

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08254

研究課題名(和文)系球体足細胞最終分化維持機構の解明と糖尿病性腎症に対する新規治療応用の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapies for diabetic nephropathy based on the maintenance of differentiation in podocytes

研究代表者

和田 健彦(WADA, Takehiko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90447409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：系球体足細胞障害は腎機能障害の直接的原因となる系球体硬化の機序の中で中心的な役割を果たす。本研究ではビタミンDによる足細胞保護作用とその機序を明らかにすることを目的として遂行された。In vivoでの検討では活性型ビタミンDが糖尿病モデルマウスにおいて足細胞保護作用を発揮することを示し、培養細胞を用いたin vitro実験で活性型ビタミンDが足細胞の細胞骨格の維持・分化状態の維持を介して足細胞保護に働くことが示された。以上の結果から、活性型ビタミンDが細胞分化状態の変化を介して足細胞障害の進行に抑制的に作用し、足細胞保護作用を発揮することを提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症および慢性腎臓病の新しい治療法を開発する目的で、腎系球体(濾過装置)の主要な細胞であり、その障害が系球体の機能不全に強く関係している足細胞に着目し、活性型ビタミンDがこの細胞に対してどのような作用を及ぼすかという点に着目して研究を行いました。その結果、足細胞に対して保護的に働いていること、そしてその作用は足細胞の分化状態の維持に関連していることが判明しました。今後はこの作用機序を応用した新しい薬品の創出につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：Podocyte injury plays a central role in the progress of glomerulosclerosis, which directly causes deterioration of kidney function. In the present study, we have performed several different experiments to show the protective action of vitamin D for podocytes, and to elucidate its mechanism. Our in vivo experiments successfully demonstrated that paricalcitol, an active form of vitamin D, exerted a protective effect on podocytes in diabetic mice. We also demonstrated that the protective effects were mediated by maintenance of cytoskeleton and terminal differentiation. Taken together, we have found out that paricalcitol might protect podocytes through the maintenance of cell differentiation status.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：系球体足細胞 活性型ビタミンD 細胞周期 糖尿病性腎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の慢性透析患者数は32万人を超え、しかも高齢患者の増加傾向は医療の現場のみならず我が国の医療財政において深刻な問題となりつつあった。1998年以降、透析導入原疾患として糖尿病性腎症が最多であるが、全国で1330万人と推計される慢性腎臓病患者全体においても、糖尿病を基礎とする高齢かつ全身血管病変を有するハイリスク患者が多く、糖尿病性腎症の進行を阻止する方法を開発することは活力ある高齢化社会を構築する上で重要な課題であると考えられた。また、透析導入原疾患の第2位は慢性糸球体腎炎であり、糸球体を病変の首座とする疾患が本領域の大部分を占めていると考えられる。なお、この傾向は現在も変わることなく、2019年末の慢性透析患者は34万4640人となり、透析導入原疾患に糖尿病性腎症が占める割合も引き続き最多である。

このような疾患における末期腎不全に至る腎機能低下の過程では、糸球体硬化の進行が病理組織学的に重要な所見である。糸球体硬化の発生および進行には糸球体足細胞障害が密接に関わっていることから、特に初期～中期の慢性腎臓病患者においては足細胞傷害への積極的な介入により腎予後が改善する可能性も想定される。足細胞は最終分化段階にある希少な細胞種の1つであり、傷害や細胞死が起こっても周囲の細胞増殖によりその部位を修復することができない。したがって、その傷害機序を明らかにし、新しい修復機構を開発することは腎臓病臨床において意義深い視点であると考えられる。このような観点から、研究代表者は以前より最終分化段階にある足細胞の傷害やその進行に関する機序、さらに足細胞傷害に対する保護機構についての研究を遂行してきた。この中で中心となっているのは、足細胞の分化段階に関する特徴から、足細胞傷害因子に対する細胞周期および分化状態の変化に関する点に着目した研究である。

2. 研究の目的

上記の背景を基盤として、糖尿病性腎症の主要な病態の一つである足細胞傷害において、発生後の足細胞分化状態の維持機構や脱分化状態へ誘導される病的機序を分子レベルで明らかにし、この点を制御することによる糸球体傷害の進展防止法や治療介入の可能性を明らかにすることを目的とした。具体的に、2015年～2017年の課題であった「糖尿病関連代謝性ストレスに対する糸球体足細胞骨格維持機構の解明と新規治療法の開発」の中のパイロット実験で認められた活性型ビタミンDの足細胞保護効果を正確に確認し、その機序を明らかにすることに重点を置くこととした。

3. 研究の方法

本研究では糖尿病モデルマウス(streptozotocin投与により作成)を用いたin vivo実験および温度感受性不死化培養足細胞を用いたin vitro実験を行うことにより、以下の点について検討した。

(1) 糖尿病モデルマウスにおける活性型ビタミンDの腎保護効果に関する検討

動物モデルとしては、糖尿病モデルとして確立しているstreptozotocin投与マウスを使用した。C57BL6マウス(雄・5週齢)に対して250 mg/kgBWでstreptozotocinを投与し、投与7日後の血糖が400 mg/dLを超えるものを糖尿病モデル動物として使用した。活性型ビタミンD刺激としてはparicalcitolを概ね3種の用量(5, 50, 500 ng/個体)でSTZ糖尿病誘導7日目以降に週3回の腹腔内投与を行った。このようなマウスにおけるアウトカムとして以下の項目について検討を行った。

