助成番号　2329

食塩感受性高血圧の腎線維化におけるメカノチャネル Piezo2 の役割

長瀬　美樹

杏林大学医学部

概　要

高血圧による臓器障害には，圧力・伸展力・ずり応力などの機械的刺激の過剰負荷が重要である。申請者は，メカノセンサー分子 Piezo2 が正常マウス腎臓では糸球体のメサンギウム細胞とレニン産生細胞に限局して発現すること，食塩感受性高血圧による腎硬化症モデル（食塩負荷 Dahl-S ラットや脳卒中易発症自然発症高血圧ラット）では，正常での発現部位に加え，腎内小動脈周囲の αSMA 陰性・Col1 陽性線維芽細胞に強発現することを報告した。本研究では腎線維化，特に食塩過剰摂取による線維化における Piezo2 の役割を検討することを目的とする。

腎線維化モデルとして頻用される片側尿管閉塞（UUO）マウスと，食塩感受性高血圧に伴う腎硬化症モデルとして左腎摘＋アルドステロン皮下投与＋高食塩食モデルを作製した。細胞特異的 *Piezo2* KO マウスは *Pdgfrb-CreER*$^{T2+/-}$マウスと *Piezo2*$^{FL/FL}$マウスを交配して *Pdgfrb-CreER*^{T2}陽性 *Piezo2*$^{FL/FL}$（*Piezo2* KO）マウスと *Pdgfrb-CreER*^{T2}陰性 *Piezo2*$^{FL/FL}$（*Piezo2* WT）マウスを産出し，Tamoxifen を腹腔内投与して作製した。Piezo2 発現量は qPCR と Immunoblotting にて評価した。*Piezo2* 発現細胞は RNAscope *in situ* hybridization で細胞マーカーとの二重染色にて同定した。

野生型マウスで作製した UUO モデルでは Piezo2 発現量の著明な増加が認められた。増加した *Piezo2* は尿細管細胞にはほとんど検出されず，主に間質細胞に発現していた。二重染色では，*Piezo2* シグナルは *Col1a1* や *Pdgfrb*，*Meflin* と共局在しており，*Acta2* とはほとんど共局在しなかった。当初 KO マウス樹立のための交配がうまくいかず，別系統のマウスを購入したところ産仔が得られ，Tamoxifen 投与により細胞特異的 *Piezo2* KO マウスを作製し，腎表現型の解析を進めている。

Meflin 陽性線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化せず腎保護的に働く細胞集団と考えられており，Piezo2 陽性線維芽細胞のもたらす線維化が病的な線維化に対して保護的に働く可能性が示唆された。*Piezo2* KO マウスの解析よりこの作業仮説を検証したいと考えている。

1．研究目的

近年人口の高齢化とともに，慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）および末期腎不全の患者数の増大が社会的にもクローズアップされている。透析導入の原因疾患として，糖尿病性腎症に次いで多いのが高血圧性腎硬化症であり，食塩の過剰摂取はその極めて重要な増悪因子である。そして腎臓の線維化は，CKD から末期腎不全に至る病理学的最終像であり，その病態解明は喫緊の課題である。申請者は，食塩感受性高血圧モデル動物における腎障害の発症機序，特に鉱質コルチコイド受容体シグナリングの関与について，10 年以上にわたり研究を重ねてきた [1-10]。

高血圧による臓器障害には，血管を介した圧力・ずり応力などの機械的刺激の影響が重要であり，腎臓も例外ではない。近年，生体の機械的刺激への応答を研究する「メカノバイオロジー」の分野が注目され，様々な受容機構の分子メカニズムが発見されてきた。中でも 2010 年に Patapoutian らによって発見されたイオンチャネル Piezo1，Piezo2 [11]は，メカノレセプターの代表格と言えるもので，

2021 年のノーベル賞の授与対象となった。しかし腎臓における役割はまだ不明な部分が多い。

我々は，Piezo2 が正常マウス腎臓のメサンギウム細胞およびレニン産生細胞に発現していること，脱水という腎灌流圧減弱状態でその発現が変動することを見出し，世界に先駆けて論文を発表した[12)]。Piezo2 は高血圧性腎障害の病態生理に大きくかかわると考えられるため，我々は引き続き，食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl 食塩感受性（DS）ラットを用いて検討を行うこととした。現在のところ，Dahl ラットに食塩を負荷して悪性高血圧を誘導すると，メサンギウム細胞，レニン産生細胞に加え，腎臓の小動脈周囲の線維化部分の間質細胞で Piezo2 が強発現するという興味深い結果が得られている。

ここで特に注目すべきは，腎線維化に関わる血管周囲の間質細胞の実体についてである。既存の報告では，この血管周囲の間質細胞は単なる線維芽細胞や筋線維芽細胞だけではなくペリサイト，平滑筋細胞，外膜細胞などを含むヘテロな集団であるとされるが，報告は一貫せずホットな議論となっている[13)]。例えば Humphrey らのグループは，腎血管周囲に間葉系幹細胞の性質をもつ Gli1陽性細胞（hedgehog シグナルの下流分子）が存在し，筋線維芽細胞への分化，腎線維化，血管の石灰化，臓器障害に寄与するという注目すべき報告をしている[14)]。一方 2022 年 Minatoguchi らは，腎血管周囲に存在し線維化に関与するが，それ自身はほとんど筋線維芽細胞に分化せず臓器保護的に働く間質細胞の subpopulation があり，それが Meflin 陽性であることを示した[15)]。これらの先行研究で示されている細胞集団の異同，オーバーラップについては controversial で錯綜している。またこれらの細胞のメカノバイオロジカルな検討，Piezo2 の機能解析などもなされていない。

