

腎尿細管細胞内転写因子 NFAT5 の Na 調節における役割と 腎障害進展・慢性炎症に及ぼす意義の検討

向山 政志, 泉 裕一郎

熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学

概要 本研究は, 腎尿細管細胞に発現する転写因子である Nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) の Na 調節をはじめとする生理的役割と, 腎障害進展・慢性炎症への関与を明らかにすることを目的とした。

NFAT5 は高浸透圧環境下の細胞の保護と生存に関わる遺伝子群を誘導し, 間質浸透圧の高い腎臓の特に髄質に多く発現する。NFAT5 は炎症・免疫系に関与する NFAT family (1~5) の一員であるが, 他の family との homology は低く, また NFAT1~4 がカルシニューリンを介した Ca^{2+} 依存性シグナルを伝達するのに対し, NFAT5 はカルシニューリン非依存的に活性化される点でもユニークである。

NFAT5 の腎生理的な役割として, 尿の濃縮能を調節することが示唆されてきたが, これまで適切な *in vivo* での検討はほとんど行われていない。また, 近年 NFAT5 は関節炎や動脈硬化など多くの病態に関与することが指摘されている一方, 腎障害における NFAT5 の役割はまだほとんど検討されていない。われわれは, 尿細管細胞の NFAT5 が高浸透圧環境における細胞の生存のみならず, 腎臓特有の間質浸透圧や, 低酸素, 低 pH 変化などに反応して, 各種トランスポーターを介した Na をはじめとする電解質輸送を調節し, 体液の恒常性の維持に関わるとともに, 炎症の制御にも重要な役割を果たすと考えている。

そこでわれわれは, 尿細管細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Pax8-rtTA/LC-1 マウスと NFAT5 flox マウスを交配し, 尿細管特異的コンディショナル NFAT5 ノックアウト (KO) マウスを樹立した。ドキシサイクリン飲水による NFAT5 のノックアウトを確認した後, その表現型を評価したところ, 高度の多尿と尿中 Na 排泄の減少, 血清 Na 濃度の上昇傾向を認めた。また, 対照群に比し, 収縮期血圧が高い傾向を認めた。さらに, NFAT5 KO マウスに一側尿管結紮を施し慢性腎障害モデルを作製したところ, 対照群に比し, 腎組織における TUNEL 陽性細胞の増加と cleaved-caspase 3 蛋白の発現増加を認め, アポトーシスの亢進が示唆された。

本研究で樹立した尿細管特異的コンディショナル NFAT5 KO マウスは, NFAT5 欠損による胎生期の異常を避け, ubiquitous に発現する NFAT5 を尿細管細胞特異的に欠損させた初めての動物モデルである。今後このマウスの詳細な解析を進めていくことで, 腎臓における尿濃縮機構と Na 代謝調節の新たな知見を見出すことが期待される。また, 尿細管細胞の NFAT5 が慢性腎臓病の進展に対し抑制的に作用していることが示唆され, その機序について今後検討を進めていく。

1. 研究目的

本研究は, 腎尿細管細胞に発現する転写因子である Nuclear Factor of Activated T-Cells 5 (NFAT5) の Na 調節をはじめとする生理的役割と, 腎障害進展・慢性炎症への関与を明らかにすることを目的とした。

NFAT5 はあらゆる組織, 細胞に ubiquitous に発現する転写因子であるが, 浸透圧に応答する点でユニークであり, 高浸透圧環境下の細胞の保護と生存に関わる遺伝子群を誘導する⁽¹⁾。腎臓は皮質から髄質にかけて NaCl や尿素といった浸透圧物質の濃度勾配があり, 髄質の間質浸

透圧は 1,000 mOsm/kg・H₂O を超える。NFAT5 は皮質にも定常状態で発現するが、特に髄質に多く発現している。髄質の大部分を占める集合尿細管は、腎障害がネフロン構造に及んでも、最後までその機能を保持するとされる。すなわち、著しい高浸透圧環境に位置し、NFAT5 の活性が特に高いと考えられる集合尿細管には、特に高度な細胞保護機構があると推測される。

