

Title	転写因子OASISは慢性腎臓病の発症・進展を制御する
Author(s)	山本, 彩葉
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96131
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (山本 彩葉)

論文題名 転写因子OASISは慢性腎臓病の発症・進展を制御する

論文内容の要旨

慢性腎臓病（CKD）は世界人口の約10%が罹患しているとされる世界的な健康問題である。CKDが末期腎不全へと進行すると、人工透析等の腎代替療法により患者のQOLの著しい低下を招く。さらに、CKDは心血管疾患の強力な危険因子でもあることから、その予防や治療が喫緊の課題となっている。しかしながら、CKDの病態形成機構には未解明な点が多く、さらなる病態進展メカニズムの解明が必要である。本研究では、新規CKD治療法の確立を目指し、CKD病態の発症・進展機構の解明に取り組んだ。

第一章では、CKDから末期腎不全に至る最終共通経路である腎線維化に着目した。線維化は、臓器の機能不全の原因である。したがって、腎線維化の抑制はCKDの治療戦略となると考えられるものの、腎線維化のメカニズムには不明な点が多く、特異的な治療薬は存在しない。そこで、新たな腎線維化制御分子を探索し、転写因子OASIS (Astrocyte Specifically Induced Substance) に着目した。OASISは元来小胞体ストレスセンサー分子として見出された分子である。OASISの病態生理学的意義としては、骨形成や癌の進展に関与することが報告されている。しかしながら、腎臓におけるOASISの役割は明らかにされていない。そこで、腎線維化におけるOASISの役割を追究した。腎線維化モデルマウスの腎臓においてOASISの発現を評価したところ、筋線維芽細胞においてOASISが発現上昇することが明らかとなった。そこで、*in vitro*におけるOASISノックダウン系を確立し、筋線維芽細胞における機能評価を行った。その結果、OASISはTGF- β 1が媒介する筋線維芽細胞の遊走及び増殖に寄与することが明らかとなった。次に、OASISが腎線維化病態形成に及ぼす影響を評価すべく、全身性OASISノックアウト (OASIS KO) マウスに一側尿管結紮 (UUO) を施し腎線維化を誘導した。UUO7日後に腎線維化を評価した結果、野生型マウスと比較し、OASIS KOマウスでは腎線維化が抑制された。さらに、抗 α -SMA抗体及び抗Ki-67抗体を用いた蛍光免疫染色の結果、OASIS KOマウスの線維化腎では増殖筋線維芽細胞の数が減少した。OASIS KOマウスにおける腎線維化の抑制は、腎虚血再灌流障害による線維化モデルにおいても確認された。したがって、OASISが腎線維化病態形成に寄与することが示された。さらにそのメカニズムを解明すべく、マウス線維化腎より単離し、TGF- β 1処置を施した筋線維芽細胞を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、筋線維芽細胞におけるOASISの下流候補分子としてBone marrow stromal cell antigen 2 (Bst2) を見出した。さらに、クロマチン免疫沈降アッセイの結果、OASISがBst2のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。そこで、Bst2が腎線維化の進展に関与するの可否かを検討した。マウスにUUOを施し、翌日に抗Bst2抗体およびコントロール抗体を投与した。UUO7日後の線維化を評価したところ、抗Bst2抗体投与群では腎線維化が減弱した。また、OASIS KOマウスでは、抗Bst2抗体によるさらなる腎線維化抑制効果は見られなかった。したがって、Bst2が腎線維化に関与するOASISの下流分子であることが示された。続いて、筋線維芽細胞に発現するOASISの線維化への関与をより詳細に検討すべく、筋線維芽細胞特異的OASISノックアウトマウス (mf-OASIS cKOマウス) を作製した。Mf-OASIS cKOマウスにUUOを施し、線維化を評価した。その結果、mf-OASIS cKOマウスにおいても腎線維化が抑制された。したがって、筋線維芽細胞のOASISが腎線維化病態形成に寄与することが示された。さらに、OASISの治療標的としての可能性を評価すべく、OASISの薬理的阻害を試みた。OASISは、site 1 proteinase (S1P) 及びsite 2 proteinase (S2P) による切断活性化を受け、標的遺伝子の転写を調節する。ここでは、S1Pの阻害作用を持つ化合物4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) を用いた。腎線維芽細胞株NRK49F細胞にAEBSFを添加したところ、TGF- β 1によるOASISの活性化が抑制された。そこで、UUO2日前よりマウスにAEBSFを連日投与した結果、AEBSF投与群ではUUOによる腎線維化が抑制された。最後に、OASISとヒト腎線維化病態との関連を明らかにすべく、免疫染色によりヒト線維化腎におけるOASISの発現を評価した。その結果、線維化腎ではOASIS陽性細胞数が顕著に増加し、OASISがヒトの線維化病態にも関与する可能性が示された。以上の結果より、筋線維芽細胞におけるOASISシグナルが新たな腎線維化制御機構であることが示された。