そこで今回申請する研究は，Dahl ラットなどの食塩感受性高血圧モデル動物および他の腎線維化モデル動物において，Piezo2 陽性の血管周囲の細胞の更なる characterizationを行い，病態への寄与を検討することを目的とする。具体的には Meflin，その他ペリサイトや間葉系幹細胞マーカーなどの発現を調べ，それらの集団との異同を検討する。また *in vivo* での Piezo2 の機能を明らかにするにはノックアウト実験がやはり必要であり，マウスを用いた系が必須である。いくつかの conditional な Piezo2 KO を作製して，この Piezo2 陽性細胞のもたらす線維化が臓器障害的か保護的かを検討する。そしてそれらを通じて食塩感受性高血圧による腎線維化への治療戦略を描きたいと考えている。

２． 研究方法

２．１ 食塩感受性高血圧・腎障害モデルの作製

4 週齢の雌雄 Dahl 食塩感受性ラット（Dahl-S：DIS/Eis），5 週齢の雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）と Wistar Kyoto ラット（WKY），高血圧自然発症ラット（SHR）は三協ラボサービス株式会社より購入した。Dahl-S ラットは，通常食 （DSN）群，8%食塩食（DSH）群，8%食塩食＋降圧薬治療群（Esaxerenone を混餌した 8%食塩食：DSH+Esax）の 3 群に分け，6 週間飼育した。SHRSP は 8%食塩食で 5 週間飼育し（SHRSP-S），通常食で飼育した WKY と SHR を対照群とした。血圧は tail cuff 法で測定し，アルブミン尿は ELISA で測定し，尿中クレアチニン濃度で補正した（UACR）。

２．２ 片側尿管閉塞（unilateral ureteral obstruction：UUO）マウスモデルの作製

雄性 C57BL/6J マウス（6～8 週齢，体重 25 g 前後）は三協ラボサービス株式会社より購入した。イソフルランによる吸入麻酔下に，マウスを腹臥位にして背側アプローチにて左尿管を露出させ，4-0 シルク糸にて二重結紮した（UUO 群）。対照群は尿管結紮以外の手術を行った（sham 群）。手術後 7 日目，14 日目に両群の腎臓を採取し，解析した。

２．３ 腎線維化部位での Piezo2 および各種マーカーの発現解析

腎病理組織を HE 染色，PAS 染色，マッソントリクロム（MT）染色して腎障害の程度を評価した。Piezo2 の発現レベルは qPCR，ウエスタンブロッティングにて定量解析した。Piezo2 の発現部位は RNAscope *in situ* hybridization（ISH）により解析し，細胞マーカーとの共染色にて発現細胞を同定した。明視野画像は光学顕微鏡（BX51；オリンパス）にて，蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡（LSM 980；Zeiss）にて取得した。

２．４ Conditional Piezo2 KO マウスを用いた *in vivo* での Piezo2 機能解析

Piezo2 の全身性 KO マウスは出生直後に死亡するため，*in vivo* の Piezo2 の機能解析には時期部位特異的な KO

マウスが必要である。そこで Pdgfrb$^{Cre/ERT2}$ マウスとPiezo2$^{flox/flox}$ マウスの掛け合わせにより，タモキシフェン誘導性の Pdgfrb 陽性細胞特異的 Piezo2 KO マウスを作製し，適切な時期にタモキシフェンを腹腔内投与し，Piezo2 の KOを誘導した。片腎摘＋アルドステロン＋食塩負荷マウスモデル及び UUO モデルを作製し，血圧，腎機能，腎線維化の変化（臓器障害的か保護的か），各種マーカーの発現変化を解析した。

３．研究結果

３．１ 食塩感受性高血圧・腎障害モデルにおける血管周囲 Piezo2 陽性細胞の解析

雄性 Dahl-S ラットを通常食で飼育した DSN 群，8%食塩食で 6 週間飼育した DSH 群，8%食塩食＋降圧薬治療群（DSH+Esax）で Piezo2 発現を qPCR で比較すると，DSH で有意に増加しており，DSH+Esax では増加は抑制されていた（**Fig. 1A**）。DSN 群では，Piezo2 は糸球体メサンギウム細胞と傍糸球体レニン産生細胞に限局して発現していた（**Fig. 1B 左**）。8%食塩食で 6 週間飼育した DSH 群は，加速型高血圧・高血圧性腎硬化症を呈し，Piezo2 はこれら細胞に加えて血管周囲の細胞に発現発現は増加していた（**Fig. 1B 中央**）。8%食塩食＋降圧薬治療群（DSH+Esax）では血管周囲に Piezo2 陽性細胞は全く検出されなかった（**Fig. 1B 右**）。血管周囲の Piezo2 発現細胞を特定するため，各種マーカーとの二重染色を行ったところ，これら細胞は Pdgfrb 陽性・Col1 陽性・Col3 陽性で，Acta2 は陰性であった。神経マーカー，単球・マクロファージマーカー，T 細胞マーカーは陰性であった（**Fig. 1C**）。

