

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10161

研究課題名(和文) 小児ネフローゼ症候群発症にかかわるミトコンドリア障害関与の解明

研究課題名(英文) Clarification of mitochondrial damage in pediatric nephrotic syndrome

研究代表者

芦田 明 (ASHIDA, AKIRA)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80278514

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)：小児に好発するネフローゼ症候群の発症要因の一つとされる酸化ストレスについて、ミトコンドリアに対する影響を検討した。ネフローゼモデルラットに対してミトコンドリア特異的抗酸化剤を投与し、尿蛋白および血液、尿、腎系球体(特にポドサイト)での酸化ストレスの軽減を確認した。また、ポドサイト内のミトコンドリア障害が軽減された。ネフローゼ症候群の発症要因として、酸化ストレスによるミトコンドリア障害が大きく影響していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ネフローゼ症候群の発症要因として、酸化ストレスによるミトコンドリア障害が重要であることが明らかとなり、電子顕微鏡観察下でミトコンドリア障害の半定量的評価法を確立した。これらの結果から、本研究の社会的意義として、ミトコンドリア保護という観点によるネフローゼ症候群の治療法の開発に発展する可能性がある。また、学術的意義としては、電子顕微鏡下で腎組織のミトコンドリア障害を評価することにより、従来困難とされる病勢の判断や治療適応の判断に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Nephrotic syndrome, which typically results in edema, massive proteinuria, and hypoalbuminemia, is the most common manifestation of glomerular disease in children. Oxidative stress has been reported to be involved in the pathogenesis of this syndrome. In this study, we confirmed the effect of oxidative stress on mitochondria in nephrotic syndrome through the administration of mitochondrion-specific agent to rat model of nephrotic syndrome. In rat model of nephrotic syndrome administered mitochondrion-specific antioxidants, the urinary protein and oxidative stress in blood, urine, and renal tissues (especially in podocyte) were reduced. The alleviation of mitochondrial damage in podocytes indicated that oxidative stress-induced mitochondrial damage is a major factor in the pathogenesis of nephrotic syndrome.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：酸化ストレス ミトコンドリア障害 ネフローゼ症候群

また、光学顕微鏡像を観察し、酸化ストレスの局在の確認として抗 4-hydroxynonenal (4HNE) 抗体による免疫染色法を施行した。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて、ランダムに選択した糸球体のポドサイトを観察し、ミトコンドリアを障害スコアにより評価した。結果は、JMP Pro 13 software を用い、各群間で比較した。p 値 <0.05 を有意とし、中央値と四分位範囲で示した。本研究は、本学研究支援センター動物実験委員会の承認を得て、動物実験規程に則り施行した(承認番号: 28054, 29057)。

4. 研究成果

PAN 投与後 3 日目の尿蛋白は P 群 18.3 (13.9–21.6) mg/day、PT 群 16.7 (13.5–18.3)mg/day と有意な差は認めなかった。9 日目の尿蛋白は、P 群 265.3 (144.0–371.7)mg/day、PT 群 87.5 (76.1–138.7)mg/day と、PT 群が P 群に比して有意に低値であった(図 2)。酸化ストレスマーカーとして糸球体・尿中 TBARS、血漿 4HNE を測定し、PT 群が P 群に比して有意に低値であった。抗 4HNE 抗体による免疫染色法では、P 群でポドサイトが強く染色され、PT 群では染色性が減弱していた。光学顕微鏡 PAS (Periodic acid-Schiff) 染色像では、糸球体と尿管間質に明らかな異常所見を認めなかった。電子顕微鏡像で、P 群で糸球体のポドサイト足突起の消失所見を認めた。PT 群でも一部消失が見られた。ポドサイトにおけるミトコンドリア障害スコアは P 群で 1.8 (1.6–2.0) に対し、PT 群で 1.2 (1.1–1.4) と有意に低値であった。

以上の結果から、MCNS モデルラットにおいて、ミトコンドリア特異的な抗酸化剤 MitoTEMPO を投与することにより、糸球体ポドサイトの酸化ストレスが軽減され、尿蛋白が減少した。またポドサイト内のミトコンドリア障害も改善していた。その機序としては、糸球体ポドサイト内のミトコンドリアの酸化ストレスが減少し、ミトコンドリア障害が軽減されたことで、ポドサイト障害の軽減につながったと考えた。また、ポドサイト障害が軽減したことによりポドサイトの足突起の消失が改善し、蛋白尿が減少したと考えた。

したがって、本研究の結果から、ネフローゼ症候群の酸化ストレスの標的細胞小器官の一つとしてミトコンドリアがあり、ポドサイト内のミトコンドリア障害が、ネフローゼ症候群の発症要因に大きく関与していることが明らかとなった。また、同時に本研究では電子顕微鏡下でのポドサイト内の多数のミトコンドリアの障害をスコア化し、その平均値を用いることにより、従来困難であった電子顕微鏡観察によるミトコンドリア障害の半定量的な評価が可能となった。さらに特異的なラジカルスカベンジャーをはじめ、ミトコンドリア保護作用のある薬剤が、MCNS の治療薬となる可能性を示唆した。

本研究結果は、ミトコンドリア保護という観点による MCNS 治療法の開発へと発展する可能性を示唆し、ミトコンドリア障害の電子顕微鏡下での半定量的評価を確立したことから、MCNS の病勢を評価し、ミトコンドリア保護薬の適応を検討することが可能となった。これらの点に本研究成果の意義がある。