NFAT5 は炎症・免疫系に関与する NFAT family (1~5) の一員である。しかし、他の family との homology は低く、高浸透圧環境で活性化する点が他の family と性質を異にしている⁽²⁾。また NFAT1~4 がカルシニューリンの活性化を介した Ca²⁺ 依存性シグナルを伝達するのに対し、NFAT5 はカルシニューリン非依存的に活性化される⁽³⁾。

NFAT5 の腎生理的な役割として、集合尿細管の水チャネル⁽⁴⁾や尿素トランスポーター⁽⁵⁾の発現を誘導し、尿の濃縮能を調節することが示唆されている。このような仕組みは、尿細管細胞の内外への水や尿素の移動を容易にし、細胞内外の浸透圧差を速やかに解消するのに有利であり、高浸透圧環境でありながら、尿濃縮力の調節のために浸透圧が大きく変動する厳しい環境での細胞の保護、生存を可能にする機序とも考えられる。このように、NFAT5 による水チャネルや尿素トランスポーターの発現調節が重要であり、その機序は *in vitro* の手法により示唆されてきたが、これまで適切な *in vivo* での検討はほとんど行われていない。

近年、NFAT5 は関節炎⁽⁶⁾や動脈硬化⁽⁷⁾など多くの病態に関わることが指摘されている。しかし、腎障害における NFAT5 の役割はまだほとんど検討されていない。最近、NFAT5 が高浸透圧刺激以外に高血糖⁽⁸⁾、angiotensin II⁽⁹⁾、lipopolysaccharide⁽⁶⁾や低酸素刺激⁽¹⁰⁾で活性化することが報告された。われわれは、尿細管細胞の NFAT5 が高浸透圧環境における細胞の生存のみならず、腎臓特有の間質浸透圧や、低酸素、低 pH 変化などに反応して、各種トランスポーターを介した Na をはじめとする電解質輸送を調節し、体液の恒常性の維持に関わるとともに、炎症の制御にも重要な役割を果たすと考えている。

NFAT5 の遺伝子改変モデルは、これまで systemic なヘテロ欠損マウスが用いられてきた。ホモ欠損は胎生致死を示す。また腎臓での役割が重要と考えられながらも、ubiquitous に発現することから、*in vivo* での検討を難しくし

ていた。最近コンディショナルノックアウト(KO)マウスが作製されたが、systemic なノックアウトであるため、尿細管細胞特異的な役割の検討には不十分である。本研究により、尿細管細胞における NFAT5 の生理的役割の理解とともに、腎障害進展および慢性炎症に及ぼす病態生理的意義の解明を飛躍的に進めるものとする。

2. 研究方法

2.1 尿細管特異的コンディショナル NFAT5 ノックアウトマウスの作製

尿細管特異的 NFAT5 コンディショナル KO マウスを作製するために、Pax8-rtTA/LC-1 マウスと NFAT5 flox マウスを交配し、Pax8-rtTA/LC-1;NFAT5 flox/flox を得た後、ドキシサイクリンを投与することで尿細管特異的に Cre リコンビナーゼを発現させ、尿細管特異的 NFAT5 欠損マウスを作製した。今回申請者らは、NFAT5 flox マウスを作製した López-Rodriguez 研究室より入手し⁽¹¹⁾、すでに作製者らから譲り受け所持していた Pax8-rtTA マウス⁽¹²⁾と交配させた。NFAT5 ノックアウトを確認するために、腎組織を用いたリアルタイム PCR 法、蛍光免疫染色法を用いて検討した。

2.2 尿細管 NFAT5 のノックアウトの尿濃縮能、各種電解質排泄への効果の検討

ドキシサイクリンの飲水投与にて NFAT5 をノックアウト後、マウスの通常食餌と水道水を *ad libitum* に与え、代謝ケージ内で蓄尿し、飲水量、各種尿中、血中パラメーターを測定した。また tail-cuff 法にて血圧を測定した。対照群は、ノックアウトと同様にドキシサイクリン飲水を施した後の NFAT5 flox マウスとした。