第二章では、腎臓の加齢性変容メカニズムを追究した。加齢はCKDの危険因子の一つであり、腎臓では加齢に伴

い構造変化と機能低下が起こる。したがって加齢への対抗はCKD予防戦略となりうるが、そのメカニズムには未解明な部分が多い。ポドサイトは、糸球体での血液濾過における最終濾過障壁細胞であり、その障害は様々な腎疾患の発症、進展に関与する。我々も、ポドサイトにおけるOASISの発現上昇が腎障害を惹起させることを報告している。ポドサイト障害は加齢性腎障害にも関与することが知られており、また近年、老化ポドサイトでOASISが活性化していることを示唆する結果が報告された。そこで、ポドサイトにおけるOASISの役割を端緒とし腎臓の加齢性変容メカニズムの解明を目指した。まず、ポドサイト特異的OASISノックアウトマウス (pc-OASIS cKOマウス) を1.5年齢まで飼育した。1.5年齢pc-OASIS cKOマウス及びOASIS f1/f1マウスにおいて、腎機能の指標である血清クレアチニン及び腎障害の指標である尿中アルブミンクレアチニン比を測定した。その結果、1.5年齢pc-OASIS cKOマウスでは腎機能低下が有意に抑制され、腎障害も抑制傾向が見られた。そこで、1.5年齢pc-OASIS cKOマウス及びOASIS f1/f1マウスの腎切片を作製し、組織学的検討を行った。その結果、pc-OASIS cKOマウスでは、加齢による糸球体硬化及び糸球体肥大が抑制傾向にあった。また、ポドサイトマーカーWT-1に対する免疫染色の結果、pc-OASIS cKOマウスでは加齢によるポドサイト数減少が抑制されていた。以上の結果より、pc-OASIS cKOマウスにおいて加齢による腎障害が抑制されることが示唆された。また、ポドサイトのOASISが細胞老化に及ぼす影響を評価すべく、免疫染色により細胞老化マーカーp16INK4aの発現を評価した。その結果、pc-OASIS cKOマウスにおいて糸球体内のp16INK4a発現細胞が有意に減少した。さらに、ポドサイトのOASISによる加齢性腎障害抑制メカニズムを探索すべく、1.5年齢pc-OASIS cKOマウス及びf1/f1マウスの腎組織を用いてRNAシーケンス解析を行った。その結果、pc-OASIS cKOマウスの腎臓では脂質代謝に関連する遺伝子が大きく発現変動することが明らかとなった。そこで、以前実施したOASIS過剰発現培養ポドサイトを用いたDNAマイクロアレイの結果と組み合わせることで、ポドサイトのOASISにより制御される加齢性変容関連分子を抽出した。11の候補遺伝子のうち、脂質代謝に関わることが報告されている遺伝子の1つである、*Epdrl1*に着目した。公開データベースを利用した解析の結果、老化マウス由来ポドサイトにおいて*Epdrl1*の遺伝子発現が有意に低下することが明らかとなった。さらに、8週齢及び1.5年齢野生型マウスの腎切片に対し、EPDR1及びポドサイトマーカーNephrinに対する蛍光免疫染色を行った結果、1.5年齢マウスのポドサイトではEPDR1のタンパク発現が減少していた。Pc-OASIS cKOマウスにおいて脂質代謝関連遺伝子の発現減少が見られたことから、腎組織内の脂質メディエーターに着目した。1.5年齢pc-cKOマウスの腎臓における脂質メディエータープロファイルを取得すべくリポミクス解析を行った結果、pc-OASIS cKOマウスでは、種類や機能によらず多くの脂質メディエーターが増加することが明らかとなった。一方、1.5年齢pc-OASIS cKOマウスとOASIS f1/f1マウスにおいて組織中ATP量には差がなかった。また、脂質の代謝異常により組織中に脂質が蓄積することから、1.5年齢pc-OASIS cKOマウス及びOASIS f1/f1マウスの腎臓を用いてOil Red O染色を行った。その結果、pc-OASIS cKOマウスの糸球体では脂質蓄積が抑制された。以上の結果より、加齢性腎障害に繋がる腎変容には組織内脂質代謝パスウェイが重要であり、その制御にポドサイトのOASISシグナルが関与する可能性が示された。

