

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461228

研究課題名(和文)CCN2の機能制御による腎不全進行阻止を目指した抗腎線維化療法の開発

研究課題名(英文)Generation of anti-fibrotic therapy to combat progression of CKD via CCN2 blockade

研究代表者

岡田 浩一 (Okada, Hirokazu)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60233342

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)：CCN2は4つのモジュールを持ち分子間の結合を仲介する事で腎線維化に関与する。In vitroで第4モジュール欠損mCCN2は線維芽細胞の細胞外基質産生を低下させた。第4モジュールを欠損したmCCN2のノックインマウスを作成し、片側尿管結紮モデルおよび5/6腎摘モデルを作成したところ、腎線維化が有意に抑制された。全腎抽出蛋白を用いたウエスタンブロットでは、結紮腎におけるリン酸化Aktの減少が確認された。また第4モジュールを標的としたデコイペプチドは、腎線維化抑制効果を示した。CCN2の第4モジュールを介した作用が腎線維化に重要である可能性が高く、CCN2第4モジュールは重要なターゲットである。

研究成果の概要(英文)：CCN2 consists of four different functional modules, and the most profibrogenic module remains to be clarified. We found a module IV-defective CCN2 did not induce fibronectin synthesis in fibroblasts. Then, we generated Exon 5-deleted CCN2 gene knockin mice, found less kidney fibrosis in those mice with unilateral ureter obstruction and subtotal nephrectomy models. Decoy peptides corresponding to partial amino acid sequences of module IV significantly attenuated renal fibrogenesis. This suggests that CCN2 promotes renal fibrogenesis via its module IV, probably through Integrins-Integrin linked kinase-Akt-GSK3 pathway, which seems to be an appropriate, anti-fibrotic therapeutic target.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：CCN2 腎線維化 遺伝子改変動物 CKD 尿細管上皮細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

CCN2 は TGF- β 1 により誘導され、その線維化促進作用を中継する分子であり、以前は液性の増殖因子と考えられ、connective tissue growth factor (CTGF) と呼ばれていた。しかし特異的な受容体は同定されず、現時点では線維芽細胞の周囲間質に分布し、フィブロネクチンなどの細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) とインテグリンやシンデカンなどの細胞-ECM 接着因子とを仲介する matricellular 蛋白として線維芽細胞の活性化に関与すると考えられ、CCN2 と改称される契機となった (Kennedy L, et al. Exp Cell Res 2007)。我々は、腎線維化の進展に尿細管上皮細胞を主とする腎構成細胞が産生する CCN2 が重要な役割を果たすことを明らかにした (BBRC 2002; FASEB J 2003; J Am Soc Nephrol 2005; Am J Pathol 2006; J Am Soc Nephrol 2008)。他施設からも同様の報告が続いているが (Phanish MK, et al. Nephron Exp Nephrol 2010)、CCN2 ノックアウトマウスが胸郭奇形による出生後致死となるため、その決定的な役割を *in vivo* で証明することは困難とされてきた。(新生仔に腎発生異常は認められていない (Ivkovic S, et al. Development 2003)。) CCN2 は 4 つのモジュール構造からなり、我々は *in vitro* の系で各モジュールを欠損した変異型 CCN2 を用いた検討の結果、線維化促進作用が第 4 モジュールに担われている可能性を示唆するデータを得た。

2. 研究の目的

我が国では、毎年 3 万人の慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) 患者が末期腎不全に至って透析導入されており、CKD の進行抑制法の開発は急務である。腎線維化は原

因疾患を問わず、CKD が末期腎不全への過程でたどる最終共通路であり、理想的な治療標的と考えられる。我々は 10 年以上に渡って TGF- β 1 の線維化促進作用を中継する matricellular 蛋白である CCN2 が、腎線維化に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。CCN2 は 4 つのモジュールから構成されており、最近、我々は腎線維化における第 4 モジュールの重要性を支持するデータを得たため、第 4 モジュールを欠損した変異型 CCN2 発現マウスを作成したところ、予備実験において有意な腎線維化抑制効果が確認された。



(図 1: 誘導型の第 4 モジュール (エクソン 5) 欠損変異型 CCN2 遺伝子発現ベクター) 本研究ではこの変異型 CCN2 発現マウスを用いて、よりヒト CKD に近い病態における腎線維化抑制効果を検討する。さらに第 4 モジュールを標的としたデコイペプチドを設計し、抗腎線維化療法の開発のための基礎的な検討を行う。

