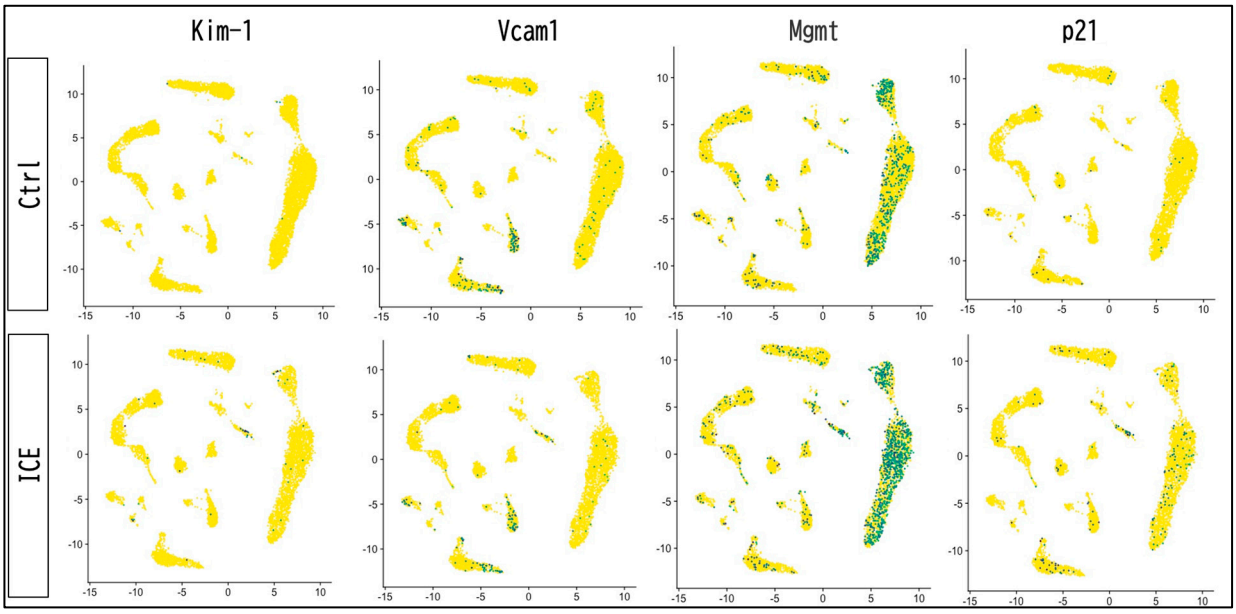
47　個体と腎臓の寿命ミスマッチ解消の基盤創出	岸　誠司

【目的】世界的な高齢化に伴い、慢性腎臓病（CKD）の患者数が増加している。特に、高齢化が進む日本では、透析開始時の平均年齢が 1985 年の 54.41 歳から 2020 年には 70.88 歳へと上昇しており高齢化の影響は大きい。加齢だけでも腎機能が低下することが知られているが、高齢者は急性腎障害からの回復も遅く、さらに回復したとしても慢性腎臓病への移行（AKI to CKD transition）が多い。この臨床的事実は、加齢により増加する老化細胞の増加と腎機能の低下が関連している可能性を示唆しており、細胞老化の制御が CKD 治療の鍵となりうることを示している。我々は AKI to CKD transition に DNA 損傷応答機構の破綻と加速する細胞老化が関与することをこれまでに明らかにしており、本研究では一過性の内因性 DNA 損傷が腎構成細胞の老化に与える影響を解明するべく、新規モデルマウス（ICE マウス、Hayano M, et al. Cell. 2023;186 (2) :305-326.e27）を用いて探索的研究を行った。

【方法】I-PpoI$^{STOP/+}$マウスと Cre$^{ERT2/+}$マウスの交配により ICE マウスを作製した。このマウスにタモキシフェンを投与すると、エンドヌクレースである I-PpoI がマウス DNA を切断することができる。生後 10～12 週のマウスにタモキシフェン投与を行い、DNA 損傷を誘導した。タモキシフェン投与は 4 週間行い、14 ヶ月齢まで飼育した後に屠殺した。腎組織を用いて組織学的評価、Single-nucleus RNA seq による網羅的解析を行った。

【結果】PAS 染色およびマッソン染色による形態学的な評価ではコントロール群に比較して著明な差は認めなかった。Single-nucleus RNA seq により、一過性の DNA 損傷の影響は近位尿細管に強く出ることが明らかとなった。
ICE マウスでは、修復不全のマーカーである Kim-1 や Vcam1 を発現する近位尿細管の増加が認められた。さらに、ICE マウスでは近位尿細管で p21 の発現が上昇し、DNA 修復遺伝子 Mgmt（O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase）の発現上昇が示され、これらの細胞におけるゲノム DNA の不安定性と進行する細胞老化が示唆された。