本研究結果により、腎構成細胞に発現する転写因子OASISが新たなCKD治療標的として有用である可能性が示された。本研究が、さらなる腎病態進展メカニズムの解明及び新規CKD治療法確立の一助となることを期待する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山本 彩葉)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 藤尾 慈 副 査 教授 辻川 和丈 副 査 教授 齊藤 達哉
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>慢性腎臓病は、極めて有病率が高い疾患であり、進行すると人工透析に至り患者のQOLを悪化させるだけでなく、動脈硬化性疾患の危険因子の一つとなるため、その治療法の開発は喫緊の課題である。しかしながら、現在、慢性腎臓病の病態進展メカニズムは十分には解明されておらず、著明な効果を示す治療法はない。本論文は、慢性腎臓病の新規治療法の確立を目指し、慢性腎臓病の発症・進展の分子メカニズムを解明しようとするもので、従って医学的にも社会的にも重要な論文といえる。</p> <p>本論文では、一貫して転写因子OASISに着目して慢性腎臓病の研究を進め、多様な機能を明らかにしている、まず、論文の前半では、腎臓の線維化が慢性腎臓病の原因の一つであることから、腎線維化をテーマとし、筋線維芽細胞におけるOASISの機能を検討している。その結果、OASISは、筋線維芽細胞において、TGF-βにより誘導され、筋線維芽細胞の増殖・遊走を促進することを見出した。非常に重要なことに、筋線維芽細胞特異的<i>OASIS</i>遺伝子欠損マウスにおいては、腎臓の線維化が抑制されることを確認し、OASISの腎線維化治療標的としての有用性を示した。さらに、具体的な創薬戦略として、OASIS分子の活性化を担うタンパク分解酵素の阻害剤が腎線維化を抑制することを証明し、動物レベルで、OASISを標的とした腎線維化抑制治療のproof of conceptを確立したものと考えられ、特筆に値する。</p> <p>論文の後半においては、加齢が慢性腎臓病の重大な危険因子の一つであることから、加齢性腎障害をテーマとし、老化ポドサイトにおけるOASISの機能を追究している。具体的には、老化ポドサイトにおいて発現する遺伝子の網羅的解析が発表され、そのデータを独自に解析することで、OASISが発現増強していることを見出し研究をスタートしている。論文では、ポドサイト特異的な<i>OASIS</i>遺伝子欠損マウスを作製し、1.5年間飼育することにより、ポドサイトの老化に対するOASISの意義を検討している。その結果、老化に伴う腎機能の低下に対して<i>OASIS</i>遺伝子欠損が保護的に作用すること、<i>OASIS</i>遺伝子欠損マウスでは老化マーカー陽性細胞数が減少することが示されている。非常に興味深いことに、そのメカニズムとして、ポドサイトにおける脂質代謝の変化が重要であり、OASISがその代謝制御を担っている可能性を提案している。</p> <p>本論文は、慢性腎臓病に関わる分子としてOASISを同定し、その重要性を示したものであり、腎臓におけるOASISの機能を世界で最初に明らかにした主論文を基に記載されたものである。また、OASISが、発現する細胞によって多様な機能を示し、慢性腎臓病が示す多彩な病態を形成する上で重要な役割を担っていることを示しており、慢性腎臓病の発症機構に新たな概念を提案するものである。さらに、本学位論文に記載された研究成果は、OASISの治療標的としての妥当性を強く支持する。以上より、本論文は、分子医学の観点からも創薬科学の観点からも極めて価値が高い論文であり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。</p>	