以上より，Piezo2 陽性血管周囲細胞は間葉系細胞であり，おそらく血管周囲に存在する線維芽細胞であると考えられた。これらの結果は雌性 Dahl-S ラットでも同様に認められた（**Fig. 2A**）。

食塩負荷 Dahl-S ラットでの結果が他の食塩誘発性高血圧性腎硬化症・加速型高血圧でも見られるか否かを調べるため，5 週間食塩負荷を行った SHRSP-S でも解析した。対照として用いた WKY や SHR に比し SHRSP-S では Piezo2 発現が増加しており，血管周囲に Piezo2 陽性細胞を認め，こられ細胞は Pdgfrb 陽性の（おそらく）線維芽細胞であった（**Fig. 2B**）。

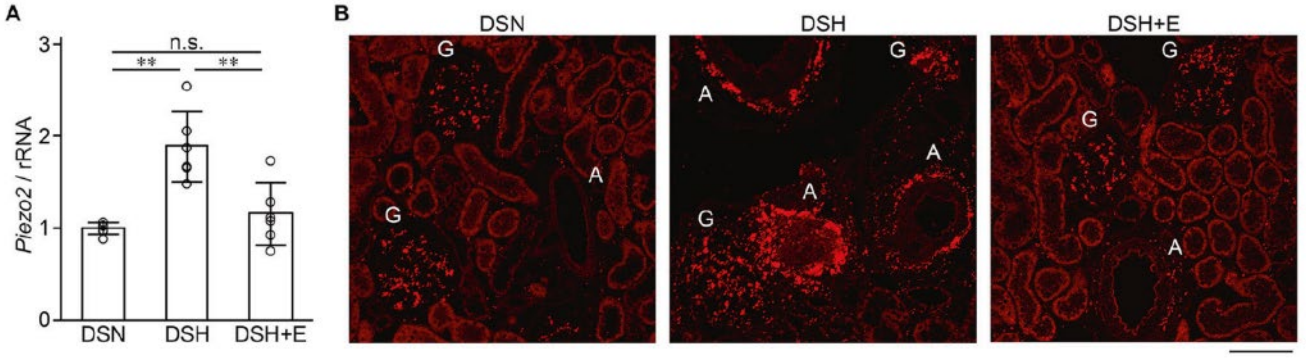

Fig. 1A, B 食塩負荷雄性 Dahl-S ラットの腎臓における Piezo2 発現の増加と血管周囲 Piezo2 陽性細胞の同定
Dahl 食塩感受性ラットを通常食（DSN），8%NaCl（DSH），降圧薬を混餌した 8%NaCl（DSH+Esax）にて 6 週間飼育した。

A. 腎臓における Piezo2 発現は DSH 群で優位に増加していた。
B. Piezo2 発現を RNAscope *in situ* hybridisation 法で検出したところ，DSH 群では糸球体近傍（Glom）に加えて血管周囲にシグナルを認め（A），血管周囲のシグナルは高血圧治療群（DSH+E）では認められなかった。

