

## 193. 細胞間相互作用からみた腎臓病進展メカニズムの解明

柳田 素子

京都大学 大学院医学研究科 腎臓内科学

Key words : 線維化, 形質転換, クロストーク

### 緒言

慢性腎臓病は今や成人の8人に1人が罹患する国民病であり、進行すると末期腎不全に陥ります。慢性腎臓病の治療薬開発は急務ですが、その進展メカニズムには不明な点が多く残されており、治療薬開発が進まない原因となっています。腎臓はその機能単位であるネフロンと、ネフロンの間を埋めるように存在する線維芽細胞から成り立っています。慢性腎臓病が進行してネフロンが障害されると、それに伴って線維化が起り、線維化とともにネフロンの回復や再生は困難になります。ネフロンの障害と線維化には密接な関連性があると想定されていますが、その詳細な分子機構は不明です。

腎臓病が進行するとネフロンの中に myofibroblast が出現し、細胞外マトリックスを産生して線維化を惹起します。この myofibroblast の由来については諸説あり、議論は混迷を極めていましたが<sup>1)</sup>、我々は系譜追跡実験を用いて、腎臓にもともと存在していた線維芽細胞が腎臓病の過程で形質転換し、myofibroblast になることが線維化の原因であることを見出しました<sup>2)</sup>。また、線維芽細胞の一部はエリスロポエチン (EPO) 産生細胞として働いていますが、その EPO 産生能も形質転換とともに低下し、腎性貧血の原因となることも明らかにしました。

次のステップとしては、線維芽細胞の形質転換を誘発する因子の同定が重要と考えられます。

ネフロンは血液を濾過する糸球体と、濾過された原尿から溶質を取捨選択する尿細管から成り立っています。慢性腎臓病では障害された尿細管の周囲から線維化が始まること、尿細管障害と線維化の程度が腎臓病の予後と強い相関を認めることが知られています。我々はこれらの知見から、尿細管細胞と線維芽細胞には何らかの相互作用があると想定し、尿細管が障害されると、この相互作用が破綻することによって線維芽細胞の形質転換が惹起されるという仮説を立てました。

### 方法および結果

従来の腎臓病モデルは種々の細胞を障害することから、尿細管障害が線維化を惹起することを証明するには不向きです。その問題点を克服するために、我々は TRECK 法を用いる実験を計画しました。

まず、多くの腎臓病で障害を受ける近位尿細管に注目し、近位尿細管特異的に誘導型の Cre リコンビナーゼを発現する CreERT2 マウスをノックインの手法を用いて作製しました<sup>3)</sup> (図 1)。Ndr1 遺伝子が近位尿細管に強く発現することに注目し、CreERT2 カセットを同遺伝子座にノックインしたマウスを作製しました。次に Cre 存在下で遺伝子組み換えが起きると蛍光蛋白を発現する indicator マウスと交配し、誘導型 Cre を活性化するタモキシフェン投与前は遺伝子組み換えが起きないこと、タモキシフェン投与後は 90 %以上の近位尿細管で組み換えが起きることを確認しました。集合管にも 30 %程度の組み換えが見られました。

