

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590488

研究課題名(和文)腎尿細管間質線維化における細胞分化転換に関する研究

研究課題名(英文)Study on cell transition in renal tubulointerstitial fibrosis

研究代表者

村垣 泰光(Muragaki, Yasuteru)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40190904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎尿細管間質の線維化においては、腎尿細管上皮細胞が種々の因子により刺激を受け、最終的にトランスフォーミング増殖因子(TGF)のシグナルによって誘導される上皮間葉転換機構により、尿細管上皮が間葉細胞に転換し、線維成分の合成を亢進することによって、間質に線維化を起こすと考えられている。本研究ではリン・カルシウム代謝と腎尿細管間質線維化に焦点を当て、Klothoタンパクの欠損が線維化の程度に及ぼす影響について研究を行った。その結果、Klothoタンパクの完全欠損では活性型ビタミンDが増加して、それがTGFシグナルに拮抗することにより線維化を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In renal tubulointerstitial fibrosis, tubular epithelial cells are stimulated by various factors and transform from epithelial cells to mesenchymal cells. This epithelial to mesenchymal transition is caused by transforming growth factor (TGF) - beta, which promotes interstitial fibrosis. In this study, we focused on the relationship between phosphate/calcium metabolism and renal interstitial fibrosis and investigated how a loss of Klotho influenced the degree of fibrosis. As a result, we found that the total loss of Klotho increases the active form of vitamin D, which in turn inhibits TGF-beta signaling, resulting in suppressing tubulointerstitial fibrosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：腎間質線維化 上皮間葉移行 TGF- Klotho ビタミンD リン・カルシウム代謝

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで腎尿細管間質に起こる線維化機構に焦点を当てて研究を進めてきた。腎尿細管間質線維化のモデルとして、片側尿管を結紮 (UUO) して水腎症を生じさせる UUO マウスを用いている。TGF- β が腎尿細管に作用すると、腎尿細管上皮が間葉細胞に形質転換して (EMT) 間質に遊走することが知られているが、尿細管間質線維化にはこの EMTが間葉細胞の増加と線維化に関わっている。しかし、TGF- β の細胞内シグナル分子である Smad3 のノックアウトマウスでは UUO で尿細管間質線維化が生じないことを見つけた。このことから我々は UUO により生じる尿細管間質線維化は TGF- β / Smad3 シグナルを介しておこなうことを見出した(引用文献 1)。

さらに研究を進め、腎尿細管上皮の EMT および、発生過程における後腎間葉細胞から尿細管上皮への形質変換 (MET) に関する研究を行った。Trps1 ノックアウトマウスの腎臓はネフロン数が野生型マウスと比較して約半分に減少している。それに対して間質が広がっていることから Trps1 が後腎間葉細胞の MET に関与することを実験的に明らかにした。培養後腎間葉細胞に BMP7 を反応させると間葉細胞は vimentin の発現を失い E-cadherin を発現するが、Trps1 の siRNA を作用させて Trps1 発現をノックダウンすると、BMP7 を反応させてもその反応、すなわち MET は起こらないことを示した。このことから、Trps1 は BMP7 の下流で働き後腎間葉細胞が MET により尿細管上皮に形質転換するのに重要な役割をすると結論した。この結果を受けて、もし Trps1 が BMP7 の下流で働くのであれば、BMP7 が腎尿細管間質線維化に対して拮抗的に働くので Trps1 も線維化に拮抗し、逆に Trps1 の欠損では線維化が亢進するのではないかという仮説を立て、実験を行った。Trps1 KO マウスでは生直後に死亡するため

Trps1 ヘテロ KO マウス (HT) を用いて UUO を作成した。HT マウスでは予想通り野生型マウスより線維化が亢進していた。これは TGF- β シグナルの亢進によるものであり、リン酸化 Smad3 の亢進と共に Smad7 が低下していることを見出した。これはユビキチンリガーゼの一つである Arkadia が亢進して Smad7 のプロテアソーム内での分解亢進により起こっていることを示した。以上より Trps1 は Arkadia の発現を抑制することにより Smad7 の分解を抑え、Smad3 のリン酸化を抑制することにより線維化を抑制することを示した (引用文献 2)。

2. 研究の目的

上述のように、尿細管間質線維化は種々の因子によりその線維化の程度が調節されている。近年腎尿細管で発現され、リン・カルシウム代謝の調節因子として注目されている Klotho が尿細管間質線維化に影響する報告がなされたので、その詳細な分子機構を検索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

日本クレアから購入した Klotho マウスのホモ (H0)、ヘテロマウス (HT) および野生型マウス (WT) を用いて、片側尿管を結紮 (UUO) して腎尿細管間質線維化モデルを作成した。Klotho マウスにはビタミン D 欠乏食を与え、ビタミン D が及ぼす影響について検索した。UUO 後 3 日および 7 日後にマウスを屠殺し腎臓を摘出した。摘出した腎臓の免疫組織化学および蛍光免疫組織を行った。また腎臓から RNA およびタンパク抽出し、リアルタイム PCR およびウエスタンブロットを行った。TGF- β の蛋白量は ELISA 法を用いて定量した。血清中の活性型ビタミン D 量は RIA 法で測定した。また細胞培養は腎臓尿細管上皮細胞の初代培養とラット腎臓由来細胞である NRK52E 細胞株を用いた。

