

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	丸山 啓介
<p>学位論文題目</p> <p>The antioxidant and DNA-repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 limits the development of tubulointerstitial fibrosis partly by modulating the immune system</p> <p>(抗酸化ストレス酵素であるAPE1は免疫機能を調整し、腎間質線維化の進展を制限する)</p> <p>共著者名</p> <p>中川 直樹、青沼 達也、齊藤 幸裕、早坂 太希 鹿野 耕平、堀内 至、竹原 有史、川辺 淳一、長谷部 直幸</p> <p>掲載雑誌名</p> <p><i>Scientific Reports</i> 誌</p> <p>平成31年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>近年糖尿病、高血圧症に伴う慢性腎臓病患者数が増加している。慢性腎臓病は末期腎不全に至る危険率が高いのみならず、心血管疾患の独立した危険因子である⁽¹⁾。しかし、レニン・アンジオテンシン系抑制薬などの既存の治療法は腎不全の進展抑制には一定の効果を認めるが、決して十分とは言えない。したがって、慢性腎臓病および腎不全の病態生理の解明、さらに新しい治療法の開発が重要な課題となっている。</p> <p>Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) はDNA修復やレドックス機構を介して、抗酸化ストレス作用を持つ多機能酵素である⁽²⁾。動脈硬化病変や神経変性疾患などの酸化ストレス環境下においてAPE1活性が上昇することが知られている。我々は心筋前駆細胞において、APE1が酸化ストレス条件下で細胞死を抑制することを証明した⁽³⁾。さらにAPE1を強制発現させた心筋前駆細胞を用いて、心筋梗塞モデルマウスに対して細胞療法を行ったところ、心機能が改善することを証明した。</p> <p>腎不全の進展には、低酸素や酸化ストレスの亢進が大きく関わっており、抗酸化ストレス作用を持つAPE1は腎保護的に作用する可能性がある。そこで本研究では腎不全病態モデルにおけるAPE1の役割およびその作用機構の解明を目指した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. プラスミドベクターの作成

pCAGベクターを用いてマウスAPE1発現プラスミド (pCAG-APE1) ならびにコントロールとしてEGFP発現プラスミド (pCAG-EGFP) を作成した。またpCAG-APE1にはHAタグ配列を加えた。プラスミドの機能解析としてはハムスター由来の腎線維芽細胞であるBHK-21細胞にトランスフェクションを行い、蛍光免疫染色を用いてAPE1ならびにEGFPの蛋白発現を解析した。

2. 腎不全モデルマウスの作成ならびにプラスミドベクターの経静脈投与

動物は10-12週齢のICRマウスを用いた。麻酔下に、マウス左側背部を小切開し、左側尿管一側を結紮した。片側尿管結紮後に腎動静脈をクランプし、左腎静脈より逆行性にpCAG-APE1もしくはpCAG-EGFPを投与した。術後4日目の腎臓を摘出し、蛍光免疫染色を用いてAPE1ならびにEGFPの発現を解析した。また術後7日目に腎臓を摘出し、下記の各種解析に用いた。

3. 腎間質線維化の評価

腎組織標本のSirius red染色により、組織学的な線維化の解析を行った。

4. 免疫組織染色

マクロファージあるいは筋線維芽細胞のマーカー (各々F4/80と α SMA) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、これら細胞の腎間質における浸潤や増殖を解析した。また腎組織内での酸化ストレスを評価するために、DNA損傷のマーカーである8-OHdGに対する蛍光免疫染色を行い、酸化ストレスの定量を行った。

5. RT-PCR

摘出したマウス腎臓からRNAを抽出し、逆転写によってcDNAを合成した。APE1のほか、線維化関連 (Acta2、Colla1、Fn1)、炎症性サイトカイン関連 (Il1b、Il6、Il10)、アポトーシス関連 (Casp3) のmRNA発現をreal-time PCR法で解析した。

6. RNAシーケンス

摘出したマウス腎臓から抽出したRNAを用いてRNAシーケンスを行い、遺伝子発現を網羅的に解析した。パスウェイ解析としてGene ontology (GO) 解析を行った。

成 績

1. BHK-21細胞にpCAG-APE1をトランスフェクションしたところ、マウスAPE1の発現を認めた。マウスAPE1の発現はHAの発現と合致しており、マウスAPE1遺伝子のクローニングを確認した。同様にpCAG-EGFPをトランスフェクションし、EGFPの発現を確認した。

2. 術後4日目の腎臓を蛍光免疫染色で解析したところ、pCAG-APE1を静注したマウス（APE1マウス）ではHAと合致するAPE1の発現を認め、pCAG-EGFPを静注したマウス（EGFPマウス）ではEGFPの発現を認めた。プラスミドベクターはびまん性に尿細管間質の線維芽細胞を中心に導入されていることを確認した。また尿管結紮後に結紮腎におけるAPE1 mRNAの発現が、経時的に増強していた。

