

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（S）
 研究期間：2004～2008
 課題番号：16109005
 研究課題名（和文）糸球体硬化症

研究課題名（英文）glomerular sclerosis

研究代表者

市川 家國（ICHIKAWA IEKUNI）
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号：80317768

研究成果の概要：慢性腎臓病は国民健康上の大きな問題であるが、腎臓のポドサイトという細胞の傷害が鍵になっている。ポドサイトは生後に増殖する事なく、一度失われると補充される事はない。我々は、ポドサイトの増加を新たな治療の方向性として、生体内でポドサイトの増殖を誘導させる実験を行った。その結果、ポドサイトの増殖は、脱分化とは不可分ではなく、可能である事を示した。また、多くの腎臓病において、ポドサイトの傷害の後、尿細管傷害が続発するが、その過程において、megalin によるタンパク質の再吸収が関与する事を明らかにした。さらに、Angiotensin II が腎臓病を増悪させるが、その機序を明らかにし、また Angiotensin の産生経路に新たな発見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2005年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2006年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
2007年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
2008年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
総計	82,600,000	24,780,000	107,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：ポドサイト、慢性腎不全、細胞周期、レニン・アンジオテンシン

1. 研究開始当初の背景

国民健康上の大きな問題である慢性腎不全は、糸球体硬化症を特徴とする。我々および他の研究者の研究により、糸球体硬化症はポドサイトという糸球体の細胞の傷害を原因とする事が明らかになった。ポドサイトとは、たこ足細胞の別名が示すごとく、多数の突起をもち、それらの突起は糸球体毛細血管の表面を被って、濾過の障壁として機能する。

ポドサイトは、生後に増殖する事無く、したがって一度失われると新たに補充される事がない。またポドサイトに始まった傷害は、他の糸球体細胞、および糸球体外に自動拡大するという性質を持っている。これらのポドサイトの性質が、慢性腎不全が治療しえない最大の要因となっていると考えられている。アンジオテンシン II の阻害剤が不十分ながら慢性腎不全の進行を遅らせるが、それ以上の有効な治療法は存在しない。

2. 研究の目的

ポドサイトの傷害に起因する糸球体硬化症の治療をめざし、以下を主な目的として、研究を行った。

- (1) 本来増殖不可能なポドサイトを、生体内で増殖させる事ができるモデルマウスを作製する。それをを用いて、正常なポドサイトを増加させる事ができるかどうかを検討する。これらは、ポドサイトの数を増加させる事により、慢性腎不全の治療をめざす、夢の根本的治療法の第一歩である。
- (2) ポドサイト傷害時に、多量の大分子血漿蛋白質が尿に漏出し、引き続いて尿細管傷害が起こる。大分子蛋白質の尿細管細胞への再吸収を阻止する事により、二次性尿細管傷害を防止可能かどうか検証する。
- (3) 我々の開発したポドサイト傷害モデル (NEP25) マウスに AT1 阻害剤を投与すると、劇的に糸球体硬化症が軽減した。この機序を明らかにする。
- (4) アンジオテンシン II の腎臓内での産生機序を明らかにする。

3. 研究の方法

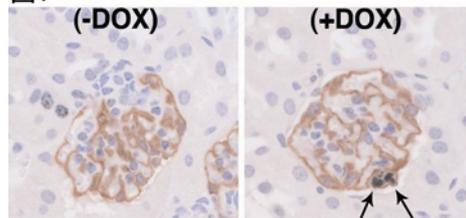
- (1) Cyclin kinase inhibitor p21 の欠失、SV40 T 抗原の発現、BMP4 の過剰発現のいずれかの状態を示すマウスを作成し、ポドサイトの増殖を起こす事を試みる。申請時に知られていたポドサイトの増殖をきたす状態は、常に激しい傷害を伴うので、傷害を起こさずにポドサイトを増殖させる方法を模索する。
- (2) 尿細管で蛋白質再吸収に関与するメガリンを欠失させたマウスを作製し、ポドサイト傷害を誘導し、メガリン欠失尿細管が、傷害から保護されるか否か解析する。
- (3) ポドサイトで特異的にアンジオテンシン II の受容体(AT1)を欠損するマウスを作製し、それにポドサイト傷害を誘導し、AT1 ノックアウト(KO)ポドサイトが傷害から保護されるか否か検証する。
- (4) アンジオテンシン II の前駆蛋白質であるアンジオテンシノゲンの遺伝子を、尿細管特異的、あるいは肝臓特異的に欠損したマウスを作製し、それぞれの部位由来のアンジオテンシン II の意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1)

