

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10154

研究課題名（和文）ポドサイトのミトコンドリア機能を標的としたネフローゼ症候群の新規治療戦略の構築

研究課題名（英文）Establishment of novel therapeutic strategy for nephrotic syndrome targeting mitochondrial function in podocytes

研究代表者

阿部 祥英（Abe, Yoshifusa）

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：10384447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題遂行のため、I. マウスポドサイトを用いたミトコンドリア機能変化に関する基礎的研究、II. ステロイド感受性ネフローゼ症候群患児における血清アディポネクチン（ADPN）の推移、III. 慢性腎臓病に対するCoQ10の腎保護作用に関するSystematic Review（SR）に取り組んだ。Iでは、ミトコンドリア機能を亢進させるTGF-beta1の作用を免疫抑制薬のミゾリピンが細胞傷害なく抑制することを明らかにした。IIでは、ステロイド感受性ネフローゼ症候群の発症時に血清ADPNが増加し、その分画の比率が変動することを明らかにした。IIIでは、SRのプロトコルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディポネクチン（ADPN）にはミトコンドリア機能の改善作用があることが知られている。ネフローゼ症候群の発症時に確認されたADPNの増加は、本疾患にミトコンドリア機能変化が関与することを示唆する。また、ネフローゼ症候群に対して実際に使用される免疫抑制薬のミゾリピンに、ミトコンドリア機能の調整作用があることが示唆され、新規作用を見出した可能性がある。本研究で得られた知見により、ネフローゼ症候群とミトコンドリア機能の関連性がこれまで知られていた以上に明らかになったと判断する。

研究成果の概要（英文）：To carry out the research project, we worked on three subjects as follows; I. Basic research on mitochondrial function alteration in mouse podocytes, II. Changes in serum adiponectin (ADPN) in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome, III. Systematic Review (SR) on the renoprotective effects of CoQ10 on chronic kidney disease.

In subject I, it was clarified that mizoribine, an immunosuppressive drug, inhibited TGF-beta1-stimulated mitochondrial function in mouse podocytes without cytotoxicity. In subject II, it was clarified that total serum ADPN levels increase at the onset of nephrotic syndrome, and the ratio of ADPN isoforms changes during the course of the disease. In subject III, SR protocol was described.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：ネフローゼ症候群 podocyte ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

1) ネフローゼ症候群発症の原因

リンパ球の機能異常、スリット膜の異常、ポドサイトの骨格傷害、遺伝子異常がネフローゼ症候群の発症に関与する。特に、先天性およびステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の解析により、約 30 種類の原因遺伝子が同定されたが、遺伝診断率は約 30%にすぎない。つまり、遺伝子解析の成果を加えても、ネフローゼ症候群の発症メカニズムは全容が解明されたわけではない。

2) ネフローゼ症候群におけるミトコンドリアの関与

てんかんや発達遅滞を合併するステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因遺伝子にミトコンドリアと関連するもの (*COQ2*, *COQ6*, *PDSS2* など) がある。さらに、ステロイド治療前後における血漿中の活性酸素がネフローゼ症候群の再発頻度と関連する。病理学的検討や遺伝子解析により、腎疾患におけるミトコンドリアの形態異常の解析は進んでいる。しかし、遺伝子異常のない特発性ネフローゼ症候群においてミトコンドリア機能の変化に着目し、ミトコンドリアが産生する活性酸素と発症のメカニズムを臨床的に結びつけた検討はない。

2. 研究の目的

細胞のエネルギー代謝経路を無侵襲・高感度に経時的計測できるミトコンドリア機能分析器を用い、ミトコンドリアの機能異常と活性酸素産生の観点からネフローゼ症候群の新規発症メカニズムを解明する。また、免疫抑制薬や抗サイトカイン薬によるミトコンドリアの機能改善がネフローゼ症候群の新たな治療戦略になることを呈示する。さらに、ミトコンドリア機能障害や活性酸素産生の軽減作用を有する Coenzyme Q10 に蛋白尿軽減の作用があるか、Systematic Review を行ってエビデンスを構築する。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するにあたり、以下の 3 方面 (I~III) で取り組んだ。

