

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860684

研究課題名(和文)腎線維化におけるDNA損傷修復機構の役割の解明

研究課題名(英文)The Effects of DNA Damage Response on Renal Fibrosis

研究代表者

木津 あかね(Kizu, Akane)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30623201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復応答機構は、電離放射線、紫外線や酸化ストレスなど細胞内外からの刺激により生じたDNA損傷を修復し、ゲノムの恒常性を保つために重要であるが、近年は、老化や動脈硬化との関連も報告され、病態形成への影響が示唆されている。本研究では、マウス腎臓線維化モデルを用いて、線維化病変部ではDNA二重鎖切断の指標であるリン酸化H2AXが増加することを明らかにした。さらにヒストンH2AX欠損マウスでは、腎間質線維化病変が減少することを見出し、DNA損傷修復機構で活性化されるヒストンH2AXが、線維化形成に促進的に作用している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The DNA damage response is important for genome stability and cell survival. Recently, it has been reported that association between DNA damage response and aging and arteriosclerosis. These DNA damage are may play a role of process of aging associated disease. We found that phosphorylation of histone H2AX, one of the sensitive marker of DNA double strand breaks, is increased in fibrosis region in mouse model. Furthermore, Histone H2AX knockout mice significantly reduced fibrosis region after UUO. These findings suggested that the histone H2AX activation may have potential role of pro-fibrotic pathways.

研究分野：医歯薬学

キーワード：線維化 DNA損傷 DNA修復

### 1. 研究開始当初の背景

生体は、DNA 損傷に対し、ゲノムの安定性を保つため、様々な DNA 修復機構を持つ。加齢や糖尿病では、増加した内因性の酸化ストレスは、DNA 損傷をおこすとともに、組織の線維化や臓器機能不全を導くと考えられるが、実際にそれを示すデータはほとんどない。近年のヒストン H2AX のリン酸化を指標とした DNA 二重鎖切断部の高感度検出法の発達によって、わずかな DNA 損傷に対して可視化と定量化ができるようになった。さらに、加齢や高血圧において、ヒト末梢血単核球での DNA 二重鎖切断が増加することが報告されており、DNA 損傷・修復機構による病態形成への関わりが考えられる。

### 2. 研究の目的

マウス腎尿管間質線維化モデルを用いて、DNA 損傷・修復因子の腎間質線維化形成への役割を検討する。

### 3. 研究の方法

(1)腎間質線維化部位における DNA 損傷と修復遺伝子の発現

8 週令の C57/Bl6 マウスを用いて、片側尿管結紮術 (Unilateral ureteral obstruction; UUO) による尿管間質線維化モデルを作製し、7 日後と 14 日後に腎臓を摘出した。腎組織は、ブアン液固定しパラフィン包埋した。線維化の程度は、シリウスレッド染色と collagen type III 染色にて評価した。DNA 損傷の程度は、リン酸化ヒストン H2AX の免疫染色と Western Blotting による定量的評価を行なった。

(2)UUO による腎間質線維化へのヒストン H2AX の影響

8 週令の H2AX(+ / +)、H2AX(+ / -) および H2AX(- / -) の 3 群 (n=3~6) のマウスを用いて、UUO による尿管間質線維化モデルを作製し、免疫染色により線維化の程度を評価した。また、マクロファージマーカー F4/80 を用いて炎症性細胞の浸潤の程度を検討した。

### 4. 研究成果

(1)腎間質線維化病変における DNA 損傷と修復機構の活性化

C57BL/6 を用いて、UUO により腎線維化病変を誘導し、線維化病変と DNA 修復関連因子の発現を調べた。図 1 に示すように、術後 7 日目の UUO 腎では健側腎と比べて、線維化病変の増加 (Sirius Red) と DNA 損傷の指標となるリン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) と p53 の増加を認めた。