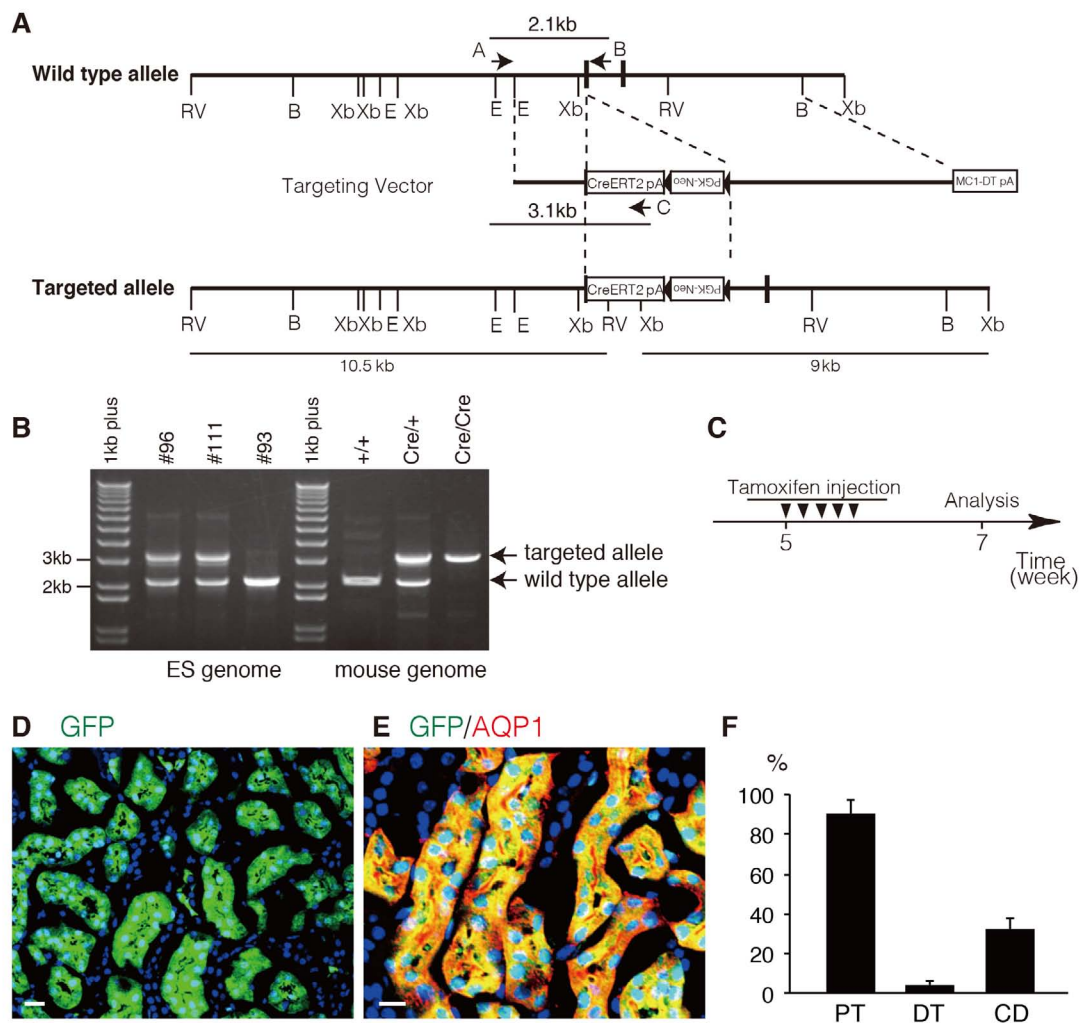


図1. *NdrG1CreERT2* マウスの遺伝子組換え効率

(A) ノックインマウス作製 strategy: CreERT2 カセットを *NdrG1* 遺伝子座にノックインした。(B) 正しく target されたクローン (#96, #111) の選抜。(C) 実験デザイン: タモキシフェンを連続5日投与した後に解析した。(D) indicator の蛍光発現。(E) GFP と近位尿細管マーカーである AQP1 の二重染色。(F) 近位尿細管 (PT)、遠位尿細管 (DT)、集合管 (CD) における組み換え効率の比較。scale bar: 20 μm.

次に、*NdrG1CreERT2* マウスを Cre 存在下でジフテリア毒素受容体 (hHBegf) を発現する iDTR マウスと交配し、タモキシフェン投与後に近位尿細管でジフテリア毒素受容体が発現することを確認しました<sup>4)</sup> (図2)。このマウスにおける集合管の組み換え効率は先ほどよりは低く、20%以下でした。

