

補体 C3 による高血圧病態形成および
腎線維化における転写因子 TWIST1 の関与の解明
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

大月 伯恭

修了年 2019 年

指導教員 阿部 雅紀

【研究の背景】

高血圧は無治療では脳卒中、高血圧性心疾患、腎硬化症などの重篤な臓器障害を引き起こす致死的疾患である。さらに高血圧は、加齢、糖尿病とともに、慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease：CKD）を引き起こす強い危険因子でもある¹。したがって高血圧病態を更に明らかにし、高血圧性臓器障害に対する適切な治療戦略を立てることが望まれている。また CKD は進行すると末期腎不全を招くばかりか、心血管疾患（Cardiovascular disease：CVD）の独立した危険因子となる^{2,3}。CKD の原因疾患に関わらず尿細管間質の線維化は糸球体硬化よりも CKD 進展に強く関連しているとされる⁴⁻⁶。腎線維化には責任分子として Transforming growth factor- β 1（TGF- β 1）が大きく関わっており、そのシグナルにより惹起される尿細管上皮細胞の上皮間葉化現象（Epithelial mesenchymal transition：EMT）がある。EMT では TGF- β 1 のシグナルにより上皮細胞が間葉系細胞に転換され、細胞接着因子である E-カドヘリンの低下や間葉系細胞マーカーである α -smooth muscle actin（ α -SMA）の上昇を認め、細胞外基質の増生を引き起こし⁷、腎線維化が誘導される。

高血圧自然発症ラット（Spontaneously hypertensive rats：SHR）は本態性高血圧の病態に類似する遺伝的な高血圧モデルラットであり、これまで福田らは SHR 由来血管平滑筋細胞は正常血圧の Wistar-Kyoto rats（WKY）由来血管平滑筋細胞に比べて収縮型から合成型に形質変換することで Angiotensin II（Ang II）を過剰に産生することを明らかにしてきた^{8,9}。さらに、In vivo で3週齢の血圧上昇前の SHR と WKY の大動脈中膜平滑筋でのマイクロアレイでは、SHR で補体 C3（C3）発現の亢進を認め、培養血管平滑筋細胞でも C3 が SHR

由来血管平滑筋細胞でのみ発現していた¹⁰。また C3 は細胞外シグナル制御キナーゼを介して転写因子 Krüppel-like zinc finger factor 5 (KLF-5) の発現を増加し、血管平滑筋細胞の形質を合成型にすることを見出した¹¹。また、腎臓のメサンギウム細胞においても、C3 が合成型形質変換を引き起こし、細胞増殖を刺激することが分かった¹²。さらに福田らは、SHR の高血圧病態における C3 の関与を検討するため、ゲノム編集技術 Zinc-finger nuclease 法にて SHR から C3 をノックアウト (Knock out : KO) した。C3KO SHR では塩分感受性高血圧が消失しており、また SHR での C3 発現増加による腎内 EMT によるレニン-アンジオテンシン系の活性化が確認された¹³。以上より、SHR 由来血管平滑筋細胞、メサンギウム細胞、線維芽細胞などの間葉系細胞は C3 を高発現し、KLF-5 を介して形質を合成型に形質変換することでレニン-アンジオテンシン系が活性化され Ang II を産生すると考えられる。

また、福田らは、In vivo で野生型および C3 ノックアウト (Knock out : KO) マウスに片側尿管結紮術 (Unilateral ureteral obstruction : UUO) を施し、EMT およびレニン産生を検討した。その結果、野生型では C3 とレニンは UUO 側の腎臓近位尿細管で強く発現しており、レニン産生を引き起こす転写因子肝臓 X 受容体 (Liver X Receptor : LXR) - α の核内移動を認めた。一方、C3 KO マウスでは C3 とレニンの発現は認められず、さらに水腎症による EMT、間質の線維化も起こらなかった。さらに収縮期血圧は野生型では UUO 側の腎臓で Ang II は著明に高値であり、収縮期血圧の上昇を認めたが、C3KO マウスでは Ang II の上昇や血圧の上昇を認めなかった¹⁴。

この様に、C3 の発現亢進は KLF-5 と TGF- β 1 を介して、間葉系細胞を脱分化、上皮系細胞は EMT を起こし、いずれも脱分化性を保つことにより LXR- α