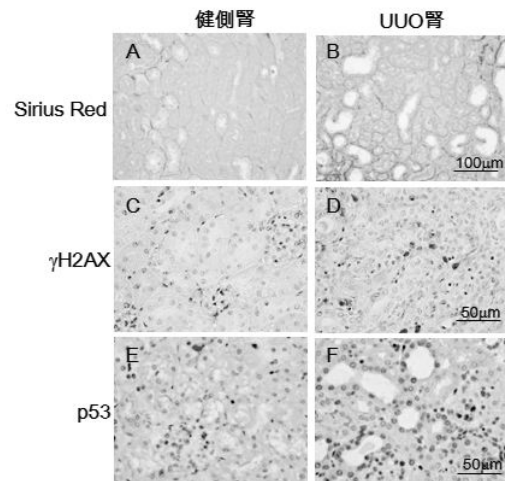


図 1. マウス腎組織におけるリン酸化ヒストン H2AX と p53 の発現

さらに、図 2 に示すように  $\gamma$ H2AX の蛋白定量的評価を Western Blotting にて行ったところ、UUO 腎において有意な増加を認めた。

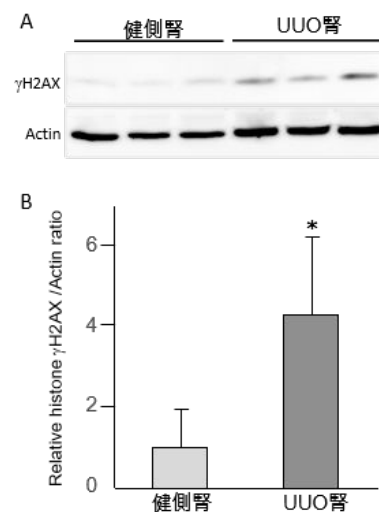


図 2. UUO 術後 7 日目のマウス腎組織における  $\gamma$ H2AX の増加。

(2)ヒストン H2AX の UUO による腎間質線維化への影響

UUO 施行後 7 日目と 14 日目に腎臓を摘出し、腎間質線維化病変の程度を collagen type III に対する免疫組織学的検査を行ない検討した。図 3 と図 4 に示すように、H2AX(+ / -) と H2AX(- / -) では、H2AX(+ / +) のマウスと比べて、有意な線維化量の減少が認められた。

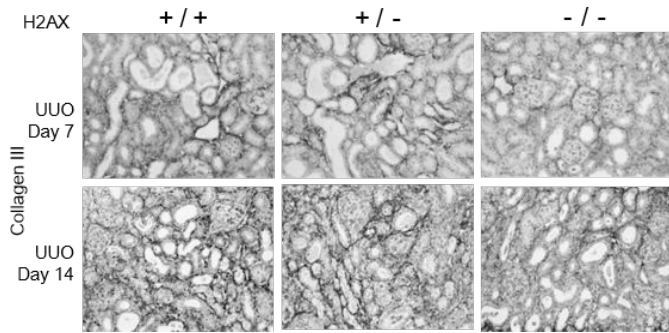


図 3. ヒストン H2AX の低下による腎間質線維化の抑制

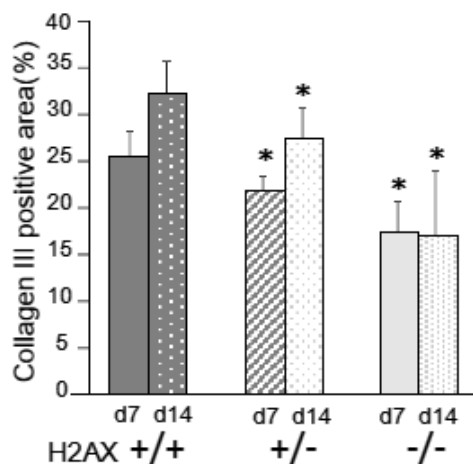


図 4. 野生型マウス(+/+)とヒストン H2AX 遺伝子欠損マウス(+/-, -/-)のマウス腎組織における免疫組織学的検査による Collagen III 陽性部分の定量的評価

さらに、これらの腎組織より RNA を抽出し、Real time PCR を行ない、collagen type III の mRNA の発現量を検討した。図 5 に示すように collagen type III の遺伝子発現レベルも、免疫学的検査の結果と同様に、H2AX(+/-)と H2AX(-/-)では、H2AX(+/)のマウスと比べて、有意な減少が認められた。また、Collagen Type I の mRNA の発現量も同様に低下していた。さらに、筋線維芽細胞のマーカーである Vimentin と  $\alpha$ SMA の発現量を検討しところ、UUO 腎では上昇を認め、その程度は、H2AX(+/-)と H2AX(-/-)では、H2AX(+/)のマウスと比べて、減少が認められた。

