

新規シグナル伝達を標的とした慢性腎臓病の治療薬開発

Weill Cornell Medicine

宇仁 理恵

背景及び目的

慢性腎臓病(CKD)とは何らかの腎機能低下が3ヶ月以上継続する病態を指し、CKDの原因疾患は多岐に渡るが、いずれも組織学的には糸球体硬化、尿細管萎縮と間質線維化といった共通のメカニズムを呈する。中でも間質線維化はCKDにおける腎組織障害に対する損傷応答として普遍的に認められる組織変化であり、CKDの程度・機能予後と有意に相関することが知られており、間質線維化の進行を抑止することはCKD治療における最重要事項と言っても過言ではない。臓器の線維化においては上皮間葉移行(epithelial mesenchymal transition: EMT)と呼ばれる現象が認められる。EMTとは組織の構造と機能を維持するのに重要な上皮細胞がその極性を失いコラーゲン産生といった間葉系細胞の特性を帯びることを指す。内皮間葉移行(endothelial mesenchymal transition: EndMT)はEMTのサブタイプの一つであり、内皮細胞がその内皮としての特性を失い間葉系の性質を獲得する。具体的には内皮細胞マーカーであるCD31の発現が低下し、 α -SMAなどの間葉系マーカーの発現が増加する。EMTと比較してEndMTのメカニズムは完全には解明されていないが、両者は同様の分子学的機構を共有していると推察される。EndMTは特に腎疾患において高頻度に認められ¹、EndMTが腎臓の線維化進行に寄与していることも報告されている²。そのためEndMTを抑制し線維化進行を抑制することはCKD治療の良い標的であると考えた。本研究ではCKDにおける腎線維化の分子学的機序に焦点を当てて、その新規治療標的を明らかにすることを目指す。

申請者の留学先研究室は腎線維化の原因として、制御されたネクローシスとして近年注目されているネクロトーシスに着目し研究を行ってきた。ネクロトーシス経路においてはRIPK3というセリンスレオニンキナーゼが重要な役割を果たしている。申請者の留学先の研究室はCKD患者の腎臓では健常人の腎臓と比較してRIPK3の発現が亢進しており、その発現レベルが腎臓の線維化と相関していることを見出した³。それに加えて、AKIモデルでは尿細管上皮細胞でRIPK3がミトコンドリアのNOX4の発現を亢進させ尿細管障害を引き起こしていることを報告した⁴。従って、RIPK3は様々な細胞で多様な作用を発揮している。腎臓領域において内皮細胞とネクロトーシス経路やRIPK3の関連を検証した報告は過去にないが、線維芽細胞や尿細管上皮細胞だけでなく内皮細胞においてもRIPK3が炎症や線維化進行に関連していると仮説を立てた。

経過

留学先であるWeill Cornell Medicineが位置するニューヨークは新型コロナウイルス(SARS-CoV2)の感染が爆発的に広まった都市の一つであり、研究機関も一時閉鎖を余儀なくされた。その間維持していた遺伝子改変マウスの系統も一度閉じざるを得ず、留学開始後はまず血管内皮細胞特異的RIPK3ノックアウトマウスの系統を樹立することから開始した。急性及び慢性腎不全モデルを用いてこれらの遺伝子改変マウスの腎障害の程度を評価した。急性腎不全モデルではマウスにcecal ligation puncture (CLP)を施し24時間

後の腎機能、病理所見、尿細管障害マーカーの発現レベルを **real time PCR** を用いて評価した。慢性腎不全モデルでは代表的な腎の線維化モデルである片側尿路閉塞 (UO) を施し 7 日後の腎臓からフローサイトメトリーを用いて血管内皮細胞マーカーである CD 31 が陽性の細胞分画を評価した。

急性腎不全モデルではいずれの指標も 2 群間で有意差を認めなかった。慢性腎不全モデルでは内皮細胞特異的 RIPK3 ノックアウトマウス群と比較し野生型マウス群で CD 31 陽性細胞数が多い傾向が見られ、内皮細胞の RIPK3 の EndMT への関与を示唆する結果であった。

今後の研究計画及び考察

これらの実験では用いた動物数が少なく現時点で統計学的な有意差は認めていない。引き続き動物数を増し同様の実験を継続していく。RIPK3 に対しては選択的阻害剤も開発されており、腎障害におけるその詳細な分子機構を明らかにすることは CKD の新規治療法開発にも繋がると考えられる。

上記の研究に加え、COVID-19 関連のマルチオミクス研究にも従事しており、これに関しては現在論文を執筆中である。

参考文献

1. Lovisa S, Fletcher-Sananikone E, Sugimoto H, Hensel J, Lahiri S, Hertig A, Taduri G, Lawson E, Dewar R, Revuelta I, Kato N, Wu CJ, Bassett RL, Putluri N, Zeisberg M, Zeisberg EM, LeBleu VS, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition compromises vascular integrity to induce Myc-mediated metabolic reprogramming in kidney fibrosis. *Sci Signal.* 2020;13(635). Epub 2020/06/09. doi: 10.1126/scisignal.aaz2597. PubMed PMID: 32518142; PMCID: PMC7790440.
2. Xavier S, Vasko R, Matsumoto K, Zullo JA, Chen R, Maizel J, Chander PN, Goligorsky MS. Curtailing endothelial TGF- β signaling is sufficient to reduce endothelial-mesenchymal transition and fibrosis in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(4):817-29. Epub 2014/12/22. doi: 10.1681/ASN.2013101137. PubMed PMID: 25535303; PMCID: PMC4378095.
3. Imamura M, Moon JS, Chung KP, Nakahira K, Muthukumar T, Shingarev R, Ryter SW, Choi AM, Choi ME. RIPK3 promotes kidney fibrosis via AKT-dependent ATP citrate lyase. *JCI Insight.* 2018;3(3). Epub 2018/02/08. doi: 10.1172/jci.insight.94979. PubMed PMID: 29415885; PMCID: PMC5821177.
4. Sureshababu A, Patino E, Ma KC, Laursen K, Finkelsztejn EJ, Akchurin O, Muthukumar T, Ryter SW, Gudas L, Choi AMK, Choi ME. RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction. *JCI Insight.* 2018;3(11). Epub 2018/06/08. doi: 10.1172/jci.insight.98411. PubMed PMID: 29875323; PMCID: PMC6124406.