRNA及びタンパクが共にCKD腎で増加し、Alox15-/- CKDマウスは野生型CKDマウスと比較して腎機能障害と線維化が抑制されることが明らかになった。さらに、Alox15-/- CKDマウスのCKD腎で増加した脂質代謝物であるPGD2は、近位尿細管培養細胞の上皮間葉転換と線維化を抑制した。Alox15の阻害またはPGD2の投与は、CKDおよび線維化の新規治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lipid-metabolizing enzymes and their metabolites affect inflammation and fibrosis, but their roles in chronic kidney disease (CKD) have not been completely understood. In 5/6 Nx kidneys, both mRNA and protein levels of Alox15 were higher when compared with those in sham kidneys. Alox15-/- CKD mice exhibited better renal functions than wild-type mice. Interstitial fibrosis was also inhibited in Alox15-/- CKD mice. Mediator lipidomics revealed that Alox15-/- CKD mouse kidneys had significantly higher levels of PGD2 than the control. To investigate the effects of PGD2 on renal fibrosis, we administered PGD2 to TGF- β 1-stimulated NRK-52E cells and HK-2 cells, which lead to a dose-dependent suppression of type I collagen and SMA in both cell lines. Increased PGD2 in Alox15-/- CKD mouse kidneys could inhibit fibrosis, thereby resulting in CKD improvement. Thus, Alox15 inhibition and PGD2 administration may be novel therapeutic targets for CKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 線維化 脂質 PGD2 Alox15

1. 研究開始当初の背景

本邦のCKD患者数は1330万人と推計され、現在も増加している。腎障害の進行は透析や腎移植といった腎代替療法を要するだけでなく、脳卒中や虚血性心疾患といった心血管合併症を引き起こすことから患者のQOLや医療費削減の点で非常に重要な課題である。しかしながらCKDの現行治療は保存的加療が中心であり、CKDの病態に直接アプローチする治療法の開発が求められてきた。

多価不飽和脂肪酸とその代謝物は炎症の開始と収束の両者に重要であり、主に6系脂肪酸の代謝物であるプロスタグランジンやロイコトリエンが炎症性脂質メディエーターとして、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)等の3系脂肪酸の代謝物が抗炎症性脂質メディエーターとして機能している。通常、両者の適切なバランスによって炎症がコントロールされているが、このメカニズムが破綻すると炎症が遷延し、線維化などの不適切な組織修復を引き起こして肺疾患、心血管疾患、糖尿病などの慢性炎症を主体とした病態に関わることが知られている(Nature 2014)。生体内にはシクロオキシゲナーゼ(COX)、リポキシゲナーゼ(LOX)、シトクロームP450を中心とした脂肪酸代謝酵素の下流に数多くの脂質メディエーターが存在するが、近年の質量分析技術の向上により脂質メディエーターの変化を網羅的に解析し、病態に関与する個別分子を特定することが可能になってきた。CKDも慢性炎症を主な徴候とする病態であるが(Nat.Med. 2014)、腎の炎症、線維化への脂質メディエーターの関与については不明である。申請者はこれまでに2つのCKDモデル(5/6腎摘、アデニン腎症)の腎において多価不飽和脂肪酸の代謝に関わる酵素の発現を評価したが、ALOX15のみが転写、蛋白レベルで増加していた。さらにALOX15を欠失したマウスはCKDモデルの腎障害が軽減することも確認していた。一方、ALOX15によって産生される脂質メディエーターは炎症から抗炎症まで多数あり、ALOX15自体の阻害ではなくその代謝産物から病態に関わる機能性脂質メディエーターを特定することで病態により特異的な治療法の開発が可能になると考えられる。以上、CKDにおいて多価不飽和脂肪酸とその代謝物の変化し慢性炎症やそれに伴う線維化の病態形成に関わるのか、関わるとすればどの脂質メディエーターが病態形成に重要なのかという学術的「問い」に答えるため本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究はCKDの腎組織における脂質メディエーターの変化を網羅的に解析し、病態に関与する分子を特定することを目的とする。マウスCKDモデル血清の脂質メディエーターの解析には既報があるが、腎組織の網羅的リピドミクスの報告はこれまでになく独自性が高い。上述のALOX15の動態や腎機能に与える影響は2つのCKDモデルで共通しており、脂質メディエーターの解析で得られた結果は様々なCKDに一般化できる可能性が高く、CKDの病態に共通する治療法の開発という点で創造性が高い。