生命予後に対する影響

生化学的検討: アルブミン尿に対する影響: 代謝ケージを用いて採尿を行い、生化学的にアルブミン尿の測定を行った。

病理組織学的検討: 足細胞関連分子の発現に関する解析: 複数のタイムポイントにおいて採材を行い、ホルマリン固定組織をPAS染色等に供し、冷凍組織を種々の分子発現に関する免疫蛍光染色に供した。

(2) 糖尿病関連刺激下培養足細胞に対する活性型ビタミンDの効果に関する検討

培養細胞としては、研究代表者が米国・ワシントン大学留学中にStuart J. Shankland教授とともに確立したマウス温度感受性培養糸球体足細胞を使用した。この細胞は特定の条件(33 かつインターフェロン 存在下)では増殖を続けるが、分化条件下(37、インターフェロン非存在下)では増殖を停止し、特徴的な突起形成や足細胞関連蛋白の発現が増強するという特徴を有する。

糖尿病関連刺激としては、これまでの様々な研究で確立しているTGF- β 1による刺激を採用した。培養上清中にTGF- β 1(1 ng/mL)もしくはvehicleを添加し、異なる用量の活性型ビタミンD(paricalcitol)(1, 10, 100 μ M)の存在下で、以下の細胞の変化につき検討を行った。

細胞骨格の変化に関する検討：pallodin 染色によりアクチン細胞骨格の変化を検討
細胞移動 (migration) の変化に関する検討：scratch assay により検討
ビタミン D 受容体の発現変動に関する検討：主として定量 PCR 法による mRNA 発現変動の検討
足細胞関連分子の発現変動に関する検討：以前より確立している足細胞関連分子である nephrin, podocin, CD2AP, synaptopodin などの発現を定量 PCR 法および Western blotting 法により検討
足細胞における細胞周期調節蛋白の発現に関する検討：上記条件における足細胞の細胞周期および分化状態を検討する目的で cyclin D1, B1, E1, I, p21, p27, p57 の発現状態について定量 PCR 法および Western blotting 法により検討
足細胞における Wnt1 の発現に関する検討：細胞骨格・運動・分化などに関与する細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たす Wnt1 の発現状態について、定量 PCR 法を用いて検討

4. 研究成果

上記の検討の結果、以下のような成果が得られた。

(1) 糖尿病モデルマウスにおける活性型ビタミン D の腎保護効果に関する検討

上記の方法で糖尿病を誘導したマウスでは、血糖上昇・体重増加不良とともに死亡率の悪化がみられたが、paricalcitol を投与した糖尿病マウスでは血糖や体重には影響がなかったものの、生命予後が用量依存性に改善した。また、糖尿病マウスでアルブミン尿の増加が観察されたが、paricalcitol 投与糖尿病マウスでは用量依存性にアルブミン尿が減少した。マウス腎組織においては、糖尿病モデルマウス系球体で細胞外基質の増加がみられた一方で、paricalcitol 投与マウスでその抑制傾向が認められた。ビタミン D 受容体の発現は糖尿病マウスでは低下した一方、paricalcitol 投与群で回復が認められた。足細胞関連蛋白のうち、podocin の発現が糖尿病モデルマウスで対照マウスに比較して低下していたが、paricalcitol 投与マウスではその低下抑制が認められた。

(2) 糖尿病関連刺激下培養足細胞に対する活性型ビタミン D の効果に関する検討

細胞骨格の変化

Phalloidin 染色により、TGF- β 1 存在下で足細胞のアクチン細胞骨格の染色性低下が観察され、paricalcitol 共存下ではその変化が部分的に抑制されることが示された。

細胞移動 (migration) の変化に関する検討

分化状態の細胞を用いた scratch assay によって、足細胞の可動性を検討した。その結果、TGF- β 1 存在下でコントロールと比較して亢進した可動性は paricalcitol 共存下で抑制されていた。

足細胞におけるビタミン D 受容体発現の変化に関する検討

Paricalcitol 単独の刺激においては、用量依存性に明確なビタミン D 受容体 mRNA 発現の亢進が認められたが、TGF- β 1 共存下ではその効果が顕著に抑制された。

足細胞関連分子の発現変化に関する検討

本研究ではすでに確立された足細胞関連分子の発現解析を行ったが、特に CD2AP は TGF- β 1 による発現低下が認められ、paricalcitol の共存下では paricalcitol の用量依存性に発現の回復が観察された。CD2AP 遺伝子における変異が家族性・遺伝性 FSGS の原因となることを考慮すると、この現象は臨床に直結する重要な所見であると考えられる。

足細胞における細胞周期調節蛋白の発現に関する検討

TGF- β 1 刺激により p21 の発現上昇が認められたが、paricalcitol ではその発現が部分的に抑制された。研究代表者は過去に p21 発現上昇は足細胞の細胞死・細胞数減少に関連している可能性を報告しているが、その報告に合致する成果であった。