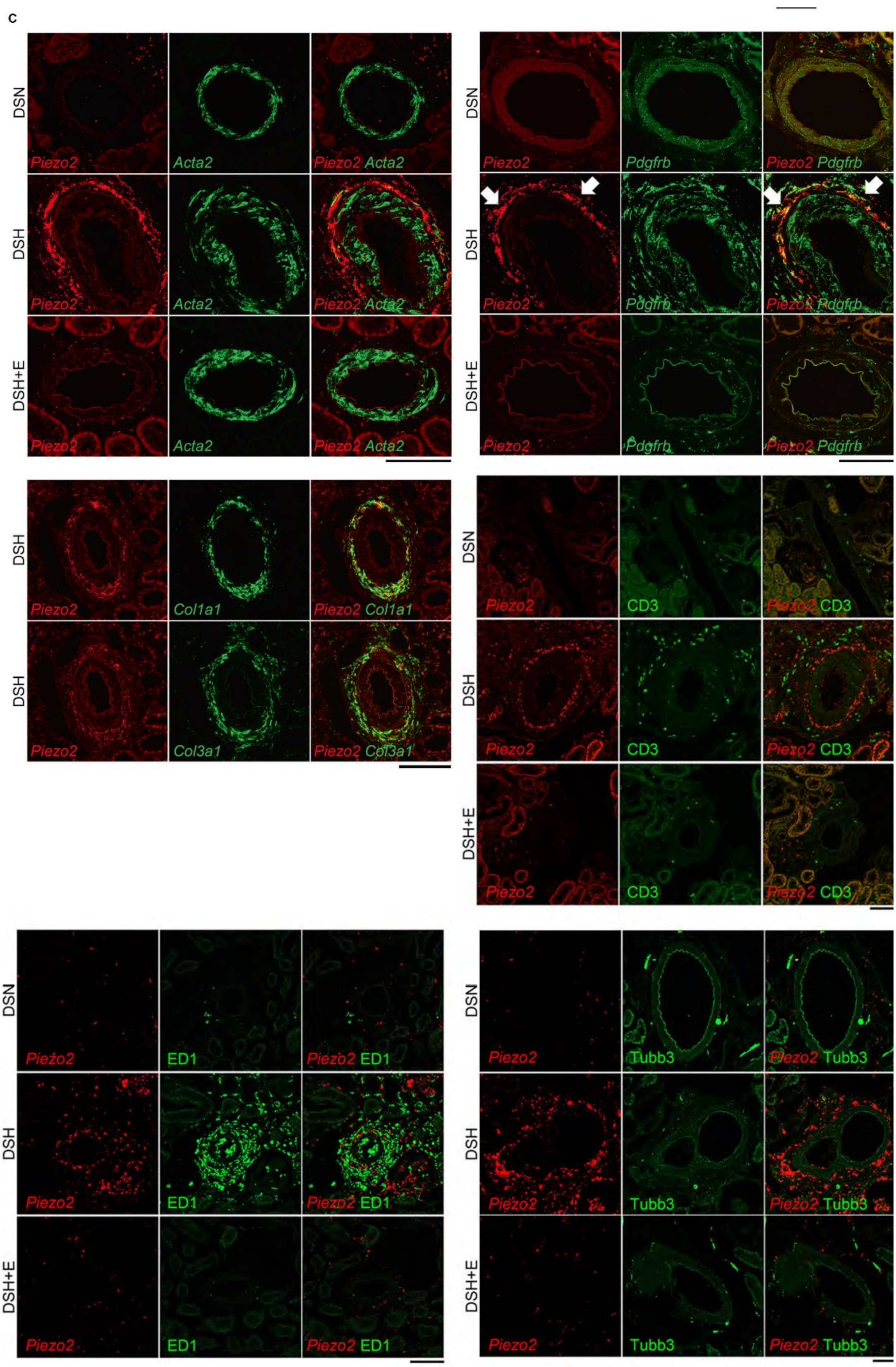

Fig. 1C 食塩負荷雄性 Dahl-S ラットの腎臓における Piezo2 発現の増加と血管周囲 Piezo2 陽性細胞の同定

Dahl 食塩感受性ラットを通常食(DSN)，8%NaCl(DSH)，降圧薬を混餌した 8%NaCl(DSH+Esax)にて 6 週間飼育した。

C. 血管周囲 Piezo2 陽性細胞は Pdgfrb 陽性・Col1a1 陽性・Col3a1 陽性であった。筋線維芽細胞マーカー(Acta2)陽性，T 細胞マーカー(CD3)陰性，マクロファージマーカー(ED1)陰性，神経マーカー(Tubb3)陰性であった。

