

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450118

研究課題名(和文) ストレス誘発型腎臓培養装置の開発および腎障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of stress-derived kidney culture system and analysis of kidney damage thereof

研究代表者

王 碧昭 (WANG, Pichao)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80261775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：ストレスから派生した疾患の中で、多くの腎疾患が注目されているが、腎臓のストレスバイオマーカーが少ないため、発症メカニズムの解明が困難である。本研究は脳と腎臓両方に発現するaddicsinに着目し、addicsinは腎臓のストレスマーカーとして使用可能であることを明らかにした。また、in vitro培養条件の低温、弱酸と低酸素条件でストレス誘発型培養系を構築した。さらにストレス条件下において、濾過機能を司る糸球体基底膜及び再吸収を司る尿細管に存在する細胞外マトリクスと炎症因子の変化を引き起こし、ストレスが腎組織に炎症を引き起こし、組織ECMの変異を運動し、障害をもたらすことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Although kidney disease has been noticed among the diseases derived from mental stress, it is still difficult to clarify the direct relationship between nephritis disease and stress due to lacking of biomarker. In this study, addicsin, a protein expressing in both brain and kidney was proved to be useful as a stress biomarker for kidney. Moreover, a culture system under the conditions with low temperature, weak acidic pH and low oxygen concentration was successfully established to induce nephritic stress in vitro. In addition, this study demonstrated that ECM (extracellular matrix) change occurred to renal glomerular basement membrane and tubules after stress induction, and the ECM change was related to inflammation appeared on kidney tissue under stress.

研究分野：農学

キーワード：ストレス誘発 腎障害 addicsin in vitro培養系 腎糸球体 基底膜 細胞外マトリクス 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

ストレスから派生した疾患は深刻な社会問題として注目されている。特に最近、多くの腎疾患がストレスに誘発されると報告された。しかし、脳と腎臓の共通マーカーが少ないため、発症メカニズムは未だに解明されず、根本的な治療法はまだ確立されていない。ストレス誘発型腎疾患において、どんな種類のストレスが腎臓に影響を及ぼすか、ストレスに応答する腎障害はどんなパターンであるか、また、どんな経路によって腎障害が引き起こされるか、の三つの問題点があげられる。これらの問題点を踏まえ、本研究は脳と腎臓両方に発現する addicsin タンパク質に着目した。Addicsin は痴呆、癲癇などの病態に関与するため注目されている。このタンパク質はモルヒネ耐性依存状態の脳内扁桃体で特異的に増幅し、神経型グルタミン酸トランスポーター (glutamate transporter:EAAC1) に結合し、細胞内へのグルタミン酸の取り込みを阻害する。その結果、脳内シナプスでのグルタミン酸濃度が低下し、神経細胞障害や細胞死が引き起こされる。一方、腎臓の近位尿細管と遠位尿細管にそれぞれの EAAC1 が存在し、前者は Na<sup>+</sup>-グルコースのトランスポーターであり、後者は代謝性アシドーシスを司る。これら EAAC1 の異常は尿細管再吸収不全、尿毒症を引き起こす。また、addicsin は中枢のみでなく、腎臓をはじめとした末梢器官で存在することが報告され、EECA1 と関連し、神経性腎疾患を誘起すると予想される。しかしながら、腎臓における addicsin の詳細な局在、機能、特に作用メカニズムはまだ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究はストレスを受けたマウス腎臓と addicsin、EAAC1 の関係を調べ、addicsin の不安マーカーとしての有効性を解析するとともに、ストレス誘発型腎障害の条件を究

明し、ストレス誘発型腎臓培養系を開発した。さらに、急性ストレスを受けた腎臓の形態変化、組織変異、ECM の変遷を組織科学、生化学的に検討することで、ストレスを原因とした腎障害を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究の具体的な実験は下記のステップを踏まえて行った。

