

# 腎線維化に対する神経堤由来線維芽細胞における NF- $\kappa$ B の役割

吉田 理

慶應義塾大学医学部血液浄化・透析センター

key words : 線維化, 末期腎不全, 水腎症, NF- $\kappa$ B

## 要 旨

腎線維化は、末期腎不全をもたらす慢性腎疾患の final common pathway として注目を集めている。近年の研究では、腎線維化は腎臓間質に存在する神経堤由来の線維芽細胞が、筋線維芽細胞に形質変換することでもたらされるというメカニズムが提唱されている。本研究では、その神経堤由来の線維芽細胞において、炎症を惹起する NF- $\kappa$ B 経路を選択的に抑制した場合、腎線維化がどのような影響を受けるかについて検討を行った。神経堤細胞特異的 NF- $\kappa$ B 抑制マウスを作製し、この遺伝子改変マウスに一侧尿管結紮水腎症モデルを使って腎障害を引き起こした。水腎症誘発後 14 日目の腎臓では、神経堤細胞特異的 NF- $\kappa$ B 抑制マウスにおける腎線維化は、コントロールマウスと比較して減弱していた。今後、線維芽細胞における NF- $\kappa$ B と線維化形成に関するメカニズムの解明を進めることで、新たな治療戦略を確立したい。

## 1 目 的

我が国において、慢性腎臓病は成人人口の約 13% が罹患するといわれている。病期が進行して末期腎不全に至れば、血液透析といった腎代替療法が必要となるため、その進行抑制を目的とした治療介入が重要である。

慢性腎臓病が末期腎不全に至る進行過程において、腎線維化、さらにそれに伴う腎性貧血は、慢性腎疾患

の final common pathway として注目を集めている。腎線維化には、SM  $\alpha$ -actin 陽性の筋線維芽細胞 (myofibroblasts) の出現が重要な役割を果たしているが、近年の研究においては、神経堤に由来する線維芽細胞 (fibroblasts) が筋線維芽細胞に形質変換することで、腎線維化に関与するというメカニズムが報告されている<sup>1)</sup>。すなわち、腎臓間質に存在する線維芽細胞の多くは神経堤に由来しており、神経堤と末梢神経のミエリンに発現する Protein 0 (P0) 遺伝子を利用することで標識が可能であるが、P0 遺伝子で標識された線維芽細胞が腎線維化の過程で筋線維芽細胞に変換されて、病変の進行に寄与することが判明している。さらに、その P0 遺伝子で標識される線維芽細胞はエリスロポエチン発現細胞であり、筋線維芽細胞への形質変換とともにエリスロポエチンの発現が減弱し、腎性貧血に至ることが報告されている。

一方、慢性腎臓病では tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) や interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) といったサイトカインが高値を示し、腎臓を含めた全身における慢性炎症の状態にある。それらサイトカインは nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 経路を活性化することが知られているが、腎臓間質においてエリスロポエチンを産生する神経堤由来の線維芽細胞自身における NF- $\kappa$ B の活性化が、腎線維化および腎性貧血に及ぼす影響は未だ不明である。

本研究では、神経堤由来の線維芽細胞特異的に NF- $\kappa$ B 経路を抑制した場合、腎線維化の進行が影響を

受けるのかどうか、マウスの一側尿管結紮水腎症モデルを用いて検討を行った。

2 方法

I $\kappa$ B $\Delta$ N は持続的な NF- $\kappa$ B 抑制作用をもつ遺伝子操作蛋白質である。これまでに我々は、I $\kappa$ B $\Delta$ N を Cre-LoxP 系により活性化する I $\kappa$ B $\Delta$ N 過剰発現マウスを作製し使用してきた。例えば、血管平滑筋選択的に NF- $\kappa$ B を抑制したマウスでは頸動脈傷害に対する新生内膜の肥厚が減弱しており、平滑筋細胞における NF- $\kappa$ B

活性の重要性が明らかにされた<sup>2)</sup>。また、腎糸球体の足細胞選択的に NF- $\kappa$ B を抑制したマウスを用いた検討では、アドリアマイシン腎症における蛋白尿が減弱しており、足細胞局所での炎症がスリット膜形成蛋白であるネフリンやシナプトポジンの発現に影響することを見出した<sup>3)</sup>。