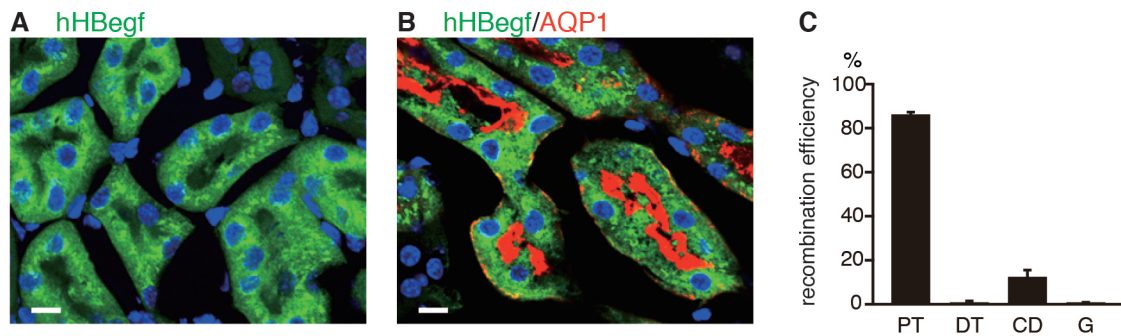


図2. ジフテリア毒素受容体発現の評価

(A) ジフテリア毒素受容体 (hHBegf) の発現。(B) ジフテリア毒素受容体と近位尿細管マーカである AQP1 の二重染色。(C) 近位尿細管 (PT)、遠位尿細管 (DT)、集合管 (CD) における組み換え効率の比較。scale bar: 10  $\mu$ m.

このマウスにジフテリア毒素を投与すると、近位尿細管特異的な障害が惹起できること、急激に腎機能が低下する急性腎障害 (Acute Kidney Injury: AKI) という病態を惹起することを見いだしました (図3)。

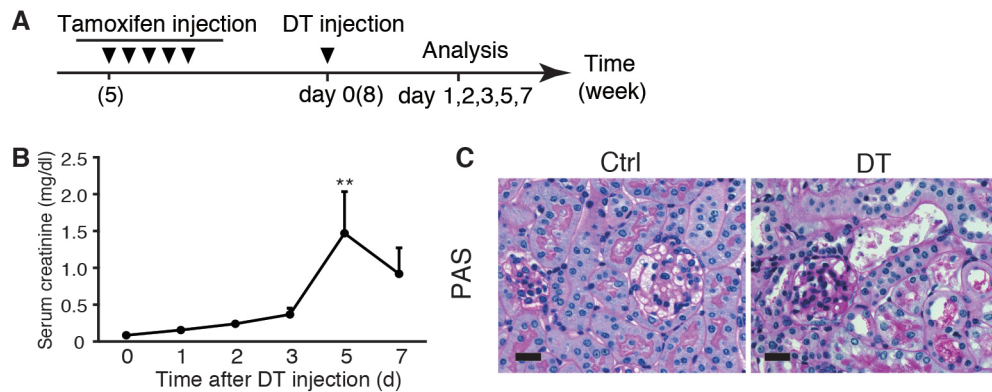


図3. ジフテリア毒素投与による近位尿細管障害と急性腎障害

(A) 実験デザイン：タモキシフェン投与後にジフテリア毒素 (DT) 投与を行った。

(B) 腎機能の推移：血中クレアチニンが上昇し、腎機能の急激な悪化を示した。

\*\* $p < 0.01$  (ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* analysis) .

(C) 組織所見：ジフテリア毒素投与群で顕著な尿細管障害が惹起された。scale bar: 20  $\mu$ m.

この際、集合管の免疫染色、電子顕微鏡による観察を行いました。集合管障害は認めませんでした。

さらに、障害された近位尿細管周囲に線維化が惹起されること、毒素投与後に collagen の発現上昇および EPO の発現低下が惹起されることを見いだしました (図4)。

