慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	近位尿細管上皮細胞の代謝リプログラミングを標的とした心腎連関の病態解明
Sub Title	The elucidation of the pathophysiology of cardiorenal syndrome by targeting metabolic reprogramming in proximal tubular epithelial cells.
Author	白川, 公亮(Shirakawa, Kohsuke)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	心不全や心筋梗塞などの循環器疾患の他、腎臓病、糖尿病や肺線維症などのオステオポンチン(OPN)が関与する病態解明研究を実施した。Spp1-EGFP Knock-in reporter マウスを用いた心筋梗塞、大動脈弁狭窄症、肥満、片腎動脈結紮腎線維化及び肺線維化モデルでは、それぞれ臓器特異的なOPN産生細胞が出現して病態を増悪させることを明らかにした。大動脈弁狭窄症の大動脈弁、心筋梗塞後の心臓、肥満患者の内臓脂肪、慢性腎不全の腎臓、肺線維症の肺など生活習慣病に関連する多臓器の単細胞遺伝子発現解析のデータの細胞間相互作用解析を実施してOPNシグナルによる病態増悪機序を解明した。 We conducted pathophysiological research involving osteopontin (OPN), which is associated with heart diseases such as heart failure and myocardial infarction, as well as kidney disease, diabetes, and pulmonary fibrosis. Using Spp1-EGFP Knock-in reporter mice, I elucidated that organ-specific OPN-producing cells appeared in models of myocardial infarction, aortic valve stenosis, obesity, renal fibrosis after unilateral renal artery ligation, and pulmonary fibrosis, exacerbating the respective pathologies. The cell-cell interaction analysis of single-cell RNA-seq data from multiple organs related to lifestyle diseases such as aortic valve stenosis, post-infarcted heart, visceral fat of obese patients, kidneys of chronic kidney disease patients, and lungs of pulmonary fibrosis patients, I clarified the pathogenic exacerbation mechanisms via OPN signaling.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2021～2023 課題番号：21K16096 研究分野：循環器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K16096seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

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

令和　６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１６０９６

研究課題名（和文）近位尿細管上皮細胞の代謝リプログラミングを標的とした心腎連関の病態解明

研究課題名（英文）The elucidation of the pathophysiology of cardiorenal syndrome by targeting metabolic reprogramming in proximal tubular epithelial cells.

研究代表者

白川　公亮（Shirakawa, Kohsuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：３０６２６３８８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：心不全や心筋梗塞などの循環器疾患の他、腎臓病、糖尿病や肺線維症などのオステオポンチン(OPN)が関与する病態解明研究を実施した。Spp1-EGFP Knock-in reporter マウスを用いた心筋梗塞、大動脈弁狭窄症、肥満、片腎動脈結紮腎線維化及び肺線維化モデルでは、それぞれ臓器特異的なOPN産生細胞が出現して病態を増悪させることを明らかにした。大動脈弁狭窄症の大動脈弁、心筋梗塞後の心臓、肥満患者の内臓脂肪、慢性腎不全の腎臓、肺線維症の肺など生活習慣病に関連する多臓器の単細胞遺伝子発現解析のデータの細胞間相互作用解析を実施してOPNシグナルによる病態増悪機序を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
OPNは生理的に生体恒常性を維持する作用もあるためOPNを直接治療標的とすることは難しく、疾患臓器特異的に特定の細胞から不適切に産生されるOPNの産生制御機構を解明できれば、OPNを標的とした生活習慣病の治療法開発に繋がる可能性がある。本研究の将来展望として生活習慣病患者の健康寿命の延伸のみならず、生活習慣病に関連する循環器病疾患の入院や手術費等を抑制でき医療経済的にも国民に還元できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We conducted pathophysiological research involving osteopontin (OPN), which is associated with heart diseases such as heart failure and myocardial infarction, as well as kidney disease, diabetes, and pulmonary fibrosis. Using Spp1-EGFP Knock-in reporter mice, I elucidated that organ-specific OPN-producing cells appeared in models of myocardial infarction, aortic valve stenosis, obesity, renal fibrosis after unilateral renal artery ligation, and pulmonary fibrosis, exacerbating the respective pathologies. The cell-cell interaction analysis of single-cell RNA-seq data from multiple organs related to lifestyle diseases such as aortic valve stenosis, post-infarcted heart, visceral fat of obese patients, kidneys of chronic kidney disease patients, and lungs of pulmonary fibrosis patients, I clarified the pathogenic exacerbation mechanisms via OPN signaling.