を介してレニンを産生し，腎臓内 Ang II の亢進から高血圧と腎線維化を起こしていると考えられた。

Twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1 (TWIST1)は EMT を介した癌細胞の転移，浸潤や組織の線維化に不可欠な存在として知られている¹⁵⁻¹⁷。最近 Cho らによって，卵巣癌細胞において TWIST1 による EMT は C3 を介していることが報告された¹⁸。過剰に産生された TWIST1 が C3 遺伝子のプロモーターに結合することで C3 発現を亢進し，C3a が C3a 受容体に結合し，KLF-5 を介して EMT を引き起こし，卵巣癌の増殖や転移に関与しているとしている。高血圧病態の形成や腎線維化における C3 の発現亢進も TWIST1 が引き起こしている可能性があると考えられた。

【研究の目的】

C3 は間葉系細胞の脱分化，上皮系細胞の EMT を引き起こし，高血圧病態や腎線維化に大きく関わっている。その C3 の発現亢進の機序として転写因子 TWIST1 が関与している可能性があると考えられた。

そこで C3 の発現亢進に対する TWIST1 の関与について検討することで，高血圧病態，腎線維化の機序に関する新しい知見を得て，それらの病態解明に迫ることを本研究の目的とした。

【研究の材料と方法】

動物実験は，全て日本大学医学部動物実験委員会の指針に従った（日本大学動物実験計画承認番号：AP16M026-2，AP17M035-1）。

まず SHR 由来メサンギウム細胞での C3 高発現への TWIST1 の関与について検討するため、正常血圧の Wistar-Kyoto rats (WKY) と SHR からシービング法¹⁹でメサンギウム細胞を単離、培養した。それらの細胞を使用し、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロッティング法、免疫細胞染色で TWIST1 の発現を比較した。次に WKY, SHR の培養メサンギウム細胞における C3 プロモーター領域に対する TWIST1 の結合についてクロマチン免疫沈降法を用いて比較検討した。さらに SHR 由来メサンギウム細胞に対し、2 種類の siRNA で TWIST1 の発現をノックダウンした際の TWIST1, C3 の mRNA (*Twist1* mRNA, *C3* mRNA) 発現を検討した。また WKY 由来メサンギウム細胞に *Twist1* 遺伝子を導入(日本大学遺伝子組換え実験安全委員会 整理番号: 2018 医 2-1)した際の *C3* mRNA 発現を検討した。

腎線維化における C3 高発現に対する TWIST1 の関与について検討するため、マウス尿細管上皮 (TCMK-1) 細胞を IFN- γ で刺激し *Twist1* および *C3* mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で検討した。次に C3 と TWIST1 の関与を検討するにあたり、TWIST1 を抑制した際の C3 の発現や病理所見などを評価する必要があり、TWIST1 が *C3* プロモーター領域に結合する部位をターゲットとしてピロール・イミダゾール (Pyrrole Imidazole: PI) ポリアミドを設計・合成した (TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2)。In vivo の実験に先立ち、各 PI ポリアミドの効果を検討するため、TCMK-1 細胞を用いて、IFN- γ 刺激に対する各 PI ポリアミドの抑制効果を検討した。次に、マウスに UUO モデル作製し、酢酸を投与する Control 群、TWIST1 PIP-1 を投与する TWIST1 PIP-1 群、TWIST1 PIP-2 を投与する TWIST1 PIP-2 群の UUO 側と正常腎である非結紮 (Contralateral unobstructed kidney: CUK) 側で各種マーカーの比較検

討をリアルタイム PCR 法, ウェスタンブロッティング法, 免疫組織染色で行った. また糸球体障害指数 (Glomerular Injury Scores : GIS) と尿細管間質障害指数 (Tubulointestinal Injury Scores : TIS) による腎臓組織のスコアリング¹⁹を行った. 結果は SPSS version 24 (SPSS Inc, Chicago, USA)を用い, Student's T-test で統計学的解析を行った. またマウスの UUO モデルを用いた実験では, 各群内の正常腎である CUK 側と UUO 側の比較は Student's T-test, CUK 側, UUO 側それぞれの群間の比較は Turkey の方法と Games-Howell 法で解析を行った. $p < 0.05$ を有意差とした.