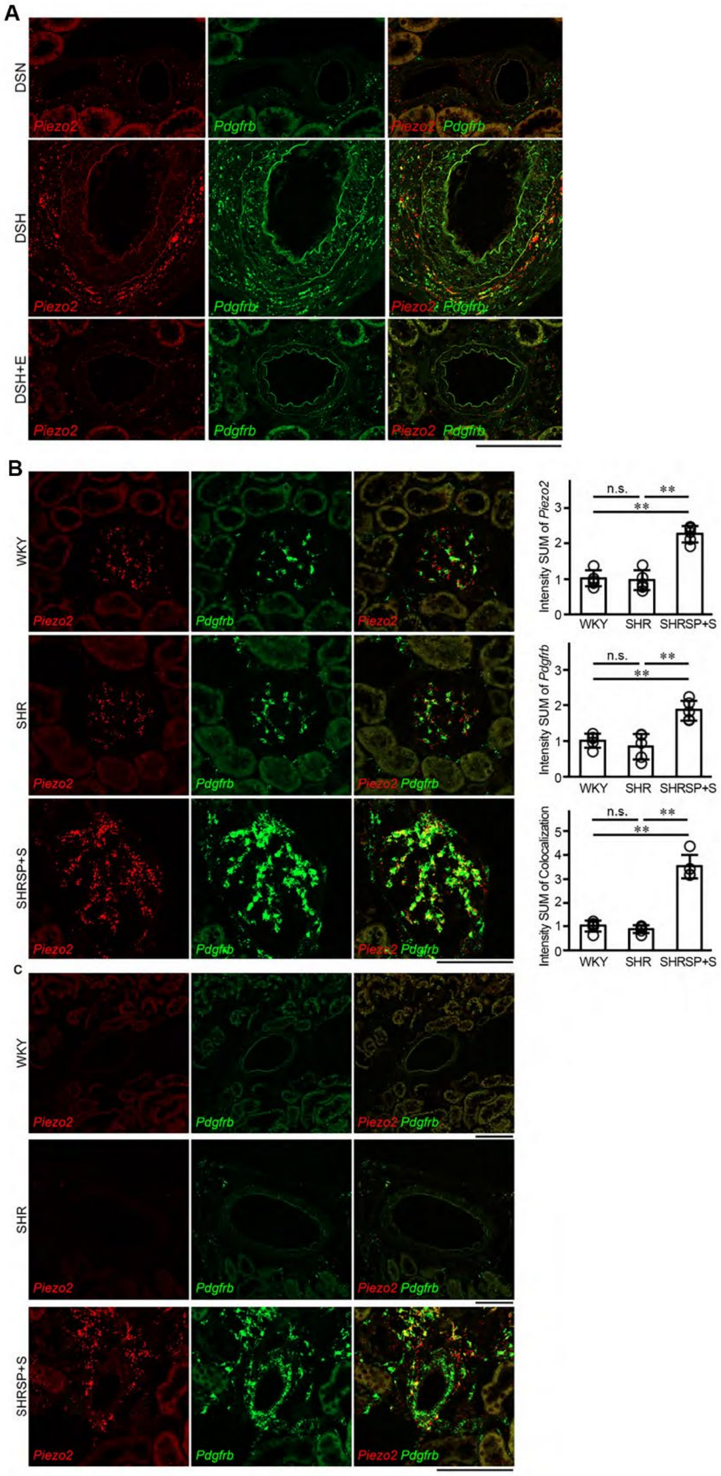

Fig. 2 食塩負荷雄性 Dahl-S ラットと食塩負荷脳卒中易発高血圧自然発症ラット（SHRSP-S）の腎臓における血管周囲 Piezo2 陽性細胞の同定

雄性 Dahl 食塩感受性ラットを通常食（DSN），8%NaCl（DSH），降圧薬を混餌した 8%NaCl（DSH+Esax）にて 6 週間飼育した。SHRSP を 8%NaCl（DSH）にて 5 週間飼育した。

A. Piezo2 発現を RNAscope *in situ* hybridisation 法で検出したところ，DSH 群では血管周囲に Piezo2 陽性シグナルを認め，これらは Pdgfrb 陽性であった。

B. SHRSP-S においても血管周囲 Piezo2 陽性シグナルは Pdgfrb 陽性であった。対照の WKY や SHR では血管周囲に Piezo2 シグナルは見られなかった。

３．２ UUO モデルにおける腎線維化の評価と Piezo2 発現

腎線維化における Piezo2 の役割を検討するために，食塩感受性高血圧モデルではないが，腎線維化のモデルとして頻用されるマウス UUO マウスモデルを作製し，線維化部位での Piezo2 発現変化，ならびに各マーカーの発現変化を検討した。

C57BL/6J マウスの左尿管を結紮し（UUO 群），7 日後，14 日後に左腎の変化を解析した。対照としては，sham 群の腎ないし UUO 群の対側腎（尿管非結紮側である右腎）を用いた。左尿管結紮 14 日後に左腎臓は外見上，水腎症を呈していた（**Fig. 3A**）。

腎病理組織に MT 染色を施し，UUO 群の腎線維化の程度を解析した。sham 群では血管中膜平滑筋周囲の外膜部分に淡青色の染色が認められたが，UUO 群 day 7 では間質に青い染色が認められた。day 14 には腎組織は菲薄化し，青染色はさらに増強していた（**Fig. 3B**）。

３．３ UUO モデルにおける Piezo2 発現

腎組織から抽出した RNA を用いて qPCR にて *Piezo2* mRNA を定量解析したところ，Piezo2 発現量は day 7 で 4 倍以上に，day 14 で 8 倍以上に亢進した（**Fig. 3C**）。実際に線維化マーカーとして，day 7 では Collagen 1 の発現が 10 倍近く増加しており，Pdgfrb や Tgfb1 の発現も有意に増加していた（**Fig. 3D**）。

RNAscope ISH を用いて Piezo2 の発現部位と強度を解析した。control（右腎）では糸球体領域に発現は限局していたが，UUO day 7 では間質に発現が広く認められ day 14 には間質での発現がさらに増強した（**Fig. 3E**）。

３．４ UUO モデルにおける Piezo2 発現細胞の特定

UUO モデルで間質に存在する Piezo2 陽性細胞がどのような細胞かを解析するために，RNAscope ISH を用いて，Piezo2 と各種線維化関連分子の二重染色を行った。

UUO モデルで発現誘導された Piezo2 は，糸球体や血管の外部に存在し，尿細管や集合管のマーカーとも共局在せず，間質に存在する細胞と考えられた。これら細胞の多くは Pdgfrb 陽性・Col1a1 陽性の線維芽細胞と考えられた。マクロファージマーカー（CD68）ともほとんど共局在しなかった。Piezo2 陽性細胞の多くは Acta2 陰性であり，筋線維芽細胞ではなく線維芽細胞であると考えられた。最近，reparative な線維化に関与することが提唱されている Meflin との二重染色を行ったところ，多くの細胞は共局在する細胞が多く認められた。

