

尿中チオレドキシンの測定により急性腎障害からの慢性腎臓病への移行を推定する技術の開発

研究代表者： 糟野 健司（医学系部門・准教授）
共同研究者： 岩野 正之（医学系部門・教授）、山内 高弘（医学系部門・教授）、
藤田 亮介（医学系部門・教授）

概 要	急性腎障害(AKI)は従来、完治すると考えられてきたが、一部は慢性腎臓病(CKD)や慢性維持透析に至る例があり AKI-to-CKD transition と呼ばれ問題になっている。AKI-to-CKD transition には尿細管細胞の G2/M 細胞周期停止が関与しているが臨床診断法はない。2016 年に米国 FDA に承認された Nephrocheck®は G1 停止細胞周期マーカーとして注目されているが、G2/M 停止情報は得られない。今回我々は C57BL6 マウスの虚血再還流 AKI にて AKI の 12 時間後をピークに腎実質内 Thioredoxin1(TRX1)が減少し、尿中 TRX1 が上昇し、これに同期して G2/M 停止マーカー p-Histone H3 の陽性尿細管細胞が増加することがわかった。さらに 72 時間後には腎実質内の TRX1 が回復・増加し、尿中 TRX1 が減少するのに同期して G2/M 停止マーカーが減少した。 以上の結果から AKI において尿中 TRX1 の上昇と同期して尿細管細胞の G2/M 停止が起こっていることがわかった。尿中 TRX1 により AKI-to-CKD transition を推定できる可能性が示唆された。
関連キーワード	尿中バイオマーカー、Thioredoxin1、AKI-to-CKD transition、G2/M 細胞周期停止

研究の背景および目的

レドックス制御蛋白 thioredoxin-1 (TRX1) は、分子内の 2 つのシステイン残基のチオール基を電子供与体としたレドックス反応を介して酸化型と還元型の 2 つ形を取る。酸化型 TRX1 は TRX 還元酵素により還元されリサイクルされるが、酸化ストレスが TRX 還元酵素の還元能力を超えると酸化型 TRX1 が細胞外に逸脱する。我々はこれまで急性腎障害 (AKI) の発症時に酸化ストレス依存性に酸化型 TRX1 が尿細管細胞内から尿細管腔に逸脱して尿中に検出されることを発見し、尿中 TRX1 が優れた AKI 診断マーカーであることを報告してきた (Kasuno et al. Am J Physiol Renal Physiol 2014)。さらに尿中 TRX1 測定が約 6 分で完了する迅速評価系を確立した (特願 2017-82836)。TRX1 の細胞外逸脱により細胞内 TRX1 は減少または喪失し尿細管細胞のレドックス破綻が起こってしまう。

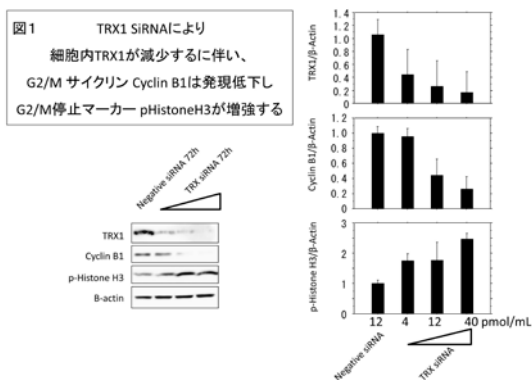
近年、AKI-to-CKD transition の促進因子として

尿細管細胞の G2/M 停止が注目されている (Yang L et al. Nat Med 2010)。我々は AKI に伴うレドックス破綻が尿細管の細胞周期に及ぼす影響を調べた。G2/M 細胞周期制御因子 Cdc25C は分子内にレドックス感受性ドメインを持つことから、培養尿細管細胞で Cdc25C のレドックス破綻による影響を観察したところ、TRX 還元酵素阻害剤の投与により Cdc25C のリン酸化が容量依存的に減少することを発見した。この結果からは「AKI における尿細管細胞内の TRX1 喪失が G2/M 停止の原因であり、AKI-to-CKD transition を引き起こす」という仮説が導き出される。本研究では TRX1 を細胞内から枯渇させたり、マウス AKI モデルで尿細管のレドックス破綻を再現させたりして、尿細管細胞の細胞周期プロファイルを観察し、AKI-to-CKD transition の臨床診断法を確立する。

研究の内容および成果

培養尿細管細胞で TRX1 ノックダウンして AKI 発症時の尿細管細胞内のレドックス破綻を再現させて、尿細管細胞の細胞周期プロファイルを観察した。siRNA のトランスフェクションの 72 時間後に最も強く TRX1 がノックダウンされることを確認した。TRX1 ノックダウンの効果は siRNA の容量依存的であった。TRX1 ノックダウンによる M-phase