4. 研究成果

1) UUO で誘導される尿細管間質線維化の程度が H0 マウスの方が HT マウスより軽度であった。HT マウスの線維化の程度が最も強かったが、H0 マウスでは WT マウスとほぼ同程度に弱かった。Klotho は TGF- β レセプター 2 型に結合してそのシグナルを抑制するので、HT マウスではその抑制が半分解除され線維化の程度が増強することは理に適っている。ところが、H0 マウスでは理屈では線維化の程度が HT マウス以上に増殖しないといけませんが、実際は WT マウスとほぼ同レベルであった。

2) I型コラーゲン、SMA発現だけでなく、リン酸化Smad3、TGF- β 発現量でもHTマウスがWT、HOマウスに比較して有意に増加していた。

3) 腎尿細管上皮細胞の初代培養でTGF- β によって誘導されるEMTを観察したところ、HO由来尿細管上皮がWT由来尿細管上皮より有意に亢進しており、HT由来尿細管上皮と比較しても同程度か、より亢進していた。このことから、HOマウスの腎臓でUUOにより起こる尿細管間質線維化の程度が抑制されていたのは細胞自体のTGF- β に対する反応性ではなく、HOマウスに特徴的にみられる他の因子であることが考えられた。そこでHOマウスにおける特徴因子を挙げると、リンとカルシウム血中濃度、FGF23および活性型ビタミンDの上昇がある。そこでこれらの因子によるTGF- β による誘導されるEMTの変化をNRK52E細胞株を用いて検索した。

4) 高リン刺激によりTGF- β 誘導性EMTには変化がみられなかった。NRK52E細胞株を高リン濃度の培養液で刺激しておいて、TGF- β 処理をしても、それにより誘導されるEMT関連分子であるEカドヘリン、I型コラーゲン、

SMAの発現には有意な差はみられなかった。

5) FGF23刺激によりTGF- β 誘導性EMTには変化がみられなかった。同様にFGF23で刺激したNRK52E細胞株にTGF- β 処理をしても、それにより誘導されるEMT関連分子の発現には差はみられなかった。

6) 活性型ビタミンDで処理した後、TGF- β 処理により誘導されるEMTは有意に抑制された。活性型ビタミンDでNRK52E細胞処理後12時間および24時間後のEカドヘリン発現は有意に増加し、逆にSMAおよびI型コラーゲン発現は有意に減少した。

7) ビタミンD欠乏食によりHOマウスの表現型はほぼWT、HTマウスと同様になった。ビタミンD欠乏食を妊娠HOマウスに与え、生まれたHOマウスは、血症活性型ビタミンDおよび体重ともWT、HTマウスと有意な差がなくなった。

8) ビタミンD欠乏食のHOマウスにおけるUUOによる腎尿細管間質線維化ではHOマウスに比べその程度は高度に亢進した。

9) ビタミンD欠乏食のHOマウスにおけるUUOで誘導される尿細管間質線維化を有する腎臓では通常のHOマウスに比較してリン酸化Smad3、TGF- β 量ともに増加していた。

10) シヤムの腎臓ではHOマウスの線維化が軽度だがWT、HTおよびビタミンD欠乏食のHOに比較して有意に亢進していた。

以上の結果から、

<引用文献>

1. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by

unilateral ureteral obstruction. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. *J Clin Invest* 112(10):1486-94, 2003

2. Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression. Gai Z, Zhou G, Gui T, Itoh S, Oikawa K, Uetani K, Muragaki Y. *J Am Soc Nephrol*. 21(9):1468-76, 2010

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5件)

Sun Y, Nakanishi M, Sato F, Oikawa K, Muragaki Y, Zhou G. Trps1 deficiency inhibits the morphogenesis of secondary hair follicles via decreased Noggin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 16;456(3):721-6. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.039.

Sun Y, Zhou G, Gui T, Shimokado A, Nakanishi M, Oikawa K, Sato F, Muragaki Y. Elevated serum 1,25(OH)₂-vitamin D₃ level attenuates renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in kl/kl mice. *Sci Rep*. 2014 9;4:6563. 査読有
doi: 10.1038/srep06563.

Shimokado A, Sun Y, Nakanishi M, Sato F, Oikawa K, Akasaka T, Muragaki Y. Smad3 plays an inhibitory role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Exp Mol Pathol*. 2014 Dec;97(3):458-64. 査読有
doi: 10.1016/j.yexmp.2014.10.005.

Gui T, Sun Y, Gai Z, Shimokado A, Muragaki Y, Zhou G. The loss of Trps1 suppresses ureteric bud branching because of the activation of TGF- β signaling. *Dev Biol*. 2013 May 15;377(2):415-27. 査読有
doi: 10.1016/j.ydbio.2013.03.014.

Sun Y, Gui T, Shimokado A, Muragaki Y.

The Role of Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrome (TRPS) 1 in Apoptosis during Embryonic Development and Tumor Progression. Cells. 2013 27;2(3):496-505. doi: 10.3390/cells2030496. 査読有

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

〔学会発表〕(計 2件)

1. Muragaki, Y.: An Increased Level of Serum 1,25(OH)₂-Vitamin D3 Alleviates Renal Tubulointerstitial Fibrosis Induced By Unilateral Ureteral Obstruction in Homozygous Klotho Mutant Mice. USCAP 2015, March 25, 2015, Boston, USA.
2. Shimokado, A., Muragaki, Y.: TGF-β/Smad3 signaling suppresses the degree of phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. Kidney Week 2014, Philadelphia, USA. Nov. 13, 2014.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村垣 泰光 (MURAGAKI, Yasuteru)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 40190904

(2)研究分担者

()

研究者番号 :