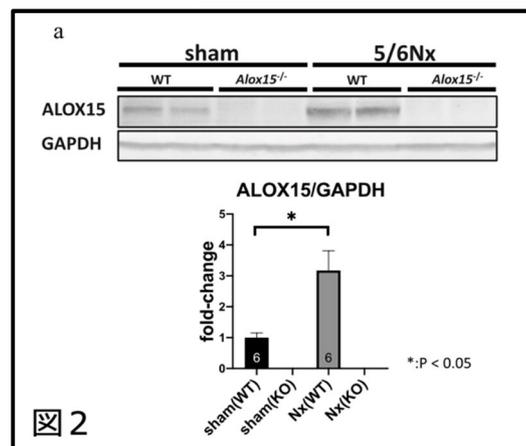
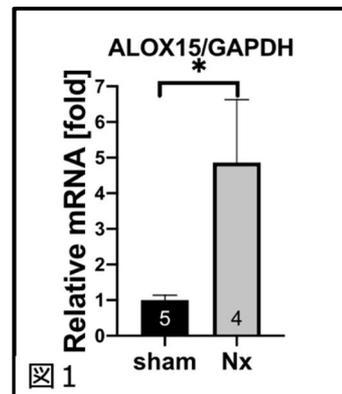
3. 研究の方法

C57BL/6Jマウスに5/6Nxを行い、CKDモデルを作成した。CKDマウスノ腎組織中の脂肪酸代謝酵素のmRNA量をqPCRで評価した。mRNAの増加が確認されたAlox15に関してin situ hybridizationによって発現部位を確認した。さらにlaser microdissectionによって単離した近位尿細管からmRNAを抽出してRT-PCRでAlox15の発現を評価した。次にAlox15^{-/-}マウスをCKDモデルとし、BUN及び血清クレアチニン(Cre)の測定を行い、Alox15^{-/-}マウスと野生型マウスで腎機能に差があるかを評価した。また術後8週目に腎臓サンプルを回収し、Western blot及びPCRで腎障害マーカーと腎線維化マーカーを評価した。術後40週目に回収した腎臓組織サンプルは、Masson's trichrome染色で線維化を組織学的に評価した。急速凍結した腎臓サンプルは腎臓中の脂肪酸プロファイル解析のため、メディエーターリピドミクスによる解析を行った。リピドミクスによる解析でAlox15^{-/-}マウスと野生型マウスで差のあった脂肪酸をラット腎臓上皮細胞(NRK-52E細胞)及びヒト腎臓近位尿細管細胞(HK-2細胞)にTGF-β1と共に投与し、mRNAを回収して上皮間葉転換マーカーや線維化マーカーをqPCRで評価した。

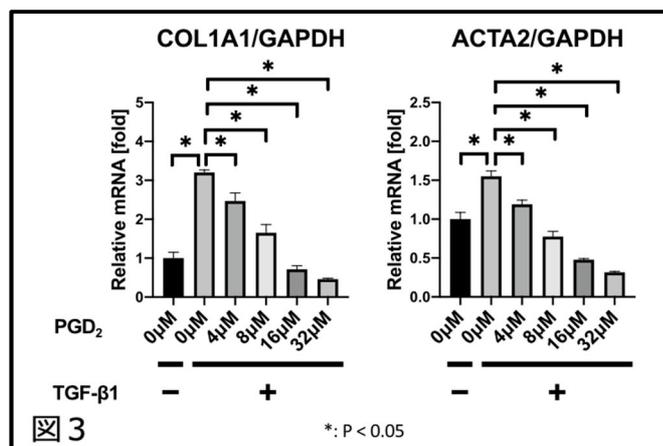
4. 研究成果

以下の結果を、Clin Exp Nephrol誌.(2021 May;25(5):445-455.)に報告した。
5/6Nx腎ではcontrol腎と比較してAlox15のmRNA及びタンパク発現量共に増加していた。

in situ ハイブリダイゼーションでは、5/6 Nx 腎において浸潤細胞や糸球体ではなく尿細管において Alox15 の mRNA が増加していた (図 1)。さらに、LMD によって単離した 5/6 Nx 腎近位尿細管において Alox15 が増加していることを RT-PCR で確認した (図 2)。CKD の病態における Alox15 の関与を検証するために、Alox15^{-/-} マウスに 5/6 Nx を施行して CKD モデルとし、解析を行った。その結果、Alox15^{-/-} CKD マウスは野生型 CKD マウスよりも BUN 及び血清 Cre が低値であり、良好な腎機能を示した。腎組織の中の腎障害マーカー及び線維化マーカーも Alox15^{-/-} CKD マウスで抑制されており、腎組織の Masson's trichrome 染色においても、腎間質線維化が Alox15^{-/-} CKD マウスで抑制されていた。Alox15^{-/-} CKD マウスの腎障害抵抗性フェノタイプにおける脂肪酸の関与を検証するために、メディエーター・リポドミクスによって腎組織中の脂肪酸代謝物を網羅解析したところ、野生型 CKD 腎と比較して Alox15^{-/-} CKD 腎では 15-HEPE, 18-HEPE, 10-HDoHE, 11-HDoHE, 13-HDoHE, 14-HDoHE, 17-HDoHE, 16-HDoHE 及び DGLA が有意に低下しており、PGD2 のみが有意に上昇していた。腎線維化に対するこれらの脂肪酸の動きを明らかにするために、TGF-β1 で刺激したラット由来の尿細管培養細胞である NRK-52E 細胞にこれらの脂肪酸を全て投与したところ、PGD2 のみが型コラーゲン及び αSMA の発現を有意に抑制した。PGD2 はヒト由来の近位尿細管培養細胞である HK-2 細胞においても同様の抑制効果を示し、この効果は用量依存的であった (図 3)。