2.3 尿細管 NFAT5 のノックアウトの慢性腎臓病モデルにおける効果の検討

尿細管細胞の NFAT5 の慢性腎臓病への関与を検討するために、マウスの片腎を摘出後、2 mg/dl aldosterone 持続皮下投与+1%食塩水を飲水負荷した腎障害モデルを作製し、NFAT5 ノックアウトマウスにおける腎線維化の進展を比較した。さらに、腎線維化モデルとして、一側尿管結紮モデルを作製し、同様に検討した。

3. 研究結果

3.1 尿細管特異的コンディショナル NFAT5 ノックアウトマウスの作製

Pax8-rtTA/LC-1 マウスと NFAT5 flox マウスを交配し、floxed NFAT5 と Pax8-rtTA/LC-1 の両者の遺伝子の組み込みが確認されたマウスを選別後、4週齢ごろよりドキシサイクリン含有水を *ad libitum* に飲水させ、尿細管細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現させて NFAT5 欠損を誘導した。われわれは最近、ドキシサイクリンによる急性腎障害時の腎保護効果を見出している。そのため、今後本研究を進める上で、ドキシサイクリンは必要最少量の使用が望ましく、初めにドキシサイクリンを 1, 2, 4 mg/dl で飲水させ、また 1, 2, 4 週間の投与を行い、腎組織内 NFAT5 の発現量をリアルタイムPCR法によって検討した。その結果、ドキシサイクリン 2 mg/dl を 2 週間飲水することにより、腎組織内 NFAT5 mRNA 発現を 80%抑制することを確認した (Fig. 1A)。抗 NFAT5 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったとこ

ろ、対照群に置いて、ネフロン構造全体と間質細胞に NFAT5 の発現を認めた (Fig. 1B)。皮質においては尿細管細胞の細胞質、核に均一な発現をし、髄質の外層では核内での発現がやや増加し、髄質内層では核内の発現がさらに増加した。さらに間質細胞では、細胞質が少なく全体の発現量の比較は難しいが、近傍の尿細管細胞よりも優位な発現を核内に認めた。

3. 2 尿細管 NFAT5 のノックアウトの尿濃縮能, 各種電解質排泄への効果の検討

2 週間のドキシサイクリン投与により NFAT5 のノックアウトを誘導後、飼育を継続し、定期的に蓄尿にて尿サンプルを採取し、尿量、尿浸透圧をモニタリングした。その結果、ドキシサイクリン投与終了 1 週間後より、NFAT5 KO マウスの尿量は増加し (Fig. 2A)、尿浸透圧は低下した

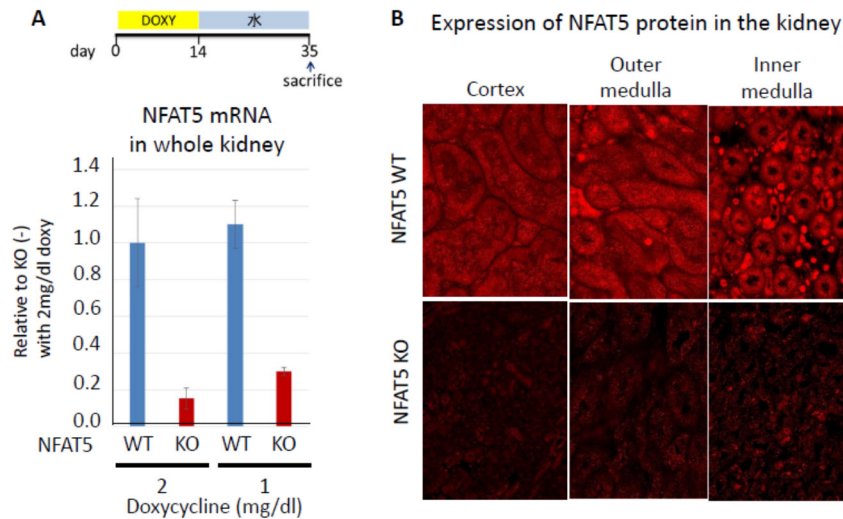


Fig. 1. Generation of renal tubule-specific conditional NFAT5 knockout mice.