(1) ストレス小動物の腎障害検証

(2) ストレス誘発型腎に対する障害条件の解明

(3) ストレス誘発条件を用いた、腎臓 ECM 変遷及び回復可能性の検討

(1) ストレス小動物の腎障害において、CR1 マウスにストレス惹起剤 PTZ(pentylentetrazole) を高濃度 30mg/Kg で 1, 2, 6 時間に注射した後、高架式十字迷路に移し、マウスの一定時間内での移動距離、範囲と十字路先端に停留する頻度を測定、脳内ストレスの有無を判定し、同時に腎障害症状の一つ 尿蛋白の有無を判定した後、解剖したマウスの腎臓の重さ、色を計測した。また、腎臓の凍結切片を製作し、組織染色 (PAS, Masson 染色)、蛍光染色及び生化学的ウェスタンブロット法により脳と腎臓の共通マーカーである addicsin の発現、局在の同定を行いながら、addicsin のストレスマーカーの有効性を解析した。なお、生理食塩水注射マウスをコントロールとして使用する。

(2) ストレス誘発型腎に対する障害条件の解明

灌流式培養装置を用い、拍動流、温度、酸素分圧、pH 等の物理条件を変動しながら、腎臓を培養したうえ、腎臓の凍結切片を製作し、組織染色 (HE、PAS、Masson 染色)、蛍光染色及び生化学的ウェスタンブロット

により、腎組織にもたらした障害を観測し、上記(1) addicsin が同定できるまでの協同条件を見出した。この条件によりストレス誘発型培養系を樹立した。

(3) ストレス誘発条件を用いた、腎臓 ECM 変遷及び回復可能性の検討

(2)の培養系を利用して、動物代替可能な生体模倣系を展開し、物理的なストレス条件下で障害された腎臓、特に腎線維症に関わる細胞外マトリクス及び炎症因子の増減遷移を調べ、これら細胞外マトリクス変動、炎症抑制及び物理条件の回復によりストレス誘発型の腎障害に回復する可能性を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) の結果において、コントロールマウス群に比べ、30mg/Kg のストレス惹起剤 PTZ 投与群は高架式十字迷路のオープンアームでの滞在時間が短く、移動距離の割合も有意に低下し(図1) 光学顕微鏡で病理的鑑別の結果では腎臓の萎縮と鬱血変化を起こしたため、今後の実験は PTZ30mg/Kg 投与量のストレスモデルを用いた。addicsin の実効性を検証したところ、addicsin が腎臓皮質の尿管及び糸球体外周のボウマン嚢に局在し(図2) ウェスタンブロットにより、PTZ のストレス誘導後、addicsin は皮質に顕著な増加が観察された(図3)。addicsin は非ストレス条件下では EAAC1 と共局在しないが、ストレス条件下では EAAC1 との共局在(図4)が観察され、EAAC1 異常時に類似する現象 尿管周辺の ECM の欠損が現れ、addicsin による腎臓のストレス実効性が証明された。さらに、腎臓組織障害において、間質系に血球の流出が観察され、糸球体基底膜の肥厚、尿管腔狭窄も観察され、ECM による間質の繊維化変遷も観察された。