- ① p21 KO マウスに腎炎を誘発した。あたかもポドサイトが増殖したかのような虚脱型腎症を示した。ポドサイトを遺伝的に標識すると、増殖細胞はポドサイト由来ではなく、ポーマン囊上皮由来である事が判明した。
- ② BMP4 をポドサイトで過剰発現するマウスを作製した。研究開始時の予想とは異なり、ポドサイトの数は変わらなかった。しかし、この研究から BMP の精緻な発現調節が、正常な糸球体の形成に必須であり、それには VEGF が関与する事がわかった。
- ③ 上記 2 つの研究は、それ自体重要で興味深い結果であったが、本来のポドサイトを増やすという目的に適うものではなかった。それらと平行して、ドキシサイクリン (DOX) 投与時のみ、ポドサイト特異的に SV40T を発現するマウス (SV40T/rtTA) を開発した。このマウスに DOX を投与すると、ポドサイトが増殖した (図 1)。短期間の DOX 投与では、ポドサイトは正常であったが、2 週間以上の DOX 投与によりポドサイトは傷害された。短期間の DOX 投与を完結的に繰り返す事により、正常なポドサイトの数を約 10% 増加させる事ができた。

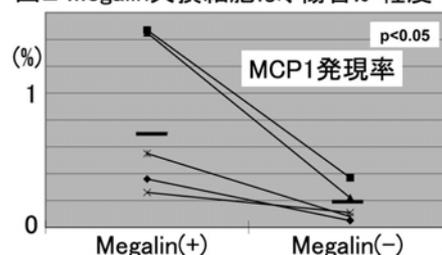
図 1



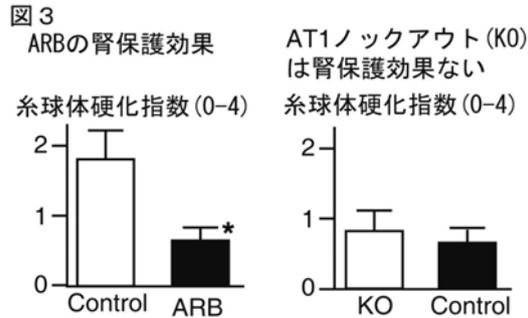
DOX 投与により (右パネル)、ポドサイト (茶色) に増殖マーカー Ki67 (紫、矢印) が発現した。

- (2) 尿細管特異的メガリン KO マウスとポドサイト傷害モデルマウス (NEP25) を用いた研究の結果、ポドサイト傷害時に尿細管腔に多量の漏出する大分子血漿蛋白質は、メガリンを介して、近位尿細管に取りこまれ、それが二次性尿細管傷害の原因になる事を明らかにした (図 2)。

図 2 Megalin欠損細胞は、傷害が軽度



- (3) ポドサイト特異的AT1ノックアウトマウスの作製に成功した。これにNEP25マウスを交配して、ポドサイト傷害を誘導した。ポドサイト傷害の程度は、ポドサイトのAT1の有無に無関係であった(図3)。この事は、AT1阻害の治療効果はポドサイト以外の細胞に作用して、ポドサイトを保護する事を示している。



- (4) 腎臓特異的および肝臓特異的アンジオテンシノゲン欠損マウスの解析の結果、腎臓内アンジオテンシノゲン蛋白質は、もっぱら肝臓に起源し、糸球体で濾過され、尿細管に再吸収される事が明らかにされた。流血中のアンジオテンシン IIが主にレニン活性により調節されるのに対して、腎臓内アンジオテンシン IIは、尿腔内に供給されるアンジオテンシノゲン蛋白質量に依存し、糸球体のバリア能力の影響をうける事が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