3. EGFPマウス結紮腎では、マクロファージの浸潤と筋線維芽細胞の増殖を伴った間質線維化が認められた。一方でAPE1マウスではこれらの現象を有意に抑制した。

4. EGFPマウスでは線維化関連（Acta2、Colla1、Fn1）、炎症性サイトカイン関連（I11b、I16、I110）、アポトーシス関連（Casp3）のmRNA発現が亢進していた。一方、APE1マウスでは線維化関連因子のmRNAの発現はEGFPマウスに比し低値の傾向を示し、炎症性サイトカインであるI11b、I16、I110ならびにアポトーシスの実行に関わるエフェクター・カスパーゼであるCasp3の発現を有意に抑制した。

5. RNAシーケンスで網羅的に遺伝子発現を解析したところ、EGFPマウス結紮腎と比べ、APE1マウス結紮腎では、854個の遺伝子の発現が有意に増強し、773個の遺伝子の発現が有意に低下した。主成分分析ならびにヒートマップで解析したところ、EGFPマウス結紮腎と比べ、APE1マウスの結紮腎における遺伝子発現が偽手術腎に近似する方向に変化し、腎障害が軽減されていることが明らかとなった。

6. RNAシーケンスで得られたデータに基づきGO解析を行った。GO解析において、EGFPマウスでは免疫応答に関わるI16、Tnfなどの炎症性サイトカインやCc15などのケモカインの発現が増強し、またNos2やPtsg2などの酵素、Casp7などのカスパーゼに加え、Jak2やJak3などのチロシンキナーゼの発現が増強した。一方でAPE1マウスではこれらの現象を有意に抑制した。

考 案

我々は本研究において、腎障害モデルの1つである片側尿管結紮モデルを用いAPE1プラスミドを腎臓に過剰発現させることで、APE1が腎間質線維化を抑制することを世界で初めて明らかにした。まず結紮腎においてAPE1 mRNAの発現が経時的に増強していることから、腎間質線維化の進展過程においてAPE1が誘導されることが考えられた。APE1の抗線維化作用の機序として、EGFPマウス結紮腎と比べ、APE1マウス結紮腎では酸化ストレスの指標である8-OHdGの発現が抑制され、酸化ストレスによって誘導されるアポトーシスの指標であるCasp3、Casp7の発現が抑制されていたことから、APE1の機能である抗酸化ストレス作用、抗アポトーシス作用が腎保護的に作用したと考えられた。

またAPE1が腎保護的に作用した他の機序としては、抗炎症作用が考えられる。EGFPマウス結紮腎と比べ、APE1マウス結紮腎では、間質へのマクロファージ浸潤が抑制され、I11bやI16などの炎症性サイトカインに加え、Cc15などのケモカインのmRNAの発現が抑制

されていた。APE1はマクロファージでのNO合成を抑制することが知られている。本研究でもRNAシーケンスにおいて、APE1マウス結紮腎ではNos2 (iNOS) を含めた免疫反応が抑制されており、これらの作用もAPE1の腎保護的な作用に寄与することが示唆された。

APE1が導入された線維芽細胞は毛細血管周囲に存在する血管周細胞であると考えられている。血管周細胞は腎障害における炎症や線維化に関わっており、細胞レベルでのAPE1の機能解析が今後の課題である。

結 論

本研究は抗酸化ストレス酵素APE1の尿管結紮モデルでの腎間質線維化における役割とその作用機構を解明した。APE1は酸化ストレスの軽減のみならず、免疫機能を調整することで腎保護的に作用することを明らかにした。これらの結果より、APE1の慢性腎臓病に対する新しい治療法としての可能性が強く示唆された。

引 用 文 献

1. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, et al. Chronic kidney disease. Nat Rev Dis Primers. 2017; 3:17088.
2. Thakur S, Sarkar B, Cholia RP, et al. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. Exp Mol Med. 2014; 46:e106.
3. Aonuma T, Takehara N, Maruyama K, et al. Apoptosis-Resistant Cardiac Progenitor Cells Modified With Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor 1 Gene Overexpression Regulate Cardiac Repair After Myocardial Infarction. Stem Cells Transl Med. 2016; 5(8):1067-78.

参 考 論 文

1. Maruyama K, Chinda J, Kabara M, et al. Successful percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of renovascular hypertension with an atrophic kidney. Heart Vessels. 2015; 30(2):274-9.
2. Maruyama K, Nakagawa N, Saito E, et al. Malnutrition, renal dysfunction and left ventricular hypertrophy synergistically increase the long-term incidence of cardiovascular events. Hypertens Res. 2016; 39(9):633-9.
3. Maruyama K, Nakagawa N, Kabara M, et al. Hemocholecyst complicated in a hemodialysis patient with microscopic polyangiitis. Mod Rheumatol. 2017; 27(4):708-711.