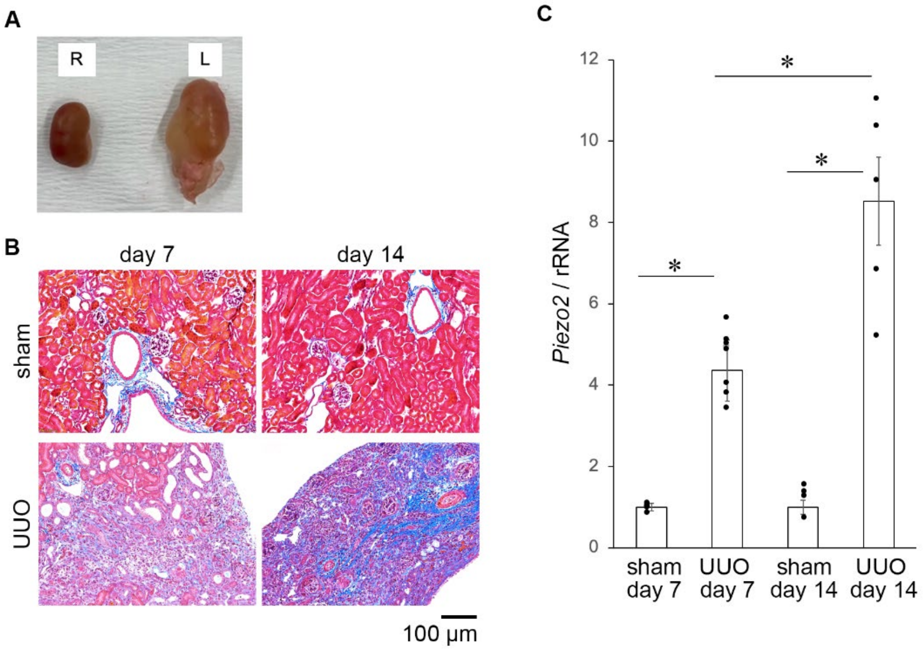

Fig. 3A, B, C UUO モデルにおける腎線維化と Piezo 発現

A. UUO モデル　day 14 の左腎は水腎症をていしていた。
B. マッソントリクローム（MT）染色による腎線維化の評価。
C. sham 群と UUO　day 7 群，UUO　day 14 群における *Piezo2* mRNA 発現の定量解析。* $P < 0.05$。

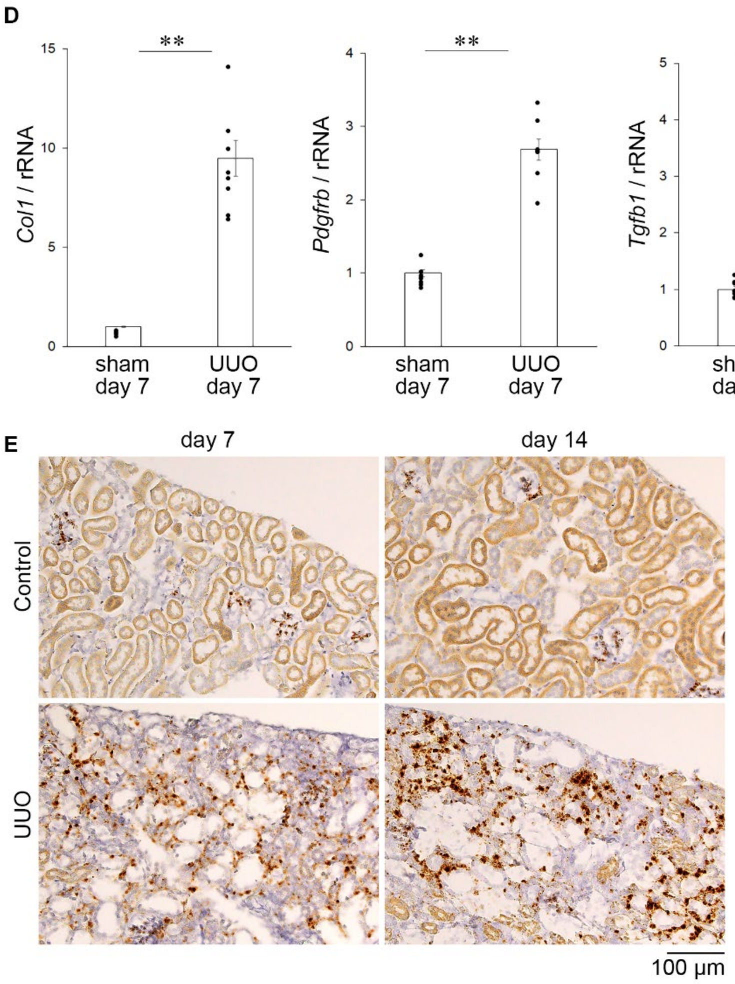

Fig. 3D, E UUO モデルにおける腎線維化と Piezo 発現

D.　sham 群と UUO　day 7 群における線維化関連因子の遺伝子解析。** $P < 0.01$。

E.　RNAscope *in situ* hybridisation による *Piezo2* mRNA 発現局在解析。

4.　考察

Piezo2 は Piezo1 とともに 2010 年に発見されたメカノセンサーである [11]。Piezo1 が血管内皮細胞をはじめ，全身の様々な細胞に発現するのに対して，Piezo2 の発現はかなり限局しており，感覚細胞や感覚神経，骨・軟骨組織，圧受容器反射や肺呼吸や排尿による伸展を感知する細胞，性感覚を感知する細胞などに発現することが報告されている [16]。私のグループでは最近，腎臓において Piezo1 は様々な細胞に広範に発現しているのに対し [17]，Piezo2 は糸球体メサンギウム細胞とレニン産生細胞に限局して発現していること，糸球体の血行動態の変化で Piezo2 の発現レベルが調節されていることを報告した [12, 18]。