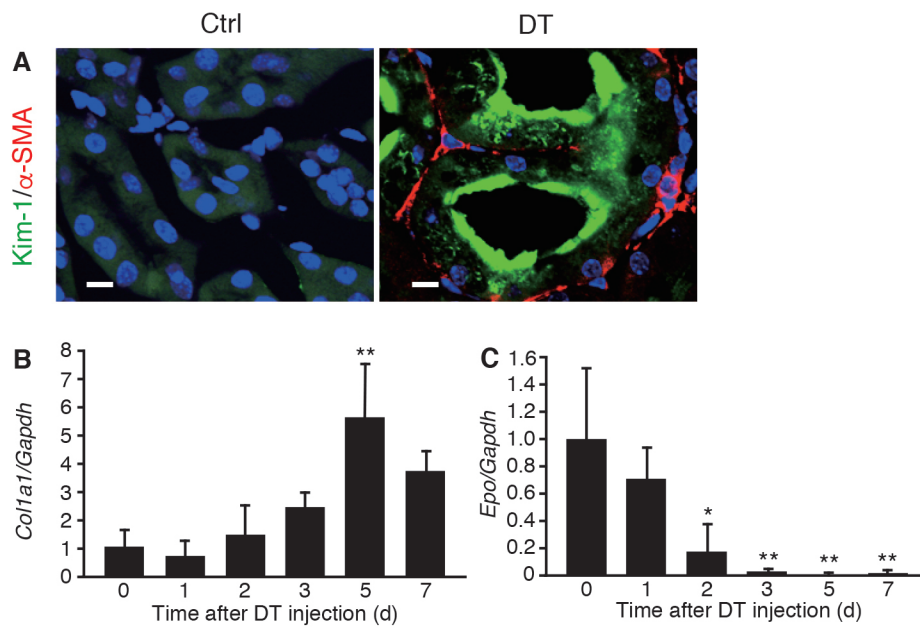


図4. 近位尿細管障害に伴う線維化とエリスロポエチン発現低下

(A) 近位尿細管障害マーカー Kim1 と myofibroblast マーカー  $\alpha$  SMA の二重染色。scale bar: 10  $\mu$  m.

(B、C) 腎臓における *colla1* 遺伝子および *erythropoietin* 遺伝子発現解析。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  (ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* analysis) .

次に、投与するタモキシフェンの量が多いほど広範にジフテリア毒素受容体が発現すること、投与するジフテリア毒素の量が多いほど近位尿細管障害の程度が重症化することを用いて、種々の近位尿細管障害モデルを惹起しました。その結果、近位尿細管障害が軽微で単回の場合には線維化が可逆性であること、軽微な障害であっても繰り返す場合には、線維化が不可逆性となることを見いだすとともに、近位尿細管障害の程度次第では、糸球体硬化や遠位尿細管障害といった広範なネフロン障害を惹起することを見いだしました (図5)。