【研究の結果】

まず正常血圧である Wistar-Kyoto rats (WKY) および SHR 由来メサンギウム細胞での TWIST1 の発現を検討したところ, SHR 由来メサンギウム細胞では有意に亢進していることが確認された. C3 プロモーター領域に対する TWIST1 結合も WKY 由来メサンギウム細胞に比べ SHR 由来メサンギウム細胞で多いことが確認された. さらに SHR 由来メサンギウム細胞に対し siRNA を用いて *Twist1* mRNA を抑制したところ, *C3* mRNA は抑制され, また, WKY 由来メサンギウム細胞に *Twist1* 遺伝子を導入することで *C3 mRNA* の発現は亢進した.

また, 腎線維化に対する C3 と TWIST1 の検討として, まず, Interferon (IFN) - γ 刺激下のマウス尿細管上皮 (TCMK-1) 細胞 の *C3* および *Twist1* mRNA の発現を検討した. TCMK-1 細胞への IFN- γ 刺激では *C3* mRNA の発現が有意に亢進し, 同時に *Twist1* mRNA の発現が亢進することを確認した. そこで, *C3* プロモーター領域に対する TWIST1 の結合を阻害した場合の C3 発現を検討するため, 今回 2 種類の Pyrrole Imidazole (PI) ポリアミド (TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2) を設計・合成した. TCMK-1 細胞に対する IFN- γ 刺激

のもと、TWIST1 PIP-1 と TWIST1 PIP-2 を用い TWIST1 の C3 プロモーターに対する結合を阻害した場合、IFN- γ 刺激に対する C3 mRNA の増加は有意に抑制された。また UUO モデルにおいて、UUO 側では正常腎である非結紮 (Contralateral unobstructed kidney : CUK) 側に比べて、TWIST1、C3 の発現が亢進することを確認した。更に UUO 側では、TGF- β 1, α -smooth muscle actin (α -SMA), レニンの発現が亢進していた。そこで、TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2 を用い C3 プロモーターに対する TWIST1 結合の阻害を試みたところ、PI ポリアミドを投与していない Control 群の UUO 側に比し C3 と TGF- β 1 が抑制された。組織所見では、今回使用した TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2 による明確な腎線維化の抑制は確認できなかった。

【研究の考察】

福田らは SHR の間葉系組織では C3 が高発現し、間葉系細胞を脱分化させ、また腎線維化モデルにおいても C3 が EMT により、いずれも脱分化性を保つことでレニン-アンジオテンシン系を亢進させ、高血圧や腎線維化を招くと報告している⁸⁻¹⁴が、C3 の高発現の機序は不明であった。最近、卵巣癌細胞において TWIST1 による EMT は C3 を介していることが報告された¹⁸。そこで、SHR の間葉系組織や UUO モデルの腎線維化における C3 の高発現は TWIST1 によるものであると考えられた。今回の結果から、SHR 由来メサンギウム細胞を含む間葉系細胞における C3 発現亢進による合成型形質変換の原因は TWIST1 の高発現である可能性があり、SHR における高血圧病態に TWIST1 が関与していることが示唆された。また、UUO モデルにおいても TWIST1 が C3 のプロモーター領域に結合することで C3 の発現を亢進させていると考えられた。さらに今回使用した TWIST1 PIP-1 および TWIST1 PIP-2 による明確な腎線維化の抑制

は確認できなかったが、 TWIST1 を起因とする C3 を介した腎線維化のカスケードの一部には効果的であると考えられた。したがって、 TWIST1 をターゲットとしたPIポリアミドの創薬に関しても将来的な可能性も見出すことができた。