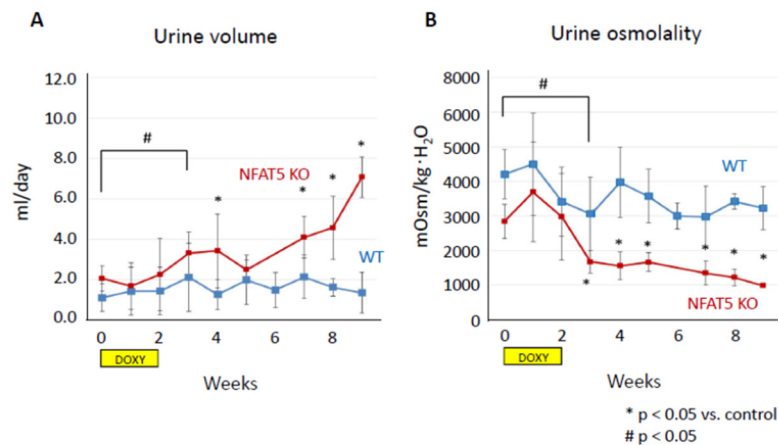


Fig. 2. Effect of renal tubule-specific NFAT5 deletion on urine volume and osmolality.

(Fig. 2B)。一方、尿中 Na 排泄量は、尿中排泄クレアチニン値で補正し対照群と比較したところ、KO 群で有意に減少していた (Fig. 3A)。血清 Na 濃度は NFAT5 KO マウスで高い傾向を認めた (Fig. 3B)。さらに、NFAT5 ノックアウトの血圧に対する効果を検討したところ、対照群に比し KO マウス群で高い傾向を認めた (Fig. 4)。

3.3 尿細管 NFAT5 のノックアウトの慢性腎臓病モデルにおける効果の検討

ドキシサイクリン飲水により NFAT5 をノックアウト後、片腎を摘出し、1%食塩飲水負荷+2 mg/dl aldosterone 持続

皮下投与を開始したところ、1 週間ほどで死亡した。原因は不明であるが、片腎摘出を施行しない、aldosterone の投与量を減量するなどの変法で再度検討を行なっている。一方、一側尿管結紮モデルにおいて、結紮 14 日後サクリファイスして検討したところ、対照群に比し NFAT5 KO マウスの腎組織には TUNEL 陽性細胞を多く認めた (Fig. 5A)。また、whole kidney を用いたウェスタンブロット法による検討では、対照群に比し、caspase 3 蛋白の発現減少と cleaved caspase 3 蛋白の増加を認めた (Fig. 5B)。

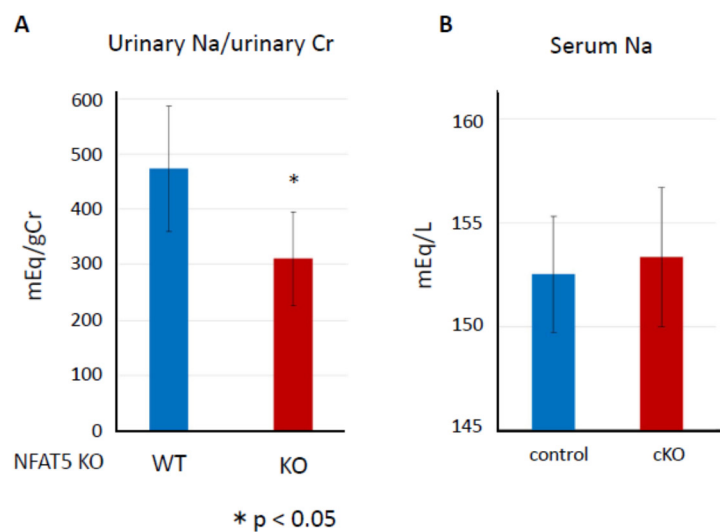


Fig. 3. Effect of renal tubule-specific NFAT5 deletion on urinary sodium excretion.