I. 細胞を用いた基礎研究

ネフローゼ症候群の治療薬として用いられる免疫抑制薬のミゾリピン (MZR) がポドサイトのミトコンドリア機能に変化を与えるかを検証するため、以下の A と B を検討した。

A. MZR の尿中濃度と基礎研究で使用される MZR 濃度との差異

細胞実験に使用する MZR 濃度が人体で作用する濃度と差異がないかを確認するため、小児期発症腎疾患患者 (26 名) における MZR 投与量と尿中濃度の関連性を評価した。

B. TGF- β 1 (TGF) が惹起するポドサイト障害に対する MZR の抑制効果

培養マウスポドサイトを用い、TGF によって惹起される既知のポドサイト障害を MZR (0.5~500 μ g/mL) が抑制するかを評価した。

II. ネフローゼ症候群患児における血清アディポネクチンの推移

ミトコンドリアに作用し、その機能改善に関与する物質であるアディポネクチン (ADPN) に着目し、以下の A と B を検討した。

A. ステロイド感受性ネフローゼ症候群の各病期における血清 ADPN とその分画の推移

対象は初発のステロイド感受性ネフローゼ症候群患児 (31 名) と対照児 (51 名) である。ネフローゼ症候群患児の発症時、寛解直後、寛解期における血清 ADPN 値とその分画 [高分子量 (HMW)、中分子量 (MMW)、低分子量 (LMW)] の比率がどのように推移するかを対照群と比較した。

B. ステロイド感受性ネフローゼ症候群における血清 ADPN 増加の誘因

前述のように、初発のステロイド感受性ネフローゼ症候群患児 (NS) で ADPN や高分子量 ADPN (HMW-ADPN) が病期によって変動することを見出した。しかし、ネフローゼ症候群に伴う著明な蛋白尿、低アルブミン (Alb) 血症、高脂血症のいずれが ADPN 増加の誘因になっているかは不明であり、誘因を特定できないか検討した。

対象は、対照群 (50 例)、NS 群 (35 例)、低 Alb 群 (9 例)、高脂血症群 (5 例) の 4 群である。統計学的検討には Kruskal-Wallis test を用いた。

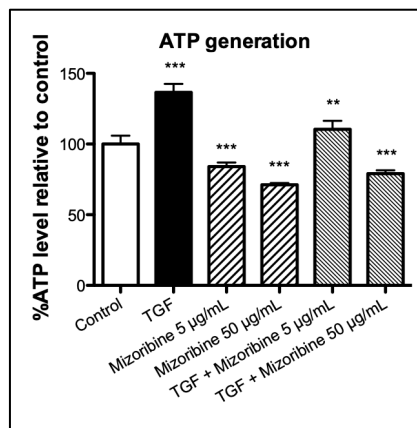
III. 慢性腎臓病に対する CoQ10 の腎保護作用に関する Systematic Review

蛋白尿を生じる慢性腎臓病を対象に、Coenzyme Q10 投与が腎機能や蛋白尿を改善させるか、Systematic Review を行うために必要な文献検索式を作成した。

4. 研究成果

A. MZR の尿中濃度と基礎研究で使用される MZR 濃度との差異

得られた主なパラメータは、平均投与量 5.5 ± 3.6 mg において、最高血中濃度 (Cmax) 2.0 ± 1.3 $\mu\text{g/mL}$ 、尿中濃度 114.6 ± 116.3 ($\mu\text{g/mL}$) であった。つまり、尿中濃度は Cmax の約 50 倍であり、基礎研究で使用される MZR 濃度 (50 $\mu\text{g/mL}$) と同等であった。ポドサイトは尿中濃度と同等の MZR に曝露される可能性があり、既報の基礎研究との乖離はないと判断される。