今後は SHR での高血圧病態に対する TWIST1 の関与に関して、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9²⁰ を用いた *Twist1* 遺伝子のノックダウンによる高血圧フェノタイプの変化について検討していく必要がある。ヒト乳癌細胞では miR-151-3p が TWIST1 の発現を抑制している²¹ という報告や miR-363 が TWIST1 の発現を亢進させ、ヒトの腎尿細管細胞における EMT を引き起こす²² という報告がある。また、DNA のメチル化などのエピジェネティックな変化が TWIST1 の発現に影響を与える²³ ともいわれている。SHR や腎線維化に伴う TWIST1 発現の亢進の原因として、これらが関与していないかを確認していく必要がある。また本研究では腎線維化のモデルとしてマウス UUO モデルを用いた。しかし、UUO モデルは水腎症による腎線維化のモデルである。したがって、糖尿病や高血圧によって引き起こされる慢性腎臓病とは異なる。慢性腎臓病の疾患モデルとしては 5/6 腎摘モデルが知られており、マウスよりもヒトとゲノム構造が近いコモンマーモセットの 5/6 腎摘モデル²⁴ を用いた実験が必要である。

【結論】

今回の研究から、高血圧病態における間葉系組織の脱分化や腎線維化における補体 C3 の発現亢進は、上流に TWIST1 が転写因子として働いていることが判明した。今後 TWIST1 は高血圧の成因の解明や治療の新しいターゲットになると考えられた。

【引用文献】

1. Yamagata, K. *et al.* Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. *Kidney Int.* **71**, 159–66 (2007).
2. Sarnak, M. J. *et al.* Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* **108**, 2154–69 (2003).
3. Go, A. S. *et al.* Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1296–305 (2004).
4. Mise, K. *et al.* Renal prognosis a long time after renal biopsy on patients with diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 109–118 (2014).
5. Shimizu, M. *et al.* Kidney lesions in diabetic patients with normoalbuminuric renal insufficiency. *Clin. Exp. Nephrol.* **18**, 305–12 (2014).
6. OKADA, T. *et al.* Histological predictors for renal prognosis in diabetic nephropathy in diabetes mellitus type 2 patients with overt proteinuria. *Nephrology* **17**, 68–75 (2012).

7. Lamouille, S. *et al.* Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
8. Fukuda, N. *et al.* Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1210–7 (1999).
9. Fukuda, N. *et al.* Contribution of synthetic phenotype on the enhanced angiotensin II-generating system in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **17**, 1099–107 (1999).
10. Lin, Z. H. *et al.* Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **44**, 42–47 (2004).
11. Yao, E.-H. *et al.* Complement 3 activates the KLF5 gene in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 468–73 (2008).
12. Wan, J.-X. *et al.* Complement 3 is involved in changing the phenotype of human glomerular mesangial cells. *J. Cell. Physiol.* **213**, 495–501 (2007).
13. Negishi, E. *et al.* Involvement of complement 3 in the salt-sensitive hypertension by activation of renal renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Physiol.* [ajprenal.00370.2018](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00370.2018) (2018). doi:10.1152/ajprenal.00370.2018

14. Zhou, X. *et al.* Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **305**, F957-67 (2013).
15. Yang, J. *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**, 927–939 (2004).
16. Kida, Y. *et al.* Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 661–673 (2007).
17. Lovisa, S. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat. Med.* **21**, 998–1009 (2015).
18. Cho, M. S. *et al.* Complement Component 3 Is Regulated by TWIST1 and Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Immunol.* **196**, 1412–8 (2016).
19. Okuda, T. *et al.* Angiotensin II and vasopressin stimulate calcium-activated chloride conductance in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **78**, 1443–8 (1986).
20. Shao, Y. *et al.* CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat. Protoc.* **9**, 2493–512 (2014).
21. Yeh, T.-C. *et al.* miR-151-3p Targets TWIST1 to Repress Migration of Human Breast Cancer Cells. *PLoS One* **11**, e0168171 (2016).

22. Morizane, R. *et al.* miR-363 induces transdifferentiation of human kidney tubular cells to mesenchymal phenotype. *Clin. Exp. Nephrol.* **20**, 394–401 (2016).
23. Sakamoto, A. *et al.* DNA Methylation in the Exon 1 Region and Complex Regulation of Twist1 Expression in Gastric Cancer Cells. *PLoS One* **10**, e0145630 (2015).
24. Yamaguchi, I. *et al.* Five-sixth Nephrectomy in Female Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a Chronic Renal Failure Model: -A Longitudinal Course of Serum Biochemical, Hematological and Histopathological Changes-. *J. Toxicol. Pathol.* **27**, 183–95 (2014).