尿細管不全修復、DNA 損傷および細胞老化関連遺伝子発現レベルの UMAP



47. 個体と腎臓の寿命ミスマッチ解消の基盤創出

岸　誠司

川崎医科大学 医学部 腎臓・高血圧内科学

Key words：AKI to CKD transition，DNA 損傷，細胞老化，ICE マウス，Single-nucleus RNA seq

緒　言

グローバルな高齢化のため慢性腎臓病（CKD）患者の増加は世界中の課題である。とりわけ、日本は世界の最長寿国でもあり、1985 年 54.41 歳→2020 年 70.88 歳と透析導入時の平均年齢の高齢化も著しい（日本透析医学会）。加齢のみでも腎機能は低下することが知られているが、その実態は不明である。加齢による個体の老化とともに老化した細胞も増加する。高齢者は急性腎障害からの回復が悪いことやその後に CKD に移行する（AKI to CKD transition）ことが多いことから老化細胞の増加と加齢による腎機能低下が関連していると考えることに矛盾はない。マウスレベルでは腎機能低下に老化細胞が関与すること［1］、慢性炎症が加わることでより加速されることも示されている。したがって腎構成細胞におこる細胞老化を制御するメカニズムが明らかになれば、それは原疾患に左右されない CKD 治療のターゲットとなることが期待される。

本研究では、我々がこれまで取り組んできた DNA 損傷応答機構と腎の線維化に関連する知見［2，3］を発展させるべく新規モデルマウス（ICE マウス）［4］の解析を行うことにより、内因性の DNA 損傷が腎構成細胞の細胞老化（Senescence）に与える影響をさぐる探索的な研究を行うこととした。

方　法

1. ICE マウス作製

I-PpoI$^{STOP/+}$マウスと Cre$^{ERT2/+}$マウスを交配し、ICE（Inducible Changes in Epigenome）マウスを作製する。このマウスはタモキシフェン投与下では、I-PpoI と呼ばれるエンドヌクレースによりマウスゲノムが切断され、DNA 損傷が誘導できる。DNA 損傷を生後 10～12 週齢にて 4 週間誘導したのち、14 カ月齢まで飼育して屠殺した。

2. ICE マウス腎のサンプル調製

マウスを安楽死させたのち腎を摘出した。左心室をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で灌流したのちに snRNA-seq のために、腎臓を液体窒素でスナップ凍結した。凍結切片の場合、腎臓を 4%パラホルムアルデヒドで氷上 2 時間固定し、30%（vol/vol）スクロース中、4℃で一晩インキュベートし、最適切削温度コンパウンド（サクラファインテック）に包埋して 7 μm 切片を切り出した。パラフィン切片の場合は、腎臓を 10%（vol/vol）ホルマリンで固定し、パラフィン包埋して 4 μm の切片を切り出した。

3. Single-nucleus RNA seq

組織からの単一核の単離をスナップ凍結した腎を用いて行った。プロテアーゼ阻害剤（5892791001、Roche）と RN アーゼ阻害剤（N2615、Promega ; AM2696、Life Technologies）を添加した Nuclei EZ Lysis buffer（NUC-101、Sigma）を用いて核を単離した。サンプルを 2 mm 以下に切り、氷冷した Nuclei EZ 溶解バッファー2 mL 中で Dounce ホモジナイザー（885302-0002、Kimble Chase）を用いてホモジナイズし、氷上でさらに 2 mL の溶解バッファーとともに 5 分間インキュベートした。ホモジネートを 40 μm のセルストレーナー（43-50040-51、pluriSelect）でろ過

し、500×g で 5 分間、4℃で遠心した。ペレットを再懸濁し、4 mL のバッファーで洗浄し、氷上で 5 分間インキュベートした。さらに遠心後、ペレットを Nuclei Suspension Buffer（1×PBS、1%ウシ血清アルブミン、0.1% RNase inhibitor）に再懸濁し、5 μm セルストレーナー（43-50005、pluriSelect）でろ過した。核を血球計数装置（InCYTO C-chip）でカウントし、10×Chromium 装置（10×Genomics、Pleasanton）を用いてバーコード付きゲルビーズで各液滴に分割した。単一核を溶解し、各液滴内で RNA を相補的 DNA（cDNA）に逆転写した。エマルジョンを破砕した後、cDNA を増幅および断片化し、続いて Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit（v2）を用いてイルミナアダプターを添加した。サンプルは NovaSeq 6000（Illumina）の S4 フローセルでインデックス付けされ、シーケンスを行った。