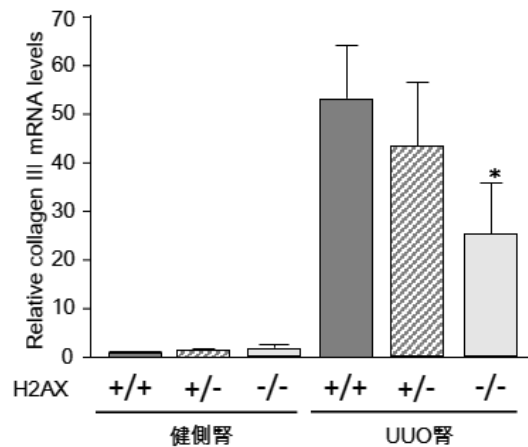


図 5. Real time PCR による collagen type III mRNA 発現の定量的評価

(3) DNA 修復遺伝子 H2AX による炎症性因子に対する影響

UUO により誘導された腎間質線維化病変の機序として、マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が報告されている。そこで、ヒストン H2AX 遺伝子改変マウスにおけるマクロファージの浸潤を検討した。図 6 に示すように UUO 術後 14 日後の腎間質へのマクロファージの浸潤の程度は、H2AX(-/-) マウスでは、H2AX(+/)と比べて有意に減少していた。

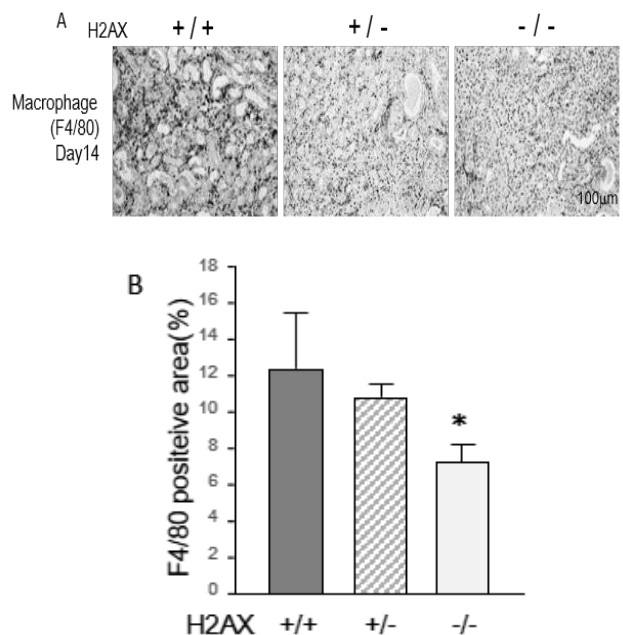


図 6. 腎線維化病変部へのマクロファージの浸潤

以上より、マウス腎間質線維化モデルである UUO を用いて線維化病変に対する DNA 損傷・修復機構の関係を検討したところ、線維化病変部では、リン酸化ヒストン H2AX の発現増加が認められ、線維化と DNA 損傷が関連することが示唆された。

さらに活性化されたヒストン H2AX の影響を検討するため、ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウスを用いた検討では、UUO により誘導した腎間質線維化の程度は、ヒストン H2AX の発現が低下するにつれ、発現量依存的に線維化病変量の減少を認め、DNA 損傷・修復遺伝子であるヒストン H2AX の低下は、線維化抑制に働くと考えられた。また、ヒストン H2AX の低下による線維化抑制の機序として、マクロファージの浸潤抑制を認めたことより、炎症を介した機序が考えられ、ヒストン H2AX の活性化は、線維化病変部における炎症性経路に關与する可能性が示唆された。

## 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)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名：木津あかね

発表表題：マウス腎線維化モデルを用いた、DNA 損傷の線維化への影響。

発表学会：第 37 回日本分子生物学会

発表年月日：2014 年 11 月 27 日

発表場所：パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：加熱装置

発明者：森田隆、吉田佳世、木津あかね

権利者：森田隆、吉田佳世、木津あかね

種類：特許

番号：特願 2015-69853

出願年月日：2015 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/molecular-genetics/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

木津あかね (AKANE KIZU)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30623201