今回はその I $\kappa$ B $\Delta$ N 過剰発現マウスを、神経堤由来の線維芽細胞に Cre recombinase を発現させる P0-Cre マウス (熊本大学山村先生より分与)<sup>4)</sup>と交配した。神経堤由来の線維芽細胞において、I $\kappa$ B $\Delta$ N を過剰発現さ

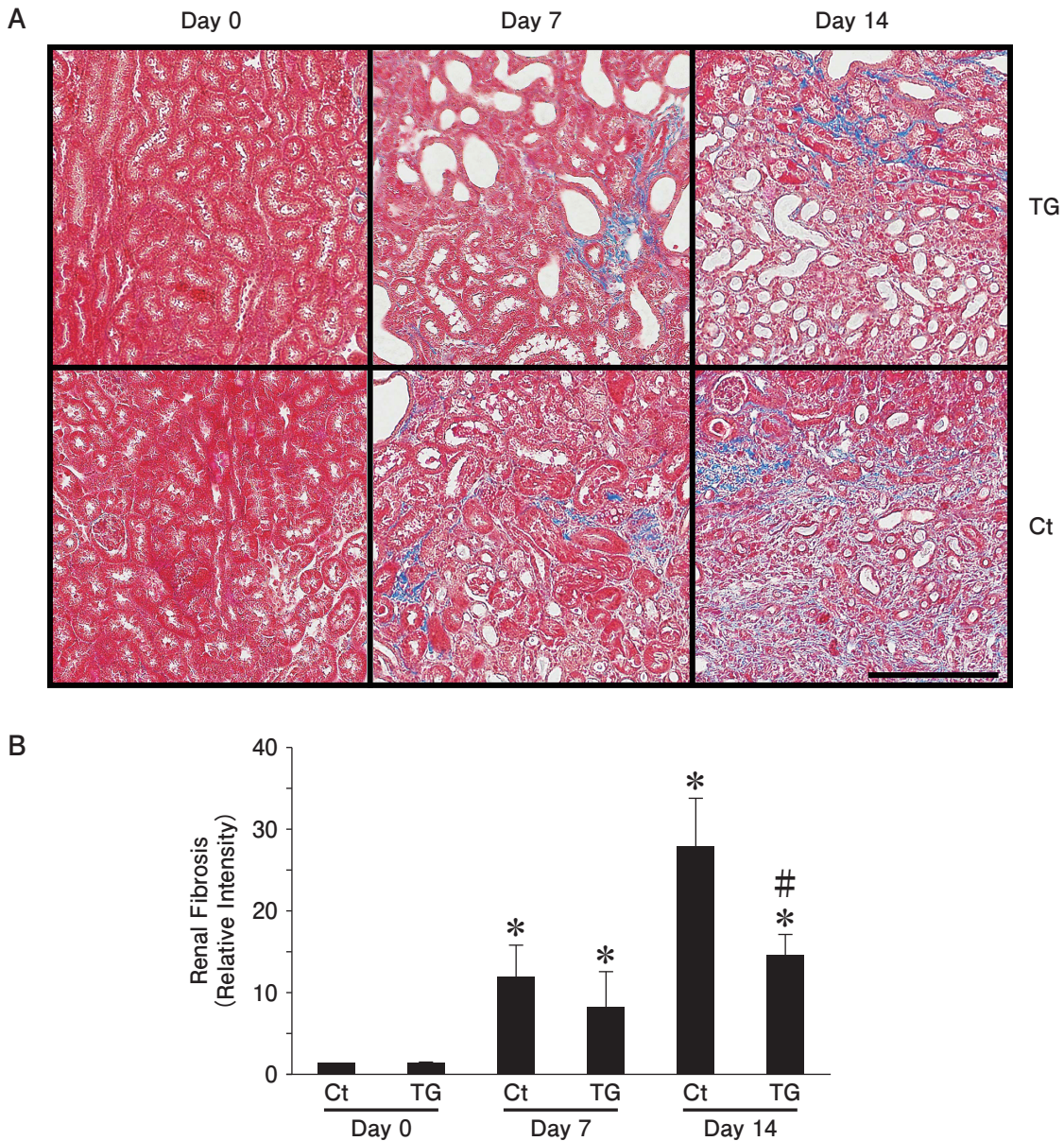


図1 神経堤由来線維芽細胞における NF- $\kappa$ B の抑制は、腎線維化を減弱させる  
 神経堤由来細胞特異的 I $\kappa$ B $\Delta$ N 過剰発現マウス (TG) およびコントロールマウス (CT) に、一側尿管結紮モデルによる片側水腎症を引き起こした。誘導前 (Day 0)、誘導後 7 日目 (Day 7)、14 日目 (Day 14) における線維化を Masson Trichrome 染色で検討した。A: 典型的イメージを示す。線維化を青く染色した。スケールバー: 200  $\mu$ m。B: 線維化の定量結果を示す。\*P<0.05 (Day 0 と比較), #P<0.05 (CT と比較)

せることによってNF- $\kappa$ Bを抑制した場合、腎線維化がどのような影響を受けるかについて検討を行った。

具体的には、神経堤由来細胞特異的I $\kappa$ B $\Delta$ N過剰発現マウス、およびコントロールマウスに一侧尿管結紮水腎症モデルを用いて、腎線維化を誘導した。腎線維化の程度をMasson Trichrome染色で検討するとともに、筋線維芽細胞の出現をSM  $\alpha$ -actinに対する免疫染色により確認した。また、このモデルにおける腎障害、腎性貧血を血清尿素窒素測定、ヘモグロビン測定で検討した。

### 3 結果と考察

神経堤由来細胞特異的I $\kappa$ B $\Delta$ N過剰発現マウス、およびコントロールマウスに、一侧尿管結紮モデルによる片側水腎症を引き起こした。

Masson Trichrome染色における検討では、水腎症誘発後14日目の腎臓において、神経堤由来細胞特異的I $\kappa$ B $\Delta$ N過剰発現マウスの線維化は、コントロールマウスの線維化に比較して有意に減弱していた(図1)。SM  $\alpha$ -actin染色においても同様に、水腎症誘発後