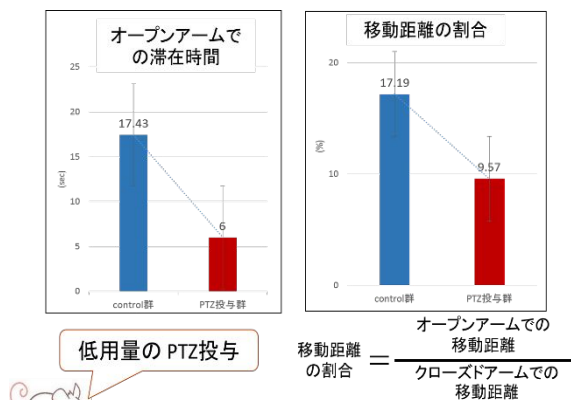


図1 左：高架十字迷路解放空間での滞在時間  
右：高架十字迷路解放空間での移動距離割合



図2 腎臓における EAAC1 と addicsin の局在

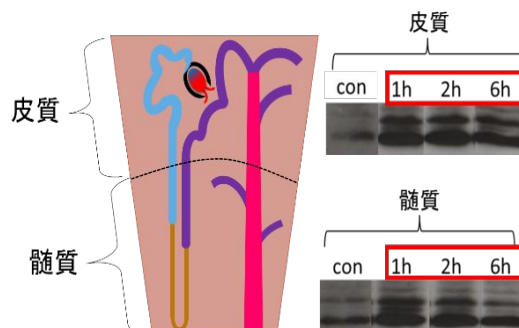


図3 ストレスにおける腎臓の addicsin の発現量変化

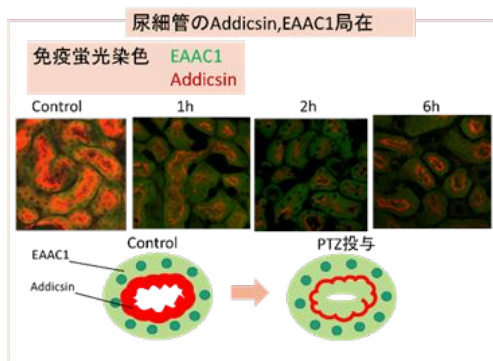


図4 ストレス腎における EAAC1 及び addicisin の発現と局在変化

(2) の結果において、温度、酸素分圧、pH 等の物理条件を *in vitro* 灌流系で制御することで、ストレス誘発が可能であることが解明した。それぞれの物理条件をトライアンドエラーの方法で組み合わせた結果、弱酸 pH 6.0 ~ 6.5, 低温 32 ~ 34 °C、低酸素 10 ~ 15% の協同条件下で、上記 (1) で観察された腎臓組織障害の萎縮、糸球体基底膜肥厚、尿細管内腔狭窄及び間質系の ECM 変遷も出現した。PAS 染色の結果、腎尿管壁内腔に局在する多糖類は物理因子誘発ストレスを受けた後、細胞内ないし尿管外表面に移動、増強した (図 5)。面白いことに、DAB 染色の結果において addicisin も同様な局在変化を観察された (図 6)。これは (1) の不安惹起剤 PTZ 投与と類似する応答現象が起こったため、この協同条件が生体外ストレス誘発条件として使用可能であることが示唆された。

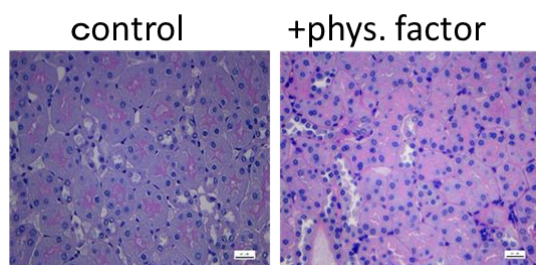


図5 物理条件誘発型ストレス腎臓における多糖類の変遷

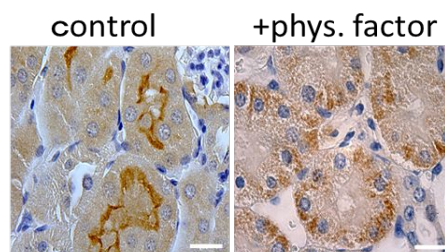


図6 物理条件誘発型ストレスにおける addicisin の遷移

(3) の結果において、ストレス誘発培養系とストレスマウスモデルを比較したところ、再吸収を司る尿細管に存在する細胞外マトリクスである I 型、IV 型、コラーゲンはストレスを受けた短期間内では大きな発現変化がないものの、創傷治癒に関与する V 型コラーゲンは addicisin と共に素早く発現変化を呈した。また、ストレス誘発条件から正常条件に戻すと、V 型コラーゲンが組織の回復と共に消失する (図 7) ことから、V 型コラーゲンは腎組織の治癒に関与することが示唆された。

