

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860879

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎におけるfibrocyte線維化促進機序の分子生物学的解明

研究課題名(英文)The role of fibrocytes in the pathophysiology of renal fibrosis in polycystic kidney disease

研究代表者

浜 武継 (Hama, Taketsugu)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00508020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎(PKD)の尿細管における病態のひとつが線維化であり、単球やマクロファージなどの関与が報告されているが、詳細は不明である。近年、白血球系マーカーと間葉系マーカーを共有する骨髄由来細胞fibrocyteと臓器線維化の関与が提唱されているが、PKDでのfibrocyteの検討はないため、PKDモデルのcpkマウスを用いて、fibrocyteの関与を調査した。結果、cpkマウスの腎臓では、線維化が進行しており、fibrocyteが染色で確認できた。以上より、fibrocyteが線維化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of cystic epithelia in polycystic kidney disease (PKD) is characterized by altered proliferative activity, a secretory rather than absorptive function, and an abnormal matrix microenvironment. However, the aspect of extracellular matrix abnormality, especially fibrosis, has not been fully investigated in PKD. Recently, circulating fibrocytes expressing both leukocyte and mesenchymal antigens have been clarified to have a key role of progressing fibrosis in any organ. Therefore, we investigate fibrocytes contribution in cpk mouse. As a result, collagen type I gene level expressed significantly higher in cpk mice than control. CD45 and collagen dual-positive cells were detected predominantly in cpk mice. These findings suggested that fibrocytes were recruited in cpk and participated in the progression of fibrosis. Therefore, they may be new targets for a disease-specific intervention.

研究分野：小児腎臓病

キーワード：多発性嚢胞腎 fibrocyte 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease: PKD) は、腎の異形成を伴わない両側びまん性嚢胞形成を特徴とする遺伝子疾患群で、我が国で非常に頻度が高い遺伝性疾患の一つである。遺伝性腎疾患では、最多の400-1000人に1人を占める。常染色体優性遺伝型 (ADPKD) と常染色体劣性遺伝型 (ARPKD) があり、両者には共通の細胞病態が存在する。

PKDでは、尿細管上皮細胞が、増殖、分泌、細胞外基質異常・線維化を起こす。その結果、尿細管細胞に嚢胞が形成され、最終的に腎不全に至る。これまで、増殖や分泌の抑制を目的とした研究は多数あり、一定の効果は期待できるものの、「線維化」抑制の側面からのアプローチも必要である。

近年、fibrocyteが肺や肝臓の線維化に関与していることが明らかになり、予後予測因子としてその応用が進められつつある。ところが、PKDの線維化に対して、fibrocyteに着目した研究はない。

## 2. 研究の目的

腎間質線維化は、腎不全に至る進行性腎臓病の共通進展機序であり、その病態の解明と治療の確立が腎不全への進展阻止を考える上で重要である。これまで線維化の機序として、腎内の固有線維芽細胞や単球、マクロファージ、上皮間葉移行などの関与が報告されている。近年、骨髄由来白血球系マーカーと間葉系マーカーをともに有する骨髄由来細胞 fibrocyte が注目されてきた。fibrocyte は、collagen 産生能を有し、各種臓器線維化に関与することが明らかとなってきた。

*cpk* マウスは、PKDの原因遺伝子産物の一つである *cystin* が障害された動物モデルである。

本研究では、線維化の原因として新たに注目されている fibrocyte が、PKDにおける腎線維化に重要な役割を担っているという仮説をたて、これを証明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、PKDにおける腎線維化の機序

の解明のために、次の課題を中心に研究をすすめることとした。

[1] *cpk* マウスにおいて、fibrocyteが増加しているのかを調べるため、骨髄、末梢血液、腎組織から単核球を抽出し、骨髄由来白血球系細胞マーカーと間葉系マーカーとを用いて flow cytometry を行い、評価する。

[2] 線維化マーカーである I 型 collagen の発現レベルが、*cpk* マウスにおいて亢進しているのかを評価する。

[3] 腎線維化の進行と fibrocyte の増殖の相関を時系列で評価し、腎線維化における重症化のマーカーとして応用できるかを検討する。

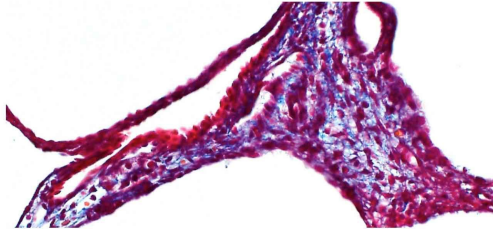
[4] *cpk* マウスで線維化が確認できた場合、fibrocyte が腎に存在しているのかを骨髄由来白血球系マーカーと間葉系マーカーとを用いた二重染色で評価する。

これらの実験を行うため、*cpk* マウスと対照マウスの腎臓を生後0日、7日、14日、21日で採取し、凍結、および、パラフィン包埋で保存した。腎臓の線維化の程度を評価するため、Masson-Trichrome 染色と、I 型 collagen の染色を行った。また、凍結腎組織から RNA を抽出し、I 型 collagen の RNA 発現レベルを real-time PCR で評価した。さらに、fibrocyte を同定するために、腎組織を用いて、白血球系マーカーの抗 CD45 抗体と間葉系マーカーの抗 I 型 procollagen 抗体を用いた蛍光多重染色を行った。

## 4. 研究成果

Masson-Trichrome 染色の結果、*cpk* マウスの細胞外基質で、collagen の沈着が上昇していることが判明した(図1)。I 型 collagen の染色でも同様の結果が得られた。