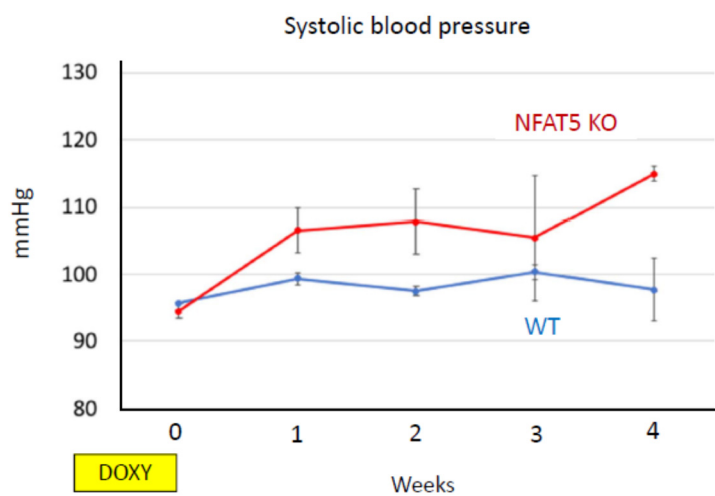


Fig. 4. Effect of renal tubule-specific NFAT5 deletion on blood pressure.

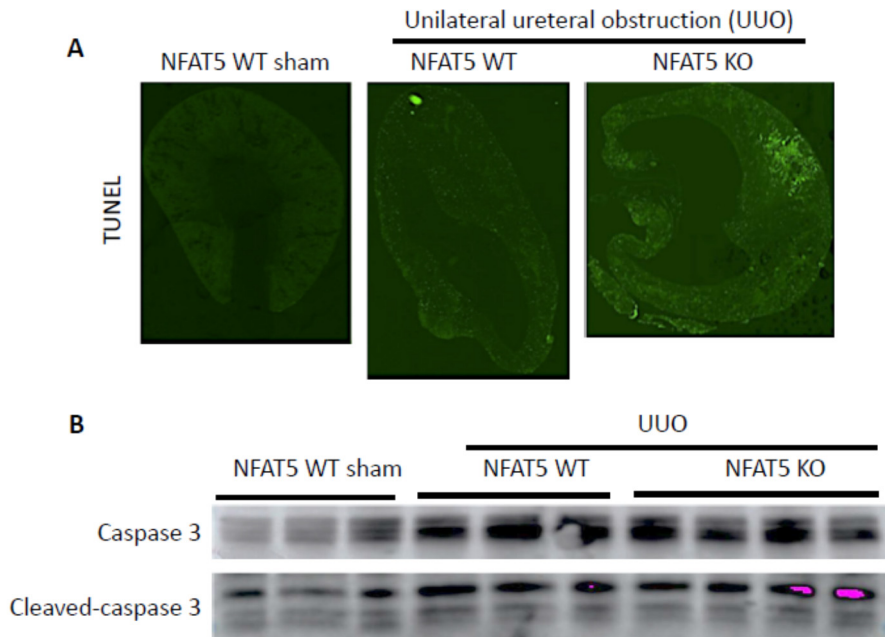


Fig. 5. Effect of renal tubule-specific NFAT5 deletion on renal tissue injury.

4. 考 察

NFAT5 による細胞保護の主な機序は、細胞外の高浸透圧環境に反応して浸透圧応答遺伝子群を誘導し、細胞内の sorbitol や betaine, glycerophosphocholine といった osmolyte を産生させることで、細胞内外の浸透圧差をなくすことである⁽¹⁾。このような機序については、細胞生物学的手法を用いた *in vitro* の検討で盛んに行われてきた。一方、動物レベルでの腎生理学的役割については、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の検討により考察されてきた。特に尿の濃縮機構や体液恒常性の維持における NFAT5 の役割について考える時、腎臓の尿細管細胞における分子機序を検討する必要がある。これまでの NFAT5 KO マウスを用いた検討の問題点は、NFAT5 は ubiquitous に発現するため、他臓器でのノックアウトのみならず、腎組織内においても、尿細管細胞以外の間質や血管でのノックアウトも生じたモデルであった点である。また、近年ようやく systemic なコンディショナル KO マウスが樹立されたが、それ以前は、ホモ欠損マウスが胎生致死であるためヘテロ欠損マウスを用いられてきた。そのため、これまで尿濃縮に関連するいくつかのチャネルやトランスポーターが尿細管細胞内の NFAT5 で発現調節されることが報告されてきたが、*in vivo* で十分に立証された知見とは言えなかった。今後われわれのモデルを解析していくことにより、これま