研究分野：循環器内科

キーワード：生活習慣病　マクロファージ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

心不全は我が国の主要な死因であり、5 年生存率は 50%に満たず、進行癌と同様に極めて予後不良な病態である。心不全を克服するには、心臓に様々なストレスが加わった場合の破綻メカニズムの解明が必要である。心不全は心臓単一臓器の機能不全ではなく、肺や腎臓などの様々な組織との臓器連関が病態や症状の成因に関与していることが明らかになってきた。

例えば、以前より臨床では腎機能低下は心不全の増悪に寄与し、逆に心不全は腎機能低下を惹起することが知られている。心臓と腎臓は様々な機序でお互いに関連しあっていると考えられ、この現象は心腎連関という概念として注目されている。心腎連関の病態機序に関しては，FGF23 による血管石灰化の促進，交感神経系やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進，酸化ストレスの増大などの様々な機序が報告されているが、まだまだ不明な点が多い。最近、DAPA-HF 試験や EMPEROR-Reduced 試験により、腎近位尿細管上皮細胞特異的に作用する血糖降下薬である SGLT2(sodium glucose cotransporter 2)阻害薬が、糖尿病を持たない心不全患者の予後を改善させることを示し世界的に非常に注目されている。

一方で、“腎臓を標的とした治療がなぜ心不全の予後を改善させるのか？”に関する詳細な分子機序はほとんど明らかではなく、また腎臓だけではなく肺を含めた多臓器連関による心不全発症・増悪機序に関しても不明な点が多い。

２．研究の目的

循環器病対策推進基本計画では、健康寿命の延伸のため、予防に関する循環器病対策を推進している。研究代表者は、これまで数多くの研究で、炎症性タンパク質 Osteopontin (OPN)が循環器病をはじめとした加齢関連疾患の疾患臓器特異的な細胞に発現し、線維化や炎症を惹起する病態増悪因子になることを解明してきた。OPN は加齢関連疾患の有望な治療標的であるが、OPN は生理的に生体恒常性を維持する作用もあるため OPN を直接治療標的とすることは難しく、研究代表者のこれまでの研究成果により、疾患臓器特異的に特定の細胞から不適切に産生される OPN の産生制御機構を解明することが病態解明と治療法の開発に繋がることが分かっている。

そこで本研究は、心腎双方の線維化を惹起する炎症性物質であるオステオポンチンに注目した。OPN が関与する腎障害モデルの近位尿細管上皮細胞における代謝リプログラミングとその代謝産物に注目し、エピジェネティックな作用による OPN 産生誘導機序と腎不全及び心腎連関を介した 心不全増悪の病態機序を解明することを目的とした。また、肺に関してもオステオポンチンが線維化や炎症を惹起する鍵分子として報告されており、オステオポンチンを介した心不全増悪機序を解明することを目的とした。

３．研究の方法

（１）オステオポンチンが関与する腎症の病態解明

① 申請者はすでに、オステオポンチンをコードする遺伝子である *Spp1* の EGFP ノックインマウスを用いて、急性期及び慢性期の様々な腎障害モデル(虚血再灌流障害(IRI)や片側尿管結紮(UUO)誘発慢性腎線維症モデル及びストレプトゾシン(STZ)投与による糖尿病性腎症モデル)におけるオステオポンチンの転写活性の局在や時系列を解析した。

② EGFP-*Spp1* ノックインマウス由来の近位尿細管上皮細胞 Primary culture を作成し、特に高血糖状態や低酸素状態では OPN の転写活性が著明に上昇することを確認した。高血糖状態 (30 mM)から正常血糖状態 (5 mM)に条件を変え、OPN の転写活性を測定した。2-デオキシ-D-グルコース (2DG)による解糖系阻害や SGLT2 阻害薬である Canagliflozin を投与して OPN 転写活性を測定した。

③ 虚血再灌流腎障害モデルを作成し、2-デオキシ-D-グルコース (2DG)により解糖系を阻害後、近位尿細管における OPN 転写活性と線維化の程度を定量 PCR や病理学的に測定した。

（２）オステオポンチンが関連する肺線維症を始めとした生活習慣病の病態解明

① Spp1-EGFP KI reporter マウスを用いてブレオマイシン投与による肺線維症モデル、高脂肪食負荷肥満モデル、心筋梗塞モデルを作成し、フローサイトメトリー及び病理学的にオステオポンチン転写活性が上昇する細胞の同定を実施した。

② オステオポンチン産生細胞の RNAseq 及び質量分析によるマルチオミクス解析を実施しオステオポンチン産生細胞の詳細な形質の解析を実施した。

４．研究成果

本研究では、心不全や心筋梗塞などの循環器疾患の他、腎臓病、糖尿病や肺線維症などのオステオポンチン(OPN)が関与する病態解明研究を実施した。

研究者は、近位尿細管上皮細胞にストレスが加わった時に上昇する蛋白としてのオステオポンチンに着目した。 ヒトでは急性腎障害に伴い血中オステオポンチンが上昇すると予後不良因子となるが、マウスを用いた実験により虚血再灌流障害を受けた腎臓では、オステオポ ンチンの転写活性が、近位尿細管上皮細胞で亢進することを見出した。また、虚血再灌流障害だけでなく片側尿細管結紮モデル、ストレプトゾトシン誘発性糖尿 病性腎症モデルでも近位尿細管上皮細