3. 研究の方法

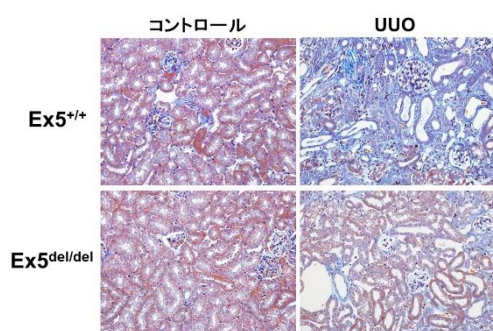
第 4 モジュール欠損変異型 CCN2 発現マウス ($Ex5^{del/del}$) と野生型マウス ($Ex5^{+/+}$) に、一側尿管結紮モデル (UUO) と腎硬化症モデル (5/6 腎摘 (血管結紮): 5/6Nx) を作成し、ヒト CKD に類似した病態における CCN2 第 4 モジュールの腎線維化促進作用を *in vivo* で検討する。第 4 モジュールを標的とした合成デコイペプチドを処置し、*in vivo* の短期効果を UUO モデルで検討する。

4. 研究成果

(1) UUO モデルにおける検討

$Ex5^{del/del}$ マウスを用いた UUO モデルを作成し

たところ、Ex5^{+/+}マウスと比較し7日目において著明な線維化の進行抑制効果が認められ、遺伝子レベルにおいてもフィブロネクチンやI型コラーゲン発現の有意な低下が認められた。



(図2: Ex5^{del/del}マウスでは、Ex5^{+/+}マウスと比較し、UUOモデルにおける線維化が著明に抑制された。(マッソントリクローム染色))

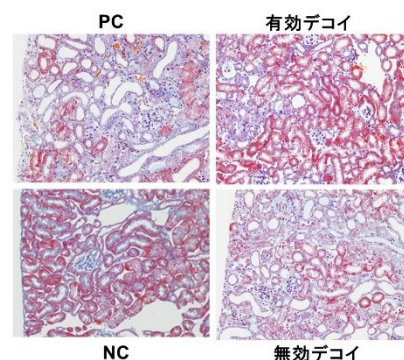
(2) 5/6Nxモデルにおける検討

Ex5^{del/del}マウスを用いた5/6Nxモデルを作成したところ、Ex5^{+/+}マウスと比較し56日目において著明な線維化の進行抑制効果が認められ、遺伝子レベルにおいてもフィブロネクチンやI型コラーゲン発現の有意な低下が認められた。

(3) デコイペプチドの検討

CCN2第4モジュールのペプチド配列を6分割し、8~12個のアミノ酸配列からなるデコイペプチドを作成した。Ex5^{+/+}マウスを用いてUUOモデルを作成し、osmotic minipumpに各デコイを充填して腹腔内に留置したところ、2つの有効デコイペプチド投与マウスの7日目において、その他の無効デコイペプチド投与マウスと比較し、著明な線維化の進行抑制効果が認められ、遺伝子レベルにおいてもフィブロネクチンやI型コラーゲン発現の有意な

低下が認められた。



(図3: 有効デコイ投与マウスでは、無効デコイ投与マウスと比較し、UUOモデルにおける線維化が著明に抑制された。(マッソントリクローム染色))

(4) 結論と今後の展望

以上より、慢性進行性腎疾患における腎線維化にはCCN2の第4モジュールの作用が重要な役割を果たしている可能性が示された、今後は、CCN2第4モジュール内の有効デコイペプチドの該当領域のインテグリン刺激効果およびその効果を抑制する低分子化合物の検出などの検討を進め、抗腎線維化療法の開発へと発展させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

1. 草野武、井上勉、岡田浩一: Roles of CCN2 and caspase activities in tubular epithelial cells involved in AKI transition to CKD. Kidney Week 2015, the Annual meeting of the American Society of Nephrology (San Diego, USA). 2015年11月6日
2. 井上勉、草野武、中元秀友、岡田浩一: CCN2第4モジュールが腎線維化に重要である。第58回日本腎臓学会学術総会(名古屋国際会議

場、名古屋) 2015年6月6日

3. 井上勉、草野武、天野博明、杉山圭、中元秀友、岡田浩一 : A module IV-defective CCN2 mutant and module IV-derived decoy peptides attenuate renal fibrogenesis. Kidney Week 2014, the Annual meeting of the American Society of Nephrology (Philadelphia, USA). 2014年11月14日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 浩一 (OKADA, Hirokazu)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60233342

(2) 井上 勉 (INOUE, Tsutomu)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 30406475