での *in vitro* による知見の裏付けを得ることが期待できる。

今回われわれが初めて樹立した、尿細管特異的 NFAT5 コンディショナル KO マウスは、NFAT5 ノックアウト誘導後、間もなく多尿と尿浸透圧の低下を示した。尿濃縮能の低下を示唆する結果である。蛍光免疫染色法による検討では、尿細管細胞における NFAT5 の発現の減少を認め、KO マウスの樹立を確認した。大変興味深い点は、KO マウスでは尿細管細胞だけでなく、間質細胞の NFAT5 の発現も減少していたことである。尿細管細胞の NFAT5 のノックアウトにより、間質の浸透圧が低下し、間質細胞の NFAT5 の発現が減少したことが示唆される。尿量が増加する一方で、NFAT5 のノックアウトは尿中 Na 排泄量を減少させた。血清クレアチニンの上昇など腎機能の低下を示唆する結果は認めず、尿中 Na の再吸収が促進されたことが示唆される。現在、尿の濃縮機構は、腎組織間質への Na 貯留により皮質から髄質へかけて形成される間質浸透圧勾配が、集合尿細管より水チャネルアクアポリンを介して水の再吸収を促進するという、対向流増幅系の仮説⁽¹³⁾に基づいて一般に説明されている。NFAT5 KO マウスにおいては、尿中 Na の再吸収が亢進しているにも関わらず、間質の浸透圧勾配が出来ないことを示しており、もう一つの浸透圧勾配形成物質である尿素の重要性が示唆される。今後、Na 再吸収トランスポーターである

NKCC2, NCC, 上皮型 Na チャネル (ENaC) やアクアポリン 2 (AQP2) などの水チャネル, 尿素トランスポーターの発現について検討し, 尿濃縮機構の新たな知見を得たい。

慢性腎臓病の原因は様々であるが, 慢性炎症という共通の経路を経て, 間質線維化, 腎不全にいたる。今回われわれは, 2 種類の慢性腎障害モデルにおいて尿細管細胞内 NFAT5 ノックアウトの影響を検討した。片腎摘出後食塩負荷 + aldosterone モデルは, 食塩負荷 + aldosterone 投与後1週間で全て死亡した。原因は不明であるが, これまでに得られた結果より, 多尿の増悪による脱水や, 高ナトリウム血症の増悪が推測される。NFAT5 ノックアウトは血圧が高い傾向にあり, 食塩感受性高血圧が増悪した結果とも考えられ, 大変興味深い。今後, 片腎摘出を行わず食塩負荷 + aldosterone 投与を行うなど, 適切なモデルを作成し, 再検討していく予定である。一方, 一側尿管結紮モデルにおいては, NFAT5 ノックアウトにおいて腎組織におけるアポトーシス細胞の増加を認めた。尿細管細胞の NFAT5 が線維化を主とした慢性腎障害の進展抑制に関与することを示唆する結果である。今後, NFAT5 が腎線維化進展におけるいずれの経路の抑制に重要であるか, 詳細な検討を進めていきたい。

5. 今後の課題

本研究により, 尿細管細胞内 NFAT5 が尿濃縮の維持に重要であることが明らかとなった。また, 尿中 Na の再吸収にも関与することが示唆された。尿濃縮機構, Na 代謝についての新たな知見を得るための有用な動物モデルであり, 今後血清電解質や尿中電解質排泄量を評価し, 尿濃縮, Na 排泄に関連する遺伝子の発現変化を検討していく予定である。また腎線維化モデルの検討により, NFAT5 が生理的環境下だけでなく, 慢性腎臓病の進展にも重要であることが示唆された。今後は細胞株を用いた *in vitro* の手法も取り入れ, NFAT5 が慢性炎症から尿細管細胞をどのように保護するのか, 検討を進めていく。