4. snRNA-seq データ処理

snRNA-seq データは、CellRanger を用いて処理し、エクソンおよびイントロンのリードを利用した UMI カウントテーブルを生成した。続いて、R パッケージの Seurat を使用して、正規化・スケーリング・クラスタリングを含む解析を行った。まず各マウスサンプルを別々に分析し、200 未満または 6,000 を超える遺伝子が検出された核および、ミトコンドリア遺伝子およびリボソーム遺伝子にマッピングされた UMIs の比率が比較的高い核を除外した。続いて scDblFinder を使用してダブレットを除去した。すべてのマウスデータをマージした後、データをログ正規化およびスケーリングし、次元削減、クラスタリングを行った。

「RunPCA」機能を使用して主成分分析を行い、クラスタリングと UMAP は Seurat で「harmony」データタイプを次元削減タイプとして使用して実行した。

結　果

1. ICE マウス組織所見

PAS 染色およびマッソン染色では著明な差は認められなかった。

2. snRNA-seq によるフェノタイプの解析

ICE マウス腎臓の UMAP プロットを示す（図 1）。7,000 前後の核をシークエンスした。細胞のクラスタリングも明確に行えた。FR-PT : failure repair of proximal tubules : Ctrl で 0.45%、ICE で 0.97%、と増加しており軽微な DNA 損傷であっても影響が残存していることが確認された。

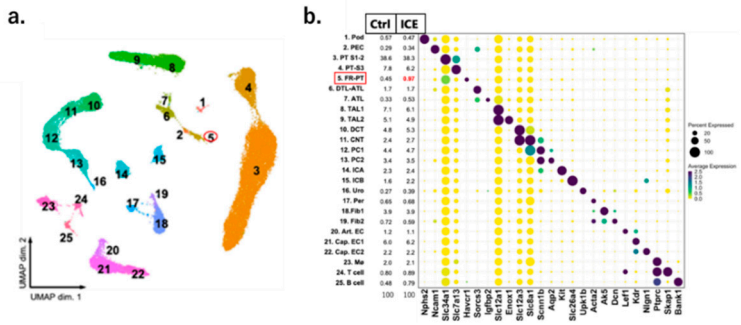


図 1. ICE マウス腎のシングルセル解析

a) Harmony で統合した ICE マウス腎臓の UMAP プロット。

b) クラスターに濃縮されたマーカーの遺伝子発現パターンを示すドットプロット。Pod : ポドサイト、PEC : ボウマン嚢壁側上皮細胞、 PT S1-S2 : 近位尿細管 S1-S2 セグメント、PT-S3 : 近位尿細管 S3 セグメント、ATL : ヘンレループの細い上行肢、Bil : 両側、CNT : 連結細管、CPC : 皮質の集合管の主細胞、CTAL : 皮質のヘンレループの太い上行肢、DCT : 遠位曲細管、DTL : ヘンレループの下行肢、EC : 内皮細胞、Fib : 線維芽細胞 ICA : 集合管のタイプ A 間質細胞、ICB : 集合管のタイプ B 間質細胞、Mø : マクロファージ、MPC : 髄質内集合管主細胞、MTAL : 髄質内ヘンレループ太い上行脚、Per : ペリサイト、Uro : 尿路上皮。

障害近位尿細管に発現する KIM-1（Kidney injury molecule 1）、不全修復の近位尿細管のマーカーである Vcam1（Vascular cell adhesion molecule 1）発現が ICE マウスで認められた。さらにゲノムの安定に重要であり、DNA 修復過程で増加する Mgmt（O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase）の発現の増加も ICE マウスの近位尿細管で増加しており、細胞老化のマーカーの p21 発現が増加した（図 2）。

さらに蛋白レベルでの VCAM1 の発現の評価を行った。ウエスタンブロットにて VCAM1 の蛋白レベルが上昇していることを確認し、さらに免疫染色にて VCAM1 陽性の近位尿細管（白三角印）の存在を確認した（図 3）。