図 2 尿蛋白の変化

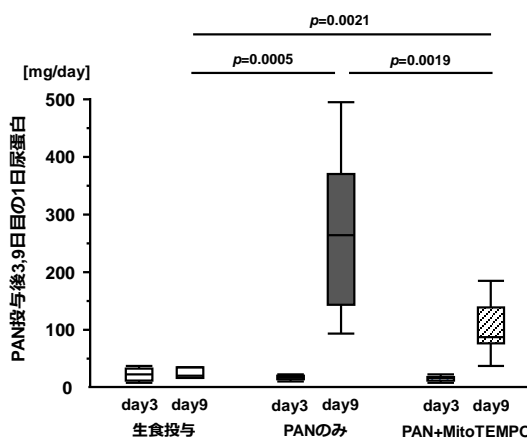


図 3 電子顕微鏡観察下でのミトコンドリアの変化

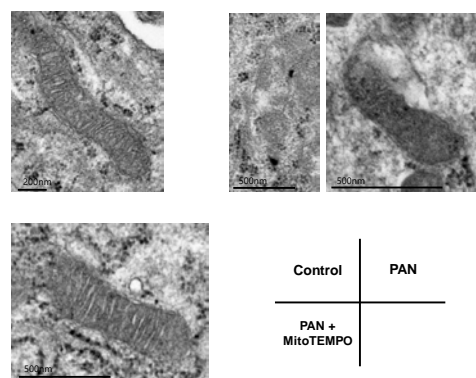
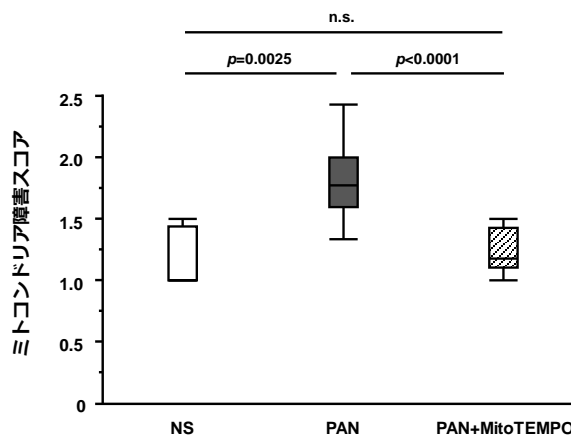


図 4 ミトコンドリア障害スコア



引用文献

- 1) Nakakura H, Ashida A, Hirano K, Tamai H. Oxidative stress in a rat model of nephrosis can be quantified by electron spin resonance. *Pediatr Nephrol* 19, 2004,

- 2) Matsumura H, Ashida A, Nakakura H, Hirano K, Tamai H. Protective effect of radical scavenger edaravone against puromycin nephrosis. *Clin Nephrol* 66, 2006, 405-410
- 3) Marshall CB, Poppon JW, Krofft RD, Shankland SJ. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. *Kidney Int* 70, 2006, 1962-1973
- 4) Shen X, Jiang H, Ying M, Xie Z, Li X, Wang H, Zhao J, Lin C, Wang Y, Feng S, Shen J, Weng C, Lin W, Wang H, Zhou Q, Bi Y, Li M, Wang L, Zhu T, Huang X, Lan H, Chen J. Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus protect against podocyte injury induced by puromycin aminonucleoside in rodent models. *Sci Rep* 6, 2016, 1-16
- 5) Rocha VCJ, Aragão França LS, Araújo CF, Ng AM, Andrade CM, Andrade AC, Souza Santos E, Borges-Silva MC, Macambira SG, Noronha-Dutra AA, Pontes-de-Carvalho LC. Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 77, 2016, 659-662
- 6) Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan G, Lacefield JC, Lu Y, Tissier SL, Peng T. Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radical Biology and Medicine* 90, 2016, 12-23

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Fujii Yuko, Matsumura Hideki, Yamazaki Satoshi, Shirasu Akihiko, Nakakura Hyogo, Ogihara Tohru, Ashida Akira	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficacy of a mitochondrion-targeting agent for reducing the level of urinary protein in rats with puromycin aminonucleoside-induced minimal-change nephrotic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0227414	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井裕子、芦田明、松村英樹、山崎哲司、白数明彦、中倉兵庫、玉井浩
2. 発表標題 ビューロマイシン腎症ラットにおけるmitoTEMPOの蛋白尿減少効果
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujii Y, Ashida A, Matsumura H, Yamazaki S, Sirasu A, Nakakura H, Tamai H
2. 発表標題 Efficacy of a mitochondrion-targeting agent to decrease urinary protein in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis
3. 学会等名 第53回日本小児腎臓病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井裕子、松村英樹、山崎哲司、白数明彦、中倉兵庫、服部元史、芦田明
2. 発表標題 ビューロマイシン腎症ラットにおけるミトコンドリア選択的抗酸化剤MitoTEMPOの蛋白尿減少効果.
3. 学会等名 第31回腎とフリーラジカル研究会.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	松村 英樹 (MATSUMURA HIDEKI)		
研究協力者	藤井 裕子 (FUJII YUKO)		
研究協力者	白数 明彦 (SHIARSU AKIHIKO)		
研究協力者	山崎 哲司 (YAMAZAKI SATOSHI)		
研究協力者	中倉 兵庫 (NAKAKURA HYOGO)		