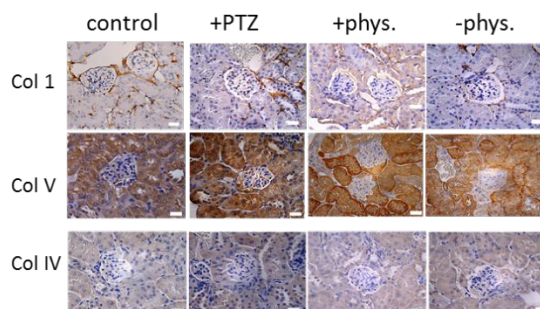


図7 PTZ 及び物理誘発ストレスにおける ECM (コラーゲン I, V, IV 型) の変化

以上 (1), (2), (3) の結果をまとめると、脳と腎臓両方に発現する addicisin タンパク質は腎臓のストレスマーカーとして使用可能である結果を得た。また、ストレスが腎臓血管の鬱血、糸球体基底膜の肥厚、間質であるメサンギウム基質増加など腎障害をもたらす現象が現れた。*In vitro* 培養系を用い、生

体内と同様な addiscin 変化及び腎組織変化に基づき、物理条件の温度、酸素および pH 条件を制御しながら、生体内とほぼ同様な addiscin 変化に達した。見出した物理条件下で培養した腎組織は生体内ストレスとほぼ同様な応答が現れ、物理条件からストレス誘発系の構築が可能であることを示唆した。また、ストレスが腎組織に変化を与える際、損傷治癒に関わる細胞外マトリクス（V 型コラーゲン）は addiscin と共に素早く発現変化し、また物理条件の撤回に連れ組織が回復する際、V 型コラーゲンの発現が消失することから、V 型コラーゲンは腎組織の治癒に有用であると考えられる。

## 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 7 件）

横田奈々、村澤裕介、王碧昭、腎不安系回復における addiscin と細胞外マトリクスの変化解析、第 82 回日本化学工学会年会、2017 年 3 月 6 日～2017 年 3 月 8 日、芝浦工業大学（東京都・江東区）

横田奈々、王碧昭、腎不安系における addiscin と V 型コラーゲンの同調発現、平成 28 年度化学工学会つくば化学技術懇話会、2017 年 2 月 23 日～2017 年 2 月 23 日、筑波大学（茨城県・つくば市）  
横田奈々、村澤裕介、王碧昭、ストレスによる腎尿細管細胞外マトリクスの変遷解析、第 68 回日本生物工学会、2016 年 9 月 28～2016 年 9 月 30 日、富山国際会議場（富山県・富山市）

横田奈々、村澤裕介、王碧昭、ストレスモデルにおける腎臓 addiscin および ECM 変化の解析、第 48 回日本結合組織学会、2016 年 6 月 24～2016 年 6 月 25 日、長崎大学（長崎県・長崎市）

横田奈々、王碧昭、不安培養系における

腎臓の addiscin 変遷および腎障害の解析、平成 27 年度化学工学会つくば化学技術懇話会、2016 年 3 月 2 日～2016 年 3 月 2 日、筑波大学（茨城県・つくば市）  
横田奈々、王碧昭、ストレスマウスモデルにおける腎障害と ECM 変化の検証、第 11 回結合組織研究会、2015 年 7 月 4 日～2015 年 7 月 5 日、酪農学園大学（北海道・江別市）

横田奈々、王碧昭、不安培養系における腎臓の addiscin の発現と分布、平成 26 年度化学工学会つくば化学技術懇話会 2015 年 3 月 3 日～2015 年 3 月 3 日、筑波大学（茨城県・つくば市）

〔図書〕（計 1 件）

王碧昭 他多数（総数 100 名）、動物細胞培養技術における分離・精製手法と自動化技術、技術情報協会 2017 年、（pp266-269）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

王 碧昭 (WANG, PiChao)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80261775