- (1) Suzuki T, Matsusaka T, Nakayama M, Asano T, Watanabe T, Ichikawa I, Nagata M. Genetic Podocyte Lineage Reveals Progressive Podocytopenia with Prietal Cell Hyperplasia in a Murine Model of Cellular/Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 2009;174(5):(in press) (査読有)
- (2) Motojima M, Matsusaka T, Kon V, Ichikawa I. Fibrinogen That Appear in the Bowman's Space of Proteinuric Kidneys in vivo Activates Podocyte Toll-like Receptor 2 and 4 in vitro. *Nephron Experimental.* 2009 (in press) (査読有)
- (3) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S, Ichikawa I. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int.* 2008;74(10):1262-1269. (査読有)
- (4) Ueda H, Miyazaki Y, Matsusaka T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Ichikawa I. Bmp in podocytes is essential for normal glomerular capillary formation. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(4):685-694. (査読有)
- (5) Suganuma E, Babaev VR, Motojima M, Zuo Y, Ayabe N, Fogo AB, Ichikawa I, Linton MF, Fazio S, Kon V. Angiotensin inhibition decreases progression of advanced atherosclerosis and stabilizes established atherosclerotic plaques. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2311-2319. (査読有)
- (6) Zuo Y, Matsusaka T, Zhong J, Ma J, Ma LJ, Hanna Z, Jolicœur P, Fogo AB, Ichikawa I. HIV-1 genes vpr and nef synergistically damage podocytes, leading to glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 17(10): 2832-2843, 2006. (査読有)
- (7) Niimura F, Kon V, Ichikawa I. The renin-angiotensin system in the development of the congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Curr Opin Pediatr.* 2006 Apr;18(2):161-6. (査読無)
- (8) Miyazaki Y, Ueda H, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T. Inhibition of endogenous BMP in the glomerulus leads to mesangial matrix expansion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2): 681-688. (査読有)
- (9) Ueda H, Miyazaki Y, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T. A role of BMP in the development of glomerular sclerosis. *Nephrology (Carlton).* 2005;10 Supple6:A444. (査読無)
- (10) Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(3): 205-210. (査読無)
- (11) Matsusaka T, Xin J, Niwa S, Kobayashi K, Akatsuka A, Hashizume H, Wang QC, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Genetic engineering of glomerular

sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. J Am Soc Nephrol. 2005;16(4): 1013-1023. (査読有)

- (12) Asano T, Niimura F, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I, Matsusaka T. Permanent genetic tagging of podocytes: fate of injured podocytes in a mouse model of glomerular sclerosis. J Am Soc Nephrol. 2005;16(8): 2257-2262. (査読有)
- (13) Zhong J, Zuo Y, Ma J, Fogo AB, Jolicœur P, Ichikawa I, Matsusaka T. Expression of HIV-1 genes in podocytes alone can lead to the full spectrum of HIV-1-associated nephropathy. Kidney Int. 2005; 68(3): 1048-1060. (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

- (1) Niimura F, Matsusaka T, Asano T, Ichikawa I, Nishiyama A. Augmented Expression of Renal Angiotensinogen and Intrarenal Vascular Hypertrophy in Hypotensive Mice with Liver-Specific Inactivation of Angiotensinogen. American Society of Nephrology Renal Week 2008 Annual Meeting. November 4-9, 2008. Philadelphia.
- (2) Motojima M, Matsusaka T, Kon V, Ichikawa I. Nephin Gene Expression in Podocytes Is Regulated by Histone Acetylation. American Society of Nephrology Renal Week 2008 Annual Meeting. November 4-9, 2008. Philadelphia.
- (3) Matsusaka T, Niimura F, Asano T, Fogo A, Ichikawa I. Angiotensin II Receptor (AT1) Antagonist Protects Podocytes through Mechanism(s) Independent of AT1 on Podocytes. American Society of Nephrology Renal Week 2008 Annual Meeting. November 4-9, 2008. Philadelphia.
- (4) 鈴木大成、松阪泰二、浅野貴子、市川家國、長田道夫. p21欠損実験腎炎マウスにおける上皮増殖病変ポドサイトタグ付け遺伝子改変マウスによる解析～壁側上皮由来の増殖. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月30日-6月1日. 福岡.
- (5) 松阪泰二、市川家國. ポドサイトの修復と再生の可能性を求めて. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月30日-6月1日. 福岡.
- (6) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Willnow TE, Ichikawa I. Megalin Mediates Tubule Injury Induced by Proteinuria. American Society of Nephrology Renal Week 2007 Annual Meeting. November 2-5, 2007. San Francisco.
- (7) Suzuki S, Matsusaka T, Asano T, Ichikawa I, Nagata M. Nphs1-Cre/ROSA26-loxP Genetic Podocyte Tagging Revealed Parietal Cell Proliferation in p21 Deficient Mice with Experimental Glomerulonephritis. American Society of Nephrology Renal Week 2007 Annual Meeting. November 2-5, 2007. San Francisco.
- (8) Motojima M, Matsusaka T, Kon V, Ichikawa I. Identification of Activators of Nephin Gene Promoter. American Society of Nephrology Renal Week 2007 Annual Meeting. November 2-5, 2007. San Francisco.
- (9) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Ichikawa I. Megalin Mediates Tubular Injury Secondary to Glomerular Diseases. 14th Congress of the International Pediatric Nephrology Association. August 31 - September 4, 2007. Budapest.
- (10) 市川家國. 慢性腎臓病の非免疫学的進行機序に関する研究の流れと未来展望. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007年5月25日-27日. 浜松.
- (11) 元吉八重子、松阪泰二、市川家國. 糸球体傷害に続発する尿細管傷害にはmegalinによる蛋白質再吸収が関与する. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007年5月25日-27日. 浜松.
- (12) 松阪泰二、市川家國. 正常なポドサイトの数を増加させる事が可能である. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007年5月25日-27日. 浜松.
- (13) Matsusaka T, Ichikawa I, Kopp J. Experimental attempt to increase podocyte number in vivo. American Society of Nephrology Renal Week 2006 Annual Meeting. November 14-19, 2006. San Diego.
- (14) Motojima M, Matsusaka T, Ichikawa I. Toll-like receptors in podocytes