腎線維化については，UUO モデルを用いて，メサンギウム細胞や尿細管細胞，マクロファージに発現する Piezo1 が腎線維化に病的に関与することが報告されている [19-21]。我々は，食塩誘発性腎線維化病変で見られる血管周囲の細胞に Piezo2 が高発現することを見出した [18]。さらに，腎線維化モデルとして頻用される UUO モデルの間質に出現する線維芽細胞にも Piezo2 が発現していることを見出した。このことから，慢性腎臓病から末期腎不全に移行する過程における腎線維化のメカニズムに Piezo2 シグナリングが深く関わっている可能性が示唆された。

5.　今後の課題

現在，細胞特異的 Piezo2 KO マウスを用いて，腎表現型を解析中である。血管周囲や間質の Piezo2 陽性線維芽細胞が，腎線維化にどのような役割を果たしているか，そのシグナル経路も含めて今後明らかにしたいと考えている。

6．文 献

1 Nagase, M, Shibata, S, Yoshida, S, Nagase, T, Gotoda, TFujita, T. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* **47**, 1084-1093, doi:10.1161/01.hyp.0000222003.28517.99 (2006).

2 Nagase, M, Yoshida, S, Shibata, S, Nagase, T, Gotoda, T, Ando, KFujita, T. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol* **17**, 3438-3446, doi:10.1681/asn.2006080944 (2006).

3 Shibata, S, Nagase, M, Yoshida, S, Kawachi, HFujita, T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* **49**, 355-364, doi:10.1161/01.HYP.0000255636.11931.a2 (2007).

4 Nagase, M, Matsui, H, Shibata, S, Gotoda, TFujita, T. Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. *Hypertension* **50**, 877-883, doi:10.1161/hypertensionaha.107.091058 (2007).

5 Matsui, H, Ando, K, Kawarazaki, H, Nagae, A, Fujita, M, Shimosawa, T, Nagase, MFujita, T. Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension* **52**, 287-294, doi:10.1161/hypertensionaha.108.111815 (2008).

6 Shibata, S, Nagase, M, Yoshida, S, Kawarazaki, W, Kurihara, H, Tanaka, H, Miyoshi, J, Takai, YFujita, T. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* **14**, 1370-1376, doi:10.1038/nm.1879 (2008).

7 Shibata, S, Mu, S, Kawarazaki, H, Muraoka, K, Ishizawa, K, Yoshida, S, Kawarazaki, W, Takeuchi, M, Ayuzawa, N, Miyoshi, J, Takai, Y, Ishikawa, A, Shimosawa, T, Ando, K, Nagase, MFujita, T. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J Clin Invest* **121**, 3233-3243, doi:10.1172/jci43124 (2011).

8 Nagase, M, Ayuzawa, N, Kawarazaki, W, Ishizawa, K, Ueda, K, Yoshida, SFujita, T. Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. *Hypertension* **59**, 500-506, doi:10.1161/hypertensionaha.111.185520 (2012).

9 Kawarazaki, W, Nagase, M, Yoshida, S, Takeuchi, M, Ishizawa, K, Ayuzawa, N, Ueda, KFujita, T. Angiotensin II- and salt-induced kidney injury through Rac1-mediated mineralocorticoid receptor activation. *J Am Soc Nephrol* **23**, 997-1007, doi:10.1681/asn.2011070734 (2012).

10 Yoshida, S, Ishizawa, K, Ayuzawa, N, Ueda, K, Takeuchi, M, Kawarazaki, W, Fujita, TNagase, M. Local mineralocorticoid receptor activation and the role of Rac1 in obesity-related diabetic kidney disease. *Nephron Exp Nephrol* **126**, 16-24, doi:10.1159/000358758 (2014).

11 Coste, B, Mathur, J, Schmidt, M, Earley, TJ, Ranade, S, Petrus, MJ, Dubin, AEPatapoutian, A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* **330**, 55-60, doi:10.1126/science.1193270 (2010).

12 Mochida, Y, Ochiai, K, Nagase, T, Nonomura, K, Akimoto, Y, Fukuhara, H, Sakai, T, Matsumura, G, Yamaguchi, YNagase, M. Piezo2 expression and its alteration by mechanical forces in mouse mesangial cells and renin-producing cells. *Sci Rep* **12**, 4197, doi:10.1038/s41598-022-07987-7 (2022).

13 Shaw, I, Rider, S, Mullins, J, Hughes, JPéault, B. Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol* **14**, 521-534, doi:10.1038/s41581-018-0032-4 (2018).