B. TGF-beta1 (TGF) が惹起するポドサイト障害に対する MZR の抑制効果

以下の 4 つの知見を得た。

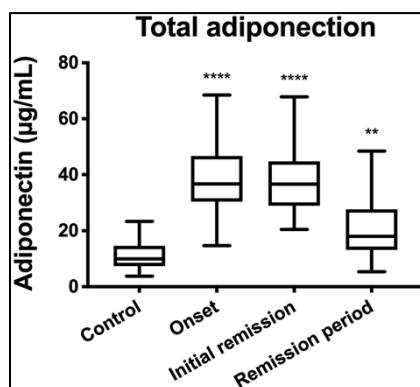
- MZR は濃度依存性にマウスポドサイトの ATP 産生を抑制し、TGF による増加も抑制する (右図、未発表データ)。
- MZR は細胞毒性を有さない。
- MZR 単独ではミトコンドリア膜電位、酸素消費速度 (OCR)、細胞外酸性化速度 (ECAR) に影響しないが、TGF が与える変化は抑制する。
- MZR は活性酸素 (ROS) の産生やアポトーシスを抑制しない。

よって、MZR がポドサイトのミトコンドリア機能や嫌氣的解糖に変化を与えるが、MZR 単独では OCR、ECAR、ROS 産生、アポトーシスに影響せず、TGF が与える変化にのみ抑制効果を有することが示された。

II. ネフローゼ症候群患児における血清アディポネクチンの推移

A. ステロイド感受性ネフローゼ症候群の各病期における血清 ADPN とその分画の推移

患児群における発症時、寛解直後、寛解期の血清総 ADPN の中央値は、それぞれ 36.7 $\mu\text{g/mL}$ 、36.7 $\mu\text{g/mL}$ 、20.2 $\mu\text{g/mL}$ で、対照群に比し、ネフローゼ症候群患児の発症時と蛋白尿消失直後の総 ADPN 値は約 3 倍に上昇していた。患児群における総 ADPN に対する高分子量、中分子量、低分子量の比率 (それぞれ %HMW、%MMW、%LMW) の中央値は、発症時 56.9/27.0/14.1、寛解直後 62.0/21.8/13.4、寛解期 58.1/21.7/17.5 であった (右図)。対照群と比較し、寛解直後の %HMW と発症時の %MMW は高値で、発症時と寛解直後の %LMW は低値であった。

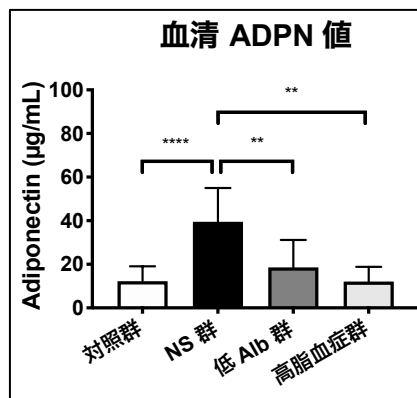


よって、ネフローゼ症候群患児において血清 ADPN 値は発症時に上昇し、病期によってその分画は変動することが判明した。血清 ADPN が上昇する疾患や病態は少なく、なぜ、このような現象がネフローゼ症候群において生じるのかは明らかになっていない。ADPN にはミトコンドリア機能を改善する働きがあり、動物実験でもポドサイトの保護作用があることが示されている。よって、ネフローゼ症候群において、ADPN はポドサイトに保護的に作用している可能性がある。蛋白尿と ADPN 分画が変動する機序に関してはさらなる研究を要するが、ネフローゼ症候群の発症においてミトコンドリア機能が何らかの影響を受けている可能性を示唆できた点で重要である。

この研究成果は「Tamai T, Abe Y, et al. Clinical and Experimental Nephrology (2021) 25:1027-1034」で公表した。

B. ステロイド感受性ネフローゼ症候群における血清 ADPN 増加の誘因

対照群 (50 例)、NS 群 (35 例)、低 Alb 群 (9 例)、高脂血症群 (5 例) の 4 群において、血清 ADPN 値 ($\mu\text{g/mL}$) の中央値はそれぞれ、10.4、36.7、18.0、9.4 であった。NS 群の ADPN 値は、対照群 ($p < 0.0001$)、低 Alb 群・高脂血症群 (ともに $p < 0.01$) と比較して有意に高値であった。また、ADPN は低 Alb 群と高脂血症群で対照群と有意差はなく、低 Alb 群と高脂血症群の間でも有意差はなかった (左図、未発表データ)。