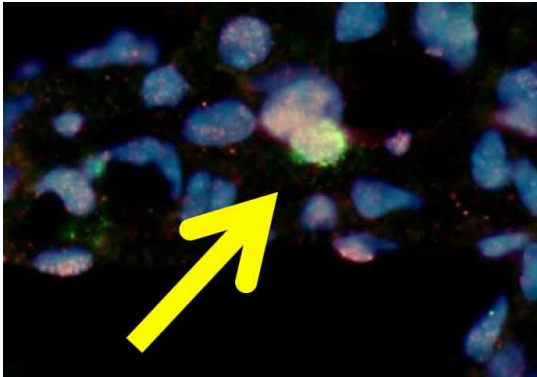
*cpk* mouse (day 14, x200)



(図 1: *cpk* マウスの腎にみられる線維化)

I 型 collagen の mRNA の発現レベルを real time PCR で検討した結果、対照マウスと比較し、*cpk* マウスでは、その発現レベルが上昇していた。また、日齢を経るごとに *cpk* マウスで線維化が亢進している傾向を確認できた。

*cpk* マウスと対照マウスの腎臓の組織で、CD45 抗体と I 型 Procollagen 抗体を用いた蛍光二重染色で、*cpk* マウスの腎臓に両抗原を有する細胞を同定できた (図 2)。



(図 2: *cpk* マウスの腎臓における白血球マーカー、及び、骨髄由来マーカー共陽性の細胞)

flow cytometry の結果、*cpk* マウスでは骨髄と腎において、CD45 抗原と CD184 抗原、I 型 collagen を全て有する fibrocyte の比率が有意に高かった。末梢血液中でも、有意差は見られないものの *cpk* マウスで fibrocyte が多い傾向を認めた。

これらの結果から、*cpk* マウスで線維化が亢進していること、fibrocyte が *cpk* マウスで同定できること、その数が対照マウスに比

べ増加していることが判明し、fibrocyte が腎線維化に関与する因子である可能性が示唆された。

今回、得られた結果は、国内外の学会で発表を行った。

また、本研究中に、*cpk* マウスの嚢胞形成や線維化において、smad3 タンパクのリン酸化異常が関与している可能性を確認できた。そこで、smad3 遺伝子をノックアウトすることで、多発性嚢胞腎に見られる表現型に変化が見られるのか、引き続き研究していく予定としている。

#### 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 2 件)

1. Taketsugu Hama, Koichi Nakanishi, Hironobu Mukaiyama, Hiroko Togawa, Masashi Sato, Yuko Shima, Masayasu Miyajima, Kandai Nozu, Shizuko Nagao, Hisahide Takahashi, Kazumoto Iijima and Norishige Yoshikawa, Smad3 Gene Deletion Ameliorates Cyst Formation and Interstitial Fibrosis in *cpk* mouse, a model of ARPKD, American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week 2014, 2014 年 11 月 14 日、フィラデルフィア (アメリカ合衆国)

2. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂、*cpk* マウスにおける嚢胞形成に対する Smad3 ノックアウトの効果、第 22 回嚢胞性腎疾患研究会、2014 年 9 月 20 日、順天堂大学 (東京都・文京区)

3. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂、*cpk* マウスにおける嚢胞形成に対する smad3 ノックアウトの効果、第 23 回発達腎研究会、2014 年 8 月 31 日、慶應義塾大学医学部 (東京都・新宿区)

4. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂、*cpk* マウス ARPKD モデルにおける病的 Smad3 リン酸化、第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会、

2014年6月5日、秋田ビューホテル(秋田県・秋田市)

5. Taketsugu Hama, Koichi Nakanishi, Hironobu Mukaiyama, Hiroko Togawa, Masashi Sato, Yuko Shima, Masayasu Miyajima, Kandai Nozu, Shizuko Nagao, Hisahide Takahashi, Kazumoto Iijima and Norishige Yoshikawa, Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions in cyst-lining epithelia in *cpk* mouse, a model of ARPKD, American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week 2013, 2013年11月7日、アトランタ(アメリカ合衆国)

6. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂、*cpk* マウスにおける病的 Smad3 リン酸化、第21回嚢胞性腎疾患研究会、2013年9月21日、杏林大学医学部附属病院(東京都・三鷹市)

7. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂、*cpk* マウスにおける病的 Smad3 リン酸化、第22回発達腎研究会、2013年9月14日、高槻市生涯学習センター(大阪府・高槻市)

8. Taketsugu Hama, Koichi Nakanishi, Hironobu Mukaiyama, Masashi Sato, Hiroko Togawa, Yuko Shima, Masayasu Miyajima, Hisahide Takahashi, Shizuko Nagao, Kazumoto Iijima and Norishige Yoshikawa, Possible contribution of fibrocytes to renal fibrosis in *cpk* mouse, a model of ARPKD, International Pediatric Nephrology Association (IPNA), 2013年9月2日、上海(中国)

9. 浜武継、中西浩一、向山弘展、佐藤匡、戸川寛子、島友子、宮嶋正康、高橋久英、長尾静子、飯島一誠、吉川徳茂、*cpk* マウス多発性嚢胞腎モデル腎線維化における fibrocyte の関与、第48回日本小児腎臓病学会学術集会、2013年6月29日、徳島県あわぎんホール(徳島県・徳島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜 武継 (Hama, Taketsugu)

和歌山県立医科大学・博士研究員

研究者番号：00508020