胞における OPN の転写活性が亢進したが、一方で、高脂肪食負荷肥満モデルではオステオポンチンの転写活性上昇効果は弱 かった。以上より、オステオポンチンは虚血再灌流障害、高血糖時の腎臓のストレスマーカーとして考えられた。Spp1-EGFP- KI マウスの腎臓から近位尿細管上皮細胞を高濃度のグルコースの存在下で培養するとオステオポンチンの転写活性が上昇し、近位尿細管上皮細胞は、高血糖状態に対して感受性が高く、非常に強いストレスを受けていることが分かった。高血糖曝露におけるオステオポンチンの転写活性亢進は、近位尿細管上皮細胞における myoinositol oxygenase の過剰 発現がおこり、これによって解糖経路の側副経路である myoinositol pathway が活性化、ミトコンドリアの fragmentation と脱分極が惹起され、結果として腎 臓の炎症・線維化が惹起されることが示唆された。さらに、本研究の過程で、OPN は腎臓だけではなく肺の炎症・線維化の増悪機序にも線維芽細胞の活性化や炎症細胞の浸潤促進という機序で重要や役割を果たすことを見出した。

Spp1-EGFP Knock-in reporter マウスを用いた心筋梗塞モデル、高脂肪食肥満モデル、片腎動脈結紮腎線維化モデル及び肺線維化モデルでは、それぞれ臓器特異的な OPN 産生細胞が出現して病態を増悪させることを明らかにした。心筋梗塞モデルマウスのオステオポンチン転写活性が上昇した細胞はマクロファージであり、心筋梗塞後 3 日目にオステオポンチンの転写活性がピークに達し、以降 7 日目までオステオポンチンの転写活性が維持されていた。高脂肪食負荷による肥満ではオステオポンチン転写活性上昇細胞は、老化 T 細胞であり、遅れてマクロファージでもオステオポンチンの転写活性が上昇し以降肥満の持続に付随してオステオポンチンの転写活性が上昇し続けていた。また、ブレオマイシン投与による肺線維症モデルでは、オステオポンチンの転写活性が上昇する細胞はマクロファージであり、ブレオマイシン投与後も少なくとも 30 日後まで転写活性が上昇し続けることが明らかとなった。

研究代表者は、生活習慣病に関連する多臓器の単細胞遺伝子発現解析のデータを統合してマクロファージを はじめとした、細胞特異的な遺伝子発現変動パターンを解析している。生活習慣病に関連する心筋梗塞後の心臓、肥満患者の内臓脂肪、慢性腎不全の腎臓、肺線維症/肺気腫の肺の統合的単細胞遺伝子発現解析を実施した。マクロファージを中心とした免疫細胞や Spp1 発現細胞と各疾患臓器特異的な細胞間相互作用を CellChat による bioinformatics 解析を実施し、Spp1-EGFP Knock-in reporter マウスを用いて心筋梗塞モデル、AS モデル、高脂 肪食肥満モデル及び肺線維症モデルの各々の臓器特異的な OPN 産生マクロファージの時系列遺伝子発現と、これら多臓器横断的な空間的遺伝子発現解析から得られた治療標的分子を解析した。今後、得られた結果をもとに、尿細管障害やその他生活習慣病に起因する病態に共通する治療標的を同定し、治療開発を目指す。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 Kohsuke Shirakawa, Motoaki Sano	４．巻 13
２．論文標題 Drastic transformation of visceral adipose tissue and peripheral CD4 T cells in obesity	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Frontiers in Immunology	６．最初と最後の頁 1044737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.1044737.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kohsuke Shirakawa,	４．巻 10
２．論文標題 Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Cardiovascular Disease: An Overview and Potential Therapeutic Approaches	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Biomeicines	６．最初と最後の頁 1850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10081850.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kohsuke Shirakawa	４．巻 7
２．論文標題 H2 Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps.	５．発行年 2022年
３．雑誌名 JACC Basic Transl Sci.	６．最初と最後の頁 146-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2021.11.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kohsuke Shirakawa	４．巻 11
２．論文標題 Osteopontin in Cardiovascular Diseases	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Biomolecules	６．最初と最後の頁 1047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11071047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Kohsuke Shirakawa	4．巻 10
2．論文標題 T Cell Immunosenescence in Aging, Obesity, and Cardiovascular Disease	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Cells	6．最初と最後の頁 2435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10092435.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関