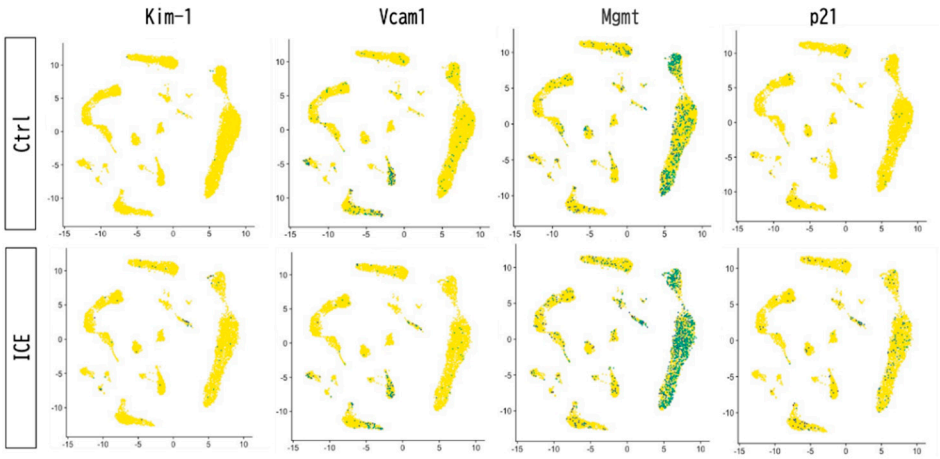


図 2. 尿細管不全修復、DNA 損傷および細胞老化関連遺伝子発現レベルの UMAP
Ctrl：コントロールマウス、ICE：ICE マウス。

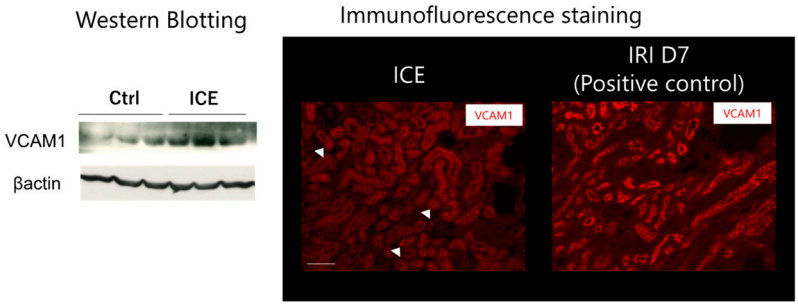


図 3. ICE マウス腎における VCAM1 の発現
whole kidney より抽出した蛋白を用いたウエスタンブロットおよびマウス凍結切片の免疫染色。Ctrl：コントロールマウス、ICE：ICE マウス、IRI D7：VCAM1 陽性のコントロール（スケールバー：100 μm）。

考　察

若齢における DNA 損傷応答機構によって修復される一過性の軽微な DNA の損傷の記憶は、腎構成細胞においては特に近位尿細管に残ることが示された。高齢者の急性腎障害に対する脆弱性の根底のメカニズムになっている可能性が示唆された。さらに、加齢によっても尿細管間質に尿細管の萎縮と間質の線維化（IF/TA）が生じるが、組織全体に占める割合（%IF/TA）ではなく、高い IF/TA 密度が進行性 CKD の予後不良を予測するということがヒト検体を用いた研究でわかっている［5］。本研究の結果は、軽微であっても生活習慣の差異によって生じる DNA 損傷があることが高い IF/TA 密度をもたらし、加齢による腎機能低下を加速する要因になりうると考えられた。本研究の結果を受けて、近位尿細管特異的 ICE マウスの作製と腎障害モデルにおける影響を評価するためのさらなる研究を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都府立大学大学院医学研究科腎臓内科学の桐田雄平、慶應義塾大学整形外科学教室の早野元詞である。本研究への研究助成金をいただいた公益財団法人上原記念生命科学財団にこの場を借りて深謝申し上げます。

文　献

1） Omori S, et al. Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16high Cells In Vivo. Cell Metab. 2020;32:814-828.e6. PMID: 32949498 DOI: 10.1016/j.cmet.2020.09.006

2） Kishi S, et al. Proximal tubule ATR regulates DNA repair to prevent maladaptive renal injury responses. J Clin Invest. 2019 ;129(11):4797-4816. PMID: 31589169 DOI: 10.1172/JCI122313

3） Canaud G, Brooks CR, Kishi S, et al. Cyclin G1 and TASCC regulate kidney epithelial cell G2-M arrest and fibrotic maladaptive repair. Sci Transl Med. 2019;11(476): PMID: 30674655 DOI: 10.1126/scitranslmed.aav4754

4） Yang JH, Hayano M, et al. Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. Cell. 2023;186(2):305-326.e27. PMID: 36638792 DOI: 10.1016/j.cell.2022.12.027

5） Ricaurte Archila L, et al. A Higher Foci Density of Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy Predicts Progressive CKD after a Radical Nephrectomy for Tumor. J Am Soc Nephrol. 2021 ;32(10):2623-2633. PMID: 34531177 DOI: 10.1681/ASN.2021020267