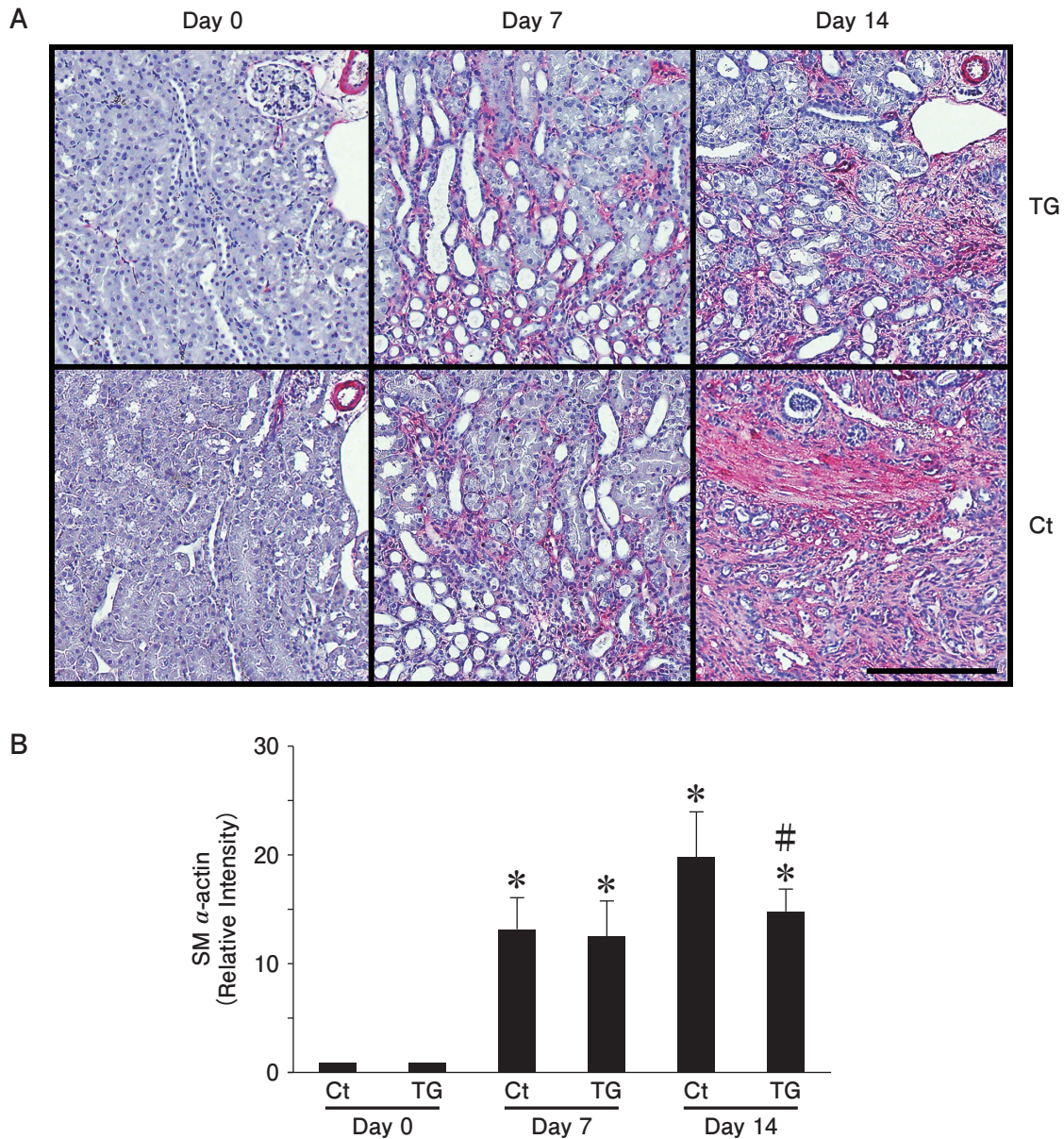


図2 神経堤由来線維芽細胞におけるNF- $\kappa$ Bの抑制は、筋線維芽細胞の出現を減少させる。神経堤由来細胞特異的I $\kappa$ B $\Delta$ N過剰発現マウス(TG)およびコントロールマウス(CT)に、一侧尿管結紮モデルによる片側水腎症を引き起こした。誘導前(Day 0)、誘導後7日目(Day 7)、14日目(Day 14)におけるSM  $\alpha$ -actinの発現を免疫染色で検討した。A: 典型的イメージを示す。SM  $\alpha$ -actinの発現を赤く染色した。スケールバー: 200  $\mu$ m。B: SM  $\alpha$ -actin発現の定量結果を示す。\*P<0.05 (Day 0と比較), #P<0.05 (CTと比較)

14日目の腎臓において、神経堤由来細胞特異的 I $\kappa$ B $\Delta$ N 過剰発現マウスでの筋線維芽細胞の出現は、コントロールマウスと比較して有意に減弱していた (図 2)。一方で、血清尿素窒素や血液中のヘモグロビン値は両者で差を認めなかった (図省略)。

これらの結果は、神経堤由来の線維芽細胞における NF- $\kappa$ B 経路の活性化が腎線維化に重要な役割を果たしていることを示している。血清尿素窒素値やヘモグロビン値に影響が認められなかった点に関しては、水腎症を誘発した腎臓と反対側の腎臓で代償していたものと理解される。今後、水腎症を誘発した腎臓において、エリスロポエチン発現がどのように変化しているのか、また線維化の進行に関連した炎症細胞の浸潤がどのように変化しているのか、神経堤由来細胞特異的 I $\kappa$ B $\Delta$ N 過剰発現マウスとコントロールマウスを比較しながら検討を進める予定である。

本研究が進行すれば、腎線維化のメカニズムの解明に役立つだけでなく、腎線維化の新たな治療法を提示できる可能性があるため、さらなる進展をはかりたい。

この研究は、平成 27 年度日本透析医学会公募研究助成によるものである。得られた成果を原著論文として投稿予定のため、二重投稿となることを避け、本報告書では概要を記載した。

#### 文 献

- 1) Asada N, Takase M, Nakamura J, et al. : Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 2011; 121 : 3981-3990.
- 2) Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, et al. : Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury. *J Am Heart Assoc* 2013; 2 : e000230.
- 3) Yamashita M, Yoshida T, Suzuki S, et al. : Podocyte-specific NF- $\kappa$ B inhibition ameliorates proteinuria in adriamycin-induced nephropathy in mice. *Clin Exp Nephrol* 2017; 21 : 16-26.
- 4) Yamauchi Y, Abe K, Mantani A, et al. : A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. *Dev Biol* 1999; 212 : 191-203.