よって、今回の検討では、蛋白尿のない低 Alb 血症や高脂血症のみでは、血清 ADPN 値の増加は認められなかった。すなわち、NS 群における ADPN の増加にそれらの関与は否定的で、著明な蛋白尿やその他の要因の関与が示唆される。

III. 慢性腎臓病に対する CoQ10 の腎保護作用に関する Systematic Review

前述の I、II でネフローゼ症候群においてミトコンドリア機能の関与を示唆する所見を得たが、ミトコンドリア機能を改善する薬剤がネフローゼ症候群の蛋白尿に対して、有用かどうかはエビデンスに乏しい。

Coenzyme Q10 にはミトコンドリア機能障害や活性酸素を軽減する作用がある。腎機能障害の悪化には、腎臓のミトコンドリア機能障害や活性酸素が関与することが知られている。しかし、検索した限りでは、ステロイド感受性ネフローゼ症候群において Coenzyme Q10 が蛋白尿を軽減するかどうかは検討がなかった。そこで、蛋白尿を生じる慢性腎臓病を対象に、Coenzyme Q10 投与が腎機能や蛋白尿を改善させるか、Systematic Review を行って明確なエビデンスがあるかを引き続き検討する。現時点においては、Systematic Review を行うために必要な文献検索式を作成し、Protocol 論文の投稿準備を進めている。これによって、ミトコンドリア機能改善薬の腎保護作用に関するエビデンス構築が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamai Tetsuro, Kamijo Kaori, Abe Yoshifusa, Hibino Satoshi, Sakurai Shunsuke, Watanabe Shuichiro, Watanabe Yoshitaka, Nimura Satomi, Shiratori Atsutoshi, Takayanagi Takaaki, Watanabe Tsuneki, Nakano Yuya, Ikeda Hirokazu, Dobashi Kazushige, Nakano Yasuko, Mizuno Katsumi, Itabashi Kazuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Distribution of serum adiponectin isoforms in pediatric patients with steroid-sensitive nephrotic syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02085-w	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 阿部祥英	4. 巻 72
2. 論文標題 ネフローゼ症候群	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 薬局増刊号	6. 最初と最後の頁 590-602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 阿部祥英	4. 巻 71
2. 論文標題 ネフローゼ症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 薬局	6. 最初と最後の頁 576-587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部祥英、玉井哲郎、上條香織、渡邊佳孝、土橋一重
2. 発表標題 初発のステロイド感受性ネフローゼ症候群における血清アディポネクチン増加の誘因に関する検討
3. 学会等名 第57回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部祥英、上條香織、渡邊佳孝、渡邊修一郎、土橋一重
2. 発表標題 小児ネフローゼ症候群における血清アディポネクチン増加の誘因に関する検討
3. 学会等名 第35回日本小児脂質研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上條香織、渡邊佳孝、渡邊常樹、日比野聡、高柳隆章、渡邊修一郎、阿部祥英、土橋一重
2. 発表標題 ステロイド感受性ネフローゼ症候群における血清レプチン値の推移に関する検討
3. 学会等名 第56回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部祥英、上條香織、玉井哲郎、日比野聡、櫻井俊輔、渡邊修一郎、渡邊佳孝、高柳隆章、渡邊常樹、水野克己
2. 発表標題 低アルブミン血症はステロイド反応性ネフローゼ症候群における血清アディポネクチン増加の誘因か？
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部祥英、志村優、村山圭
2. 発表標題 TGF- β 1が惹起するポドサイトのミトコンドリア機能変化に対するミゾリピンの効果
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会WEB学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上條香織、阿部祥英
2. 発表標題 小児期発症ネフローゼ症候群におけるアディポネクチンの分泌調節機構とその役割の解明
3. 学会等名 第366回昭和大学学士会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部祥英
2. 発表標題 ステロイド反応性ネフローゼ症候群における血清アディポサイトカインの推移
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部祥英
2. 発表標題 ステロイド反応性ネフローゼ症候群における血清アディポサイトカインの推移
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 阿部祥英、板橋家頭夫（監修）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 301
3. 書名 早産児、低体重出生児の成長と発達のみかたー出生からAYA世代までー	

〔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
---------	---------