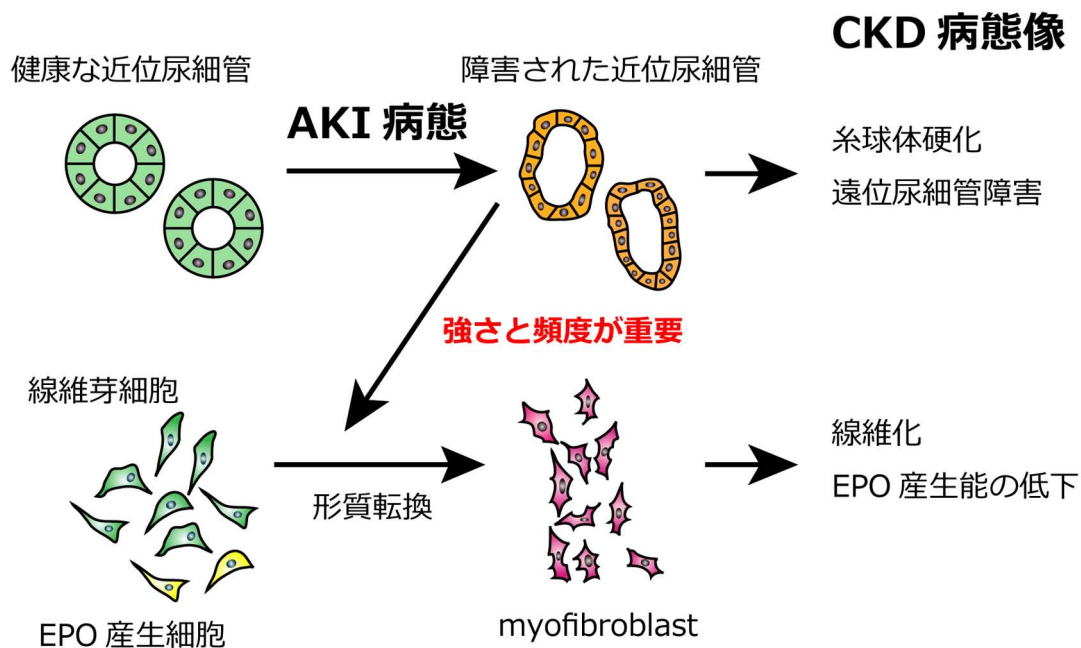


図5. 近位尿細管障害が広範なネフロン障害を惹起するメカニズム

近位尿細管障害の強さと頻度に応じて線維芽細胞の形質転換が惹起され、その結果、線維化と EPO 産生低下が起きる。それに加えて、近位尿細管障害の程度次第では、糸球体硬化や遠位尿細管障害といった広範なネフロン障害が惹起される。近位尿細管障害は急性腎障害（AKI）で高頻度に見られる病態だが、近年 AKI から慢性腎臓病（CKD）と移行することが疫学的に知られている。今回見いだされた病態は AKI から CKD へ移行するメカニズムの一端を説明しうる可能性がある。

## 考 察

近年、AKI は従来考えられていたような可逆的な疾患ではなく、末期腎不全や慢性腎臓病（CKD）に至る予後の悪い病態であることが明らかとなり、世界的に注目を集めています。しかしながら、そのメカニズムは明らかにされていませんでした。

今回我々は、近位尿細管障害単独で CKD へと移行しうることを証明しました。さらに、近位尿細管障害の強さと頻度が CKD への移行に重要という所見は、AKI の重症度や頻度が CKD への移行を左右するという疫学結果の理論的根拠となる結果です。

本研究の結果は、AKI を適切に治療し、近位尿細管を健康な状態に保つことが CKD や末期腎不全への移行を食い止め、透析導入を遅延させる可能性を強く示唆するものです。今後、近位尿細管障害を標的とした創薬が期待されますが、本モデルは「AKI to CKD モデル動物」として創薬の場でも有用性が高いと期待できます。さらに、本研究の結果から、AKI に伴う線維化は二次的であることが明らかになり、線維化を抑える治療単独では CKD への進展の抑制には不十分であることも明らかになりました。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は奈良先端科学技術大学院の河野憲二先生、UCSD の Kumar Sharma 先生、京都大学病院病理部の羽賀博典教授、新潟大学腎臓研究所の山本格先生である。

## 文 献

- 1) Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis *Kidney Int.* 2015 Feb; 87(2):297-307. doi: 10.1038/ki.2014.287. Epub 2014 Aug 27.

- 2) Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M. Dysfunction of fibroblasts of extra-renal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice J Clin Invest. 2011 Oct;121(10):3981-90. doi: 10.1172/JCI57301. Epub 2011 Sep 12.
- 3) Endo T, Nakamura J, Sato Y, Asada M, Yamada R, Takase M, Takaori K, Oguchi A, Iguchi T, Higashi AY, Ohbayashi T, Nakamura T, Muso E, Kimura T, Yanagita M. Exploring the origin and limitations of kidney regeneration J Pathol. 2015 Jun;236(2):251-63. doi: 10.1002/path.4514. Epub 2015 Mar 4.
- 4) Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, Nakata H, Sato Y, Takase M, Nameta M, Yamamoto T, Economides AN, Kohno K, Haga H, Sharma K, Yanagita M. Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis J Am Soc Nephrol. 2015 Dec 23. pii: ASN.2015060647. J Am Soc Nephrol. 2016 Aug;27(8):2393-406. doi: 10.1681/ASN.2015060647.