14 Kramann, R, Schneider, RK, DiRocco, DP, Machado, F, Fleig, S, Bondzie, PA, Henderson, JM, Ebert, BLHumphreys, BD. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* **16**, 51-66, doi:10.1016/j.stem.2014.11.004 (2015).

15 Minatoguchi, S, Saito, S, Furuhashi, K, Sawa, Y, Okazaki, M, Shimamura, Y, Kaihan, AB, Hashimoto, Y,

Yasuda, Y, Hara, A, Mizutani, Y, Ando, R, Kato, N, Ishimoto, T, Tsuboi, N, Esaki, N, Matsuyama, M, Shiraki, Y, Kobayashi, H, Asai, N, Enomoto, AMaruyama, S. A novel renal perivascular mesenchymal cell subset gives rise to fibroblasts distinct from classic myofibroblasts. *Sci Rep* **12**, 5389, doi:10.1038/s41598-022-09331-5 (2022).

16 Nagase, TNagase, M. Piezo ion channels: long-sought-after mechanosensors mediating hypertension and hypertensive nephropathy. *Hypertens Res*, in press, doi:10.1038/s41440-023-01219-9 (2024).

17 Ogino, S, Yoshikawa, K, Nagase, T, Mikami, KNagase, M. Roles of the mechanosensitive ion channel Piezo1 in the renal podocyte injury of experimental hypertensive nephropathy. *Hypertens Res* **47**, 747-759, doi:10.1038/s41440-023-01536-z (2024).

18 Ochiai, K, Mochida, Y, Nagase, T, Fukuhara, H, Yamaguchi, YNagase, M. Upregulation of Piezo2 in the mesangial, renin, and perivascular mesenchymal cells of the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rats and its reversal by esaxerenone. *Hypertens Res* **46**, 1234-1246, doi:10.1038/s41440-023-01219-9 (2023).

19 Fu, Y, Wan, P, Zhang, J, Li, X, Xing, J, Zou, Y, Wang, K, Peng, H, Zhu, Q, Cao, LZhai, X. Targeting Mechanosensitive Piezo1 Alleviated Renal Fibrosis Through p38MAPK-YAP Pathway. *Front Cell Dev Biol* **9**, 741060, doi:10.3389/fcell.2021.741060 (2021).

20 Zhao, X, Kong, Y, Liang, B, Xu, J, Lin, Y, Zhou, N, Li, J, Jiang, B, Cheng, J, Li, CWang, W. Mechanosensitive Piezo1 channels mediate renal fibrosis. *JCI Insight* **7**, doi:10.1172/jci.insight.152330 (2022).

21 He, Y, Deng, B, Liu, S, Luo, S, Ning, Y, Pan, X, Wan, R, Chen, Y, Zhang, Z, Jiang, J, Xu, H, Xia, MLi, J. Myeloid Piezo1 Deletion Protects Renal Fibrosis by Restraining Macrophage Infiltration and Activation. *Hypertension* **79**, 918-931, doi:10.1161/hypertensionaha.121.18750 (2022).

No. 2329

Role of Mechanosensitive Ion Channel Piezo2 in the Renal Fibrosis of Salt-Sensitive Hypertension

Miki Nagase

Kyorin University School of Medicine

Summary

Mechanical overload, such as high pressure, stretch, and shear stress, is important in the pathogenesis of hypertensive target organ damage. We reported that a mechanosensor Piezo2 was expressed exclusively in the glomerular mesangial cells and renin-producing cells in normal mouse kidneys, and that Piezo2 expression was increased in the salt-induced hypertensive nephrosclerosis models, in αSMA-negative, Col1-positive perivascular fibroblasts. The purpose of this study was to investigate the role of Piezo2 in the renal fibrosis, especially in the fibrosis caused by excessive salt intake.

We created unilateral ureteral obstruction (UUO) mice and a left nephrectomy + subcutaneous aldosterone infusion + high salt diet model as renal fibrosis models. Cell-specific *Piezo2* KO mice were generated by crossing *Pdgfrb-CreER*$^{T2+/-}$ mice with *Piezo2*$^{FL/FL}$ mice to produce *Pdgfrb-CreER*^{T2}-positive *Piezo2* KO mice and *Pdgfrb-CreER*^{T2}-negative *Piezo2* WT mice, and administering tamoxifen intraperitoneally. Piezo2 expression levels were evaluated by qPCR and immunoblotting. Piezo2-expressing cells were identified by double staining with cell markers using RNAscope in situ hybridization.

In the UUO model created in wild-type mice, Piezo2 expression was significantly elevated. The increased Piezo2 was not localized in the tubular cells, but mainly in the interstitial cells. In double staining, *Piezo2* signals were colocalized with *Col1a1*, *Pdgfrb*, and *Meflin*, but not with *Acta2*. Initially, we could not obtain *Piezo2* KO mice, so we purchased different mouse strain and successfully obtained offsprings. We are currently analyzing the renal phenotype of *Piezo2* KO mice.

Meflin-positive fibroblast is a cell subpopulation that does not differentiate into myofibroblast and acts renoprotectively, suggesting that fibrosis caused by Piezo2-positive fibroblasts may also be involved in reparative fibrosis. We hope to verify this working hypothesis by analyzing *Piezo2* KO mice.