6. 文献

1. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87: 1441–1474, 2007.
2. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, et al. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 2538-2542, 1999.
3. López-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, et al. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT5 protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 7214-7219, 1999.
4. Hasler U, Jeon US, Kim JA, et al. Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol*. 17: 1521-1531, 2006.
5. Nakayama Y, Peng T, Sands JM, et al. The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem*. 275: 38275-38280, 2000.
6. Kim NH, Choi S, Han EJ, et al. The xanthine oxidase-NFAT5 pathway regulates macrophage activation and TLR-induced inflammatory arthritis. *Eur J Immunol*. 44: 2721-2736, 2014.
7. Halteman JA, Kwon HM, Leitinger N, et al. NFAT5 expression in bone marrow-derived cells enhances atherosclerosis and drives macrophage migration. *Front Physiol*. 3: 313, 2012.
8. Hernández-Ochoa EO, Robinson P, Contreras M, et al. Elevated extracellular glucose and uncontrolled type 1 diabetes enhance NFAT5 signaling and disrupt the transverse tubular network in mouse skeletal muscle. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237: 1068-1083, 2012.
9. Halterman JA, Kwon HM, zargham, et al. Nuclear factor of activated T cells 5 regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31: 2287-2296, 2011.
10. Villanueva S, Suazo C, Santapau D, et al. NFAT5 is activated by hypoxia: role in ischemia and reperfusion in the rat kidney. *PLoS One*. 7: e39665, 2012.
11. Drews-Elger K, Ortells MC, Rao A, et al. The transcription factor NFAT5 is required for cyclin

expression and cell cycle progression in cells exposed to hypertonic stress. *PLoS One*. 4: e5245, 2009.

12. Traykova-Brauch M, Schönig K, Greiner O, et al. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice.

Nat Med. 14: 979-984, 2008.

13. Weitzman RE, Kleeman CR. The clinical physiology of water metabolism. Part II: Renal mechanisms for urinary concentration; diabetes insipidus. *West J Med*. 131: 486-515, 1979.

Roles of Transcription Factor NFAT5 in Renal Tubular Cells for Sodium Homeostasis and During the Progression of Renal Injury and Chronic Inflammation

Masashi Mukoyama, Yuichiro Izumi

Department of Nephrology, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Nuclear factor of activated T-cells 5, NFAT5, is a transcription factor, which is activated by hyperosmolality and induces osmoprotective genes, resulting in cell survival even in extremely high osmolality conditions such as renal inner medulla. NFAT5 is a member of the NFAT family. Whereas NFAT1 to 4 are regulated by calcineurin, NFAT5 is not.

NFAT5 has been suggested to regulate urine concentration. However, *in vivo* studies have so far performed less because suitable gene-engineered animals have not been generated. NFAT5 is expressed ubiquitously and its homozygous deletion results in embryonic lethal. Recent studies suggest the involvement of NFAT5 in various diseases such as arthritis and atherosclerosis. However, the role of NFAT5 in the progression of chronic kidney disease has not been investigated yet.

In the present study, we generated renal tubule-specific conditional NFAT5 knockout (KO) mice. The NFAT5 KO mice exhibited polyuria and less urinary sodium excretion. Systolic blood pressure in NFAT5 KO mice tended to be increased compared with that in control mice. To investigate the involvement of NFAT5 in renal tubules in chronic kidney disease, the mice were subjected to unilateral urethral obstruction (UUO). UUO induced TUNEL positive cells and the expression of cleaved-caspase 3 protein in the kidney tissue in control mice, indicating that apoptosis was induced by UUO. Tubular deletion of NFAT5 promoted apoptosis more than that in control mice.

In conclusion, NFAT5 in renal tubular cells has a crucial role in the urine concentration mechanism. NFAT5 might have a protective role against the progression of chronic kidney disease. Further investigations to elucidate the roles of NFAT5 in the kidney are ongoing.