- modulate response to injury. American Society of Nephrology Renal Week 2006 Annual Meeting. November 14-19, 2006. San Diego.
- (15) 浅野貴子、市川家國、新村文男、松阪泰二. ポドサイトにおけるアンジオテンシンの役割. 第41回日本小児腎臓病学会学術集会. 2006年6月22日-24日. 名古屋.
- (16) 上田裕之、宮崎陽一、松阪泰二、宇都宮保典、川村哲也、細谷龍男、市川家國. BMP4の糸球体血管係蹄発生に対する調節機構. 第49回日本腎臓学会学術総会. 2006年6月14日-16日. 東京.
- (17) 松阪泰二、市川家國. ポドサイト再生の試み. 第49回日本腎臓学会学術総会. 2006年6月14日-16日. 東京.
- (18) Matsusaka T, Fogo A, Ichikawa I. Dual Effect of an α -Actinin-4 Gene Mutation on Podocyte Injury. American Society of Nephrology Renal Week 2005 Annual Meeting. November 10-13, 2005. Philadelphia.
- (19) 市川家國. 糸球体病変が進行性に転じる際の上皮障害の役割. 第35回日本腎臓学会東部学術集会. 2005年10月7日-8日. 新潟.
- (20) Matsusaka T, Fogo A, Pastan I, Ichikawa I. Interruption of Glomerular Filtration Interrupts the Pathogenic Pathway from Podocyte Injury to Glomerular Sclerosis. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 - November 1, 2004. Saint Louis.
- (21) Asano T, Matsusaka T, Fogo A, Ichikawa I. Identity of the Origin of Proliferating Visceral Epithelial Cells. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 - November 1, 2004. Saint Louis.
- (22) Ueda H, Miyazaki Y, Asano T, Matsusaka T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Ichikawa I. The Role of BMP4 in Glomerulogenesis and Nephrogenesis. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 - November 1, 2004. Saint Louis.
- (23) Ichikawa I. Analysis of Podocyte Injury Using Genetically Altered Mice. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 - November 1, 2004. Saint Louis.
- (24) Zuo Y, Zhong J, Ma J, Fogo AB, Ichikawa I, Matsusaka T. HIV-1 genes vpr and nef synergistically cause podocyte injury. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 - November 1, 2004. Saint Louis.
- (25) 松阪泰二、市川家國. Podocyte傷害と腎硬化. 第47回日本腎臓学会学術総会. 2004年5月27日-29日. 宇都宮.
- (26) 浅野貴子、松阪泰二、新村文男、市川家國. 傷害を受けたpodocyteの運命の追跡. 第47回日本腎臓学会学術総会. 2004年5月27日-29日. 宇都宮.
- (27) 上田裕之、宮崎陽一、浅野貴子、松阪泰二、宇都宮保典、川村哲也、細谷龍男、市川家國. BMP4による糸球体形態形成の調節機構. 第47回日本腎臓学会学術総会. 2004年5月27日-29日. 宇都宮.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 家國 (ICHIKAWA IEKUNI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：80317768

(2) 研究分担者

松阪 泰二 (MATSUSAKA TAIJI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：50317749
新村 文男 (NIIMURA FUMIO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30282750
長田 道夫 (NAGATA MICHIO)
筑波大学・基礎医学系・教授
研究者番号：10192238

(3) 連携研究者

本島 英 (MOTOJIMA MASARU)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：80468636