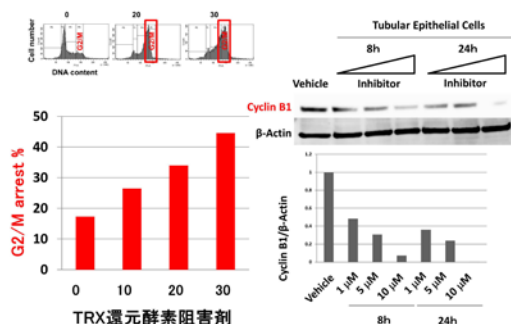
promoting factor : MPF) の構成サブユニット Cyclin B1 の発現量への影響を観察したところ、TRX1 の発現量が減少するに Cyclin B1 が減少することがわかった。さらに G2/M 停止マーカー p-Histone H3 の発現量を観察したところ、TRX1 の発現量が減少するにつれて p-Histone H3 の発現量は増加することがわかった (図 1)。



培養尿細管細胞に TRX1 還元酵素阻害剤を用いて Cdc25C と共役する G2/M サイクリン Cyclin B1 の発現量を観察したところ Cyclin B1 は容量依存的に減少し、フローサイトメトリーにて G2/M 停止細胞が用量依存的に増加した (図2)。一方、G1 サイクリンである Cyclin D1 はレドックス破綻による変化がなかった。

さらに、In vivo で AKI における尿細管細胞内の TRX1 喪失と尿細管の G2/M 細胞周期停止の関係を観察するため、C57BL6 マウスを用いた虚血再還流実験を行った。腎実質内の TRX1 を ELISA で定量し

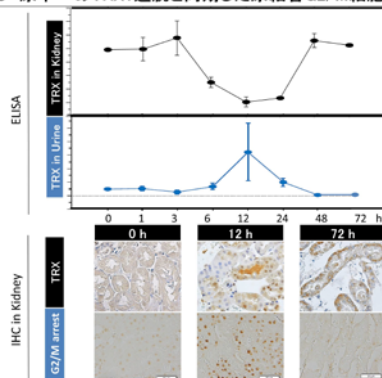
図2 細胞内TRX1の喪失とG2/M尿細管細胞周期停止



た。尿中の TRX1 は ELISA にて定量した。免疫染色にて腎実質内の TRX1 の局在と G2/M 停止マーカー p-Histone H3 観察した。尿中再還流の 12 時間後を

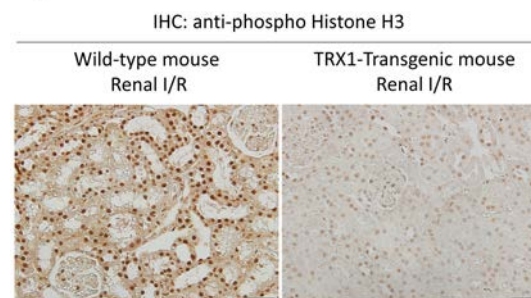
ピークに腎実質内の TRX1 が減少し、細胞質内から尿管腔内に逸脱すると同時に尿中 TRX1 が上昇し、これに同期して G2/M 停止マーカー p-Histone H3 陽性の尿細管細胞数が増加した。さらに 72 時間後には尿中 TRX1 が減少して、細胞質内 TRX1 が回復し腎実質内 TRX1 発現量が増加すると同期して p-Histone H3 陽性の細胞数が減少した (図3)。

図3 尿中へのTRX1逸脱と同期した尿細管G2/M細胞周期停止



さらに細胞内 TRX1 を β アクチンプロモーターで強制発現させた transgenic マウスで虚血再還流後の Histone H3 陽性尿細管細胞数を観察したところ Wild type マウスに比べ有意に少なかった (図4)。

図4



以上の結果から「AKIにおける尿細管細胞内の TRX1 の喪失が G2/M 停止の原因であり AKI-to-CKD transition の原因となっていることが示唆された。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

S Yokoi, K Kasuno et al. Analytic and Clinical Validation of urinary TRX1, an oxidative stress-dependent early biomarker of acute kidney injury using rapid and portable chemiluminescence enzyme immunoassay instrument. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* in Revision

「特記事項」

被検体における腎由来細胞の G 2 期から M 期への細胞周期の進行の有無を診断するためのデータの

取得方法、および、その利用・発明代表・2018. 3. 29 特願 2018-66043・2019. 3. 8PCT/JP2019/9522

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- AMED・平成 30 年度 京都大学・橋渡し研究戦略的推進プログラム・シーズ A・レドックス依存的 G2/M 細胞周期停止に着目した急性腎障害後の尿細管修復を促進し慢性化を阻止する医薬品の開発・代表・採択・250 万円
- 基盤研究(C) (一般) 平成 30-32 年度レドックス破綻からアプローチする新たな急性腎障害の発症修復メカニズムの解明・代表・採択・4, 420, 000 円