CKD 腎において、Alox15 の mRNA とタンパクの両方が上昇し、Alox15^{-/-} CKD マウスでは腎機能障害と線維化が抑制されることが示された。さらに、この CKD 抵抗性のフェノタイプには腎組織中の PGD2 の増加が関与している可能性がある。腎疾患と脂肪酸プロファイルの関連については、ヒトの血清や血漿のリポドミクスを用いた研究が広く行われてきたが、腎組織を直接リポドミクスで解析した研究はほとんどなかった。同様に、CKD 動物モデルを用いたリポドミクスの報告も少なく、これらの研究はいずれも CKD 動物



モデルの血清または血漿サンプルを用いたリポドミクスを行っており、CKD 腎組織を用いたリポドミクスは我々の研究が行われるまで報告されていなかった。本研究では、CKD 動物モデルの腎組織における PUFA 由来の脂質メディエーターのプロファイルを網羅的に解析し、そのプロファイルを初めて明らかにした。

本研究では、CKD 腎での増加が確認された脂肪酸代謝酵素であり、PUFA を代謝する主要酵素の一つである ALOX15 に着目した。ALOX15 の発現は、生理的な条件下では、好酸球、気管支肺胞上皮細胞などで高レベルである。非 CKD 条件下の腎において ALOX15 の発現は低レベルであるが、CKD 腎では ALOX15 の mRNA 及びタンパクの両方が有意に上昇しており、その増加の主体となっている細胞は近位尿細管細胞であった。

ALOX15 は動脈硬化などの慢性疾患に関与しており、これらの疾患モデルで ALOX15 の欠失はこれらの疾患を改善する。ALOX15 と腎疾患との関連を報告した既報としては、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病性腎症モデルで Alox15 遺伝子の欠失によって蛋白尿が減少したという報告がある。しかし、この糖尿病性腎症モデルでは血清 Cre などが上昇するといった腎機能の低下を示さず、腎機能が低下し尿毒症物質が増加するという特徴をもった実際のヒトの CKD の病態に近いモデルにおける ALOX15 と腎機能障害の関連性は不明なままであった。本研究では、5/6 Nx マウスモデルを用いて、ALOX15 欠失が腎機能低下を伴う CKD モデルの腎機能障害と腎線維化を改善することを初めて明らかにした。

この 5/6 Nx モデルにおいて、ALOX15 が欠失したことで増加した腎臓保護的な lipid mediator がいないかという探索の結果、我々は PGD2 の上昇を突き止めた。PGD2 はラット由来尿細管培

養細胞である NRK-52E 細胞及びヒト由来近位尿細管培養細胞である HK-2 細胞において TGF- β 1 による上皮間葉転換及び線維化を抑制し、その効果は用量依存的であった。PGD2 の受容体として DP1 と DP2 の 2 種類の受容体があり、DP1 の K_i 値は 1.7 nM、DP2 の K_i 値は 2.4 nM である。しかしながら、我々の *in vitro* 実験において PGD2 は 4 ~ 32 μ M の濃度で有効であり、受容体の K_i 値と比して高濃度であった。この結果は、PGD2 が DP1 や DP2 といった G タンパク質共役型受容体を介してではなく、PGD2 の代謝物である 15-d-PGJ2 が結合する PPAR γ などの他の経路を介して抗線維化作用を発揮する可能性を示唆している。我々が作成した C57BL/6J マウスの 5/6 Nx モデルでは酸化ストレスや炎症の上昇は認めず、PGD2 は酸化ストレスや炎症とは独立した経路を介して抗線維化作用を発揮している可能性がある。15-d-PGJ2 は肝臓で筋線維芽細胞のアポトーシスを誘導して線維化を抑制することが報告されており、腎臓においてもこのような直接的な抗線維化作用が働いている可能性がある。このように ALOX15 の阻害または PGD2 の投与は、CKD の有望な治療標的となり得る。本研究により、Alox15 の mRNA 及びタンパクが共に CKD 腎で増加し、Alox15 $^{-/-}$ CKD マウスは野生型 CKD マウスと比較して腎機能障害と線維化が抑制されることが明らかになった。さらに、Alox15 $^{-/-}$ CKD マウスの CKD 腎で増加した脂質代謝物である PGD2 は、近位尿細管培養細胞の上皮間葉転換と線維化を抑制した。Alox15 の阻害または PGD2 の投与は、CKD および線維化の新規治療標的となる可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Takahashi Naohiro, Kikuchi Hiroaki, Usui Ayaka, Furusho Taisuke, Fujimaru Takuya, Fujiki Tamami, Yanagi Tomoki, Matsuura Yoshiaki, Asano Kenichi, Yamamoto Kouhei, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Arita Makoto, Sohara Eisei	4. 巻 25
2. 論文標題 Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02021-y	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
---------------------------	-----------------------	----

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