また、cyclin D mRNA は paricalcitol 刺激開始後早期に発現増強がみられるが、48 時間後にはベースラインまで低下していた。一方で TGF- β 1 による発現の変化は観察されず、病的条件下での cyclin D 発現変動の意義については今後さらなる検討が必要と考えられた。

足細胞における Wnt1 発現に関する検討

細胞の増殖・分化・運動を調節するシグナル伝達に重要な役割を果たしている分子の一つである Wnt1 の足細胞での動態を検討したところ、TGF- β 1 存在下での mRNA 発現上昇が paricalcitol の用量依存性にさらに増強することが観察された。この動態が足細胞の恒常性維持にどのように関与しているか、今後さらに検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishida Hiroaki, Komaba Hirotaka, Hamano Naoto, Yamato Hideyuki, Sawada Kaichiro, Wada Takehiko, Nakamura Michio, Fukagawa Masafumi.	4. 巻 -
2. 論文標題 Skeletal and mineral metabolic effects of risedronate in a rat model of high-turnover renal osteodystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-020-01095-0	査読の有無 有
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 Kakuta Takatoshi, Sawada Kaichiro, Kanai Genta, Tatsumi Ryoko, Miyakogawa Takayo, Ishida Mari, Nakazawa Raima, Fukagawa Masafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Parathyroid hormone-producing cells exist in adipose tissues surrounding the parathyroid glands in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60045-y	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 Mase Hiroyasu, Hamano Naoto, Mizuhara Ryoko, Nozaki Tsukasa, Saso Takayuki, Wada Takehiko, Asai Satomi, Miyachi Hayato, Fukagawa Masafumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Falsely Elevated Serum Creatinine Associated With IgM Paraproteinemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 377 ~ 381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2019.11.017	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 Koizumi Masahiro, Ueda Kohei, Niimura Fumio, Nishiyama Akira, Yanagita Motoko, Saito Akihiko, Pastan Ira, Fujita Toshiro, Fukagawa Masafumi, Matsusaka Taiji	4. 巻 74
2. 論文標題 Podocyte Injury Augments Intrarenal Angiotensin II Generation and Sodium Retention in a Megalin-Dependent Manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 509 ~ 517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12352	査読の有無 有
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 Hasegawa Sho, Susaki Etsuo A., Tanaka Tetsuhiro, Komaba Hirotaka, Wada Takehiko, Fukagawa Masafumi, Ueda Hiroki R., Nangaku Masaomi	4. 巻 96
2. 論文標題 Comprehensive three-dimensional analysis (CUBIC-kidney) visualizes abnormal renal sympathetic nerves after ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 129 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.02.011	査読の有無 有
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 Kimura Moritsugu, Toyoda Masao, Saito Nobumichi, Kaneyama Noriko, Miyatake Han, Tanaka Eitaro, Komaba Hirotaka, Hara Masanori, Fukagawa Masafumi	4. 巻 2019
2. 論文標題 A Liquid-Based Cytology System, without the Use of Cyto centrifugation, for Detection of Podocytes in Urine Samples of Patients with Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Research	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9475637	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 Nakagawa Yosuke, Komaba Hirotaka, Hamano Naoto, Wada Takehiko, Hida Miho, Suga Takao, Kakuta Takatoshi, Fukagawa Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Metacarpal bone mineral density by radiographic absorptiometry predicts fracture risk in patients undergoing maintenance hemodialysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 -
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 有
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 Kawabata Chiaki, Komaba Hirotaka, Ishida Hiroaki, Nakagawa Yosuke, Hamano Naoto, Koizumi Masahiro, Kanai Genta, Wada Takehiko, Nakamura Michio, Fukagawa Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Changes in fibroblast growth factor 23 and soluble Klotho levels after hemodialysis initiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney Medicine	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Komaba Hiroataka, Kakuta Takatoshi, Wada Takehiko, Hida Miho, Suga Takao, Fukagawa Masafumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Nutritional status and survival of maintenance hemodialysis patients receiving lanthanum carbonate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 318-325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfy090	査読の有無 有
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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Fukagawa Masafumi
2. 発表標題 Management of Hyperphosphatemia and Vascular Calcification in CKD
3. 学会等名 26th Postgraduate course in dialysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田健彦
2. 発表標題 CKD-MBD・貧血治療の現況と未来
3. 学会等名 第10回血液透析技能セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakagawa Y, Komaba H, Ishida H, Hamano N, Yamato H, Sawada K, Wada T, Nakamura M, Fukagawa M
2. 発表標題 Acute kidney injury promotes osteoid formation in rats
3. 学会等名 56th ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakagawa Y, Komaba H, Ishida H, Hamano N, Kondo Y, Fajol A, Sawada K, Wada T, Nakamura M, Fukagawa M
2. 発表標題 Preceding high phosphate diet exacerbates acute kidney injury in rats
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 福井次矢 (編) 和田健彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2151
3. 書名 今日の治療指針 2021年版, pp626-628	

1. 著者名 永井良三 (編) 和田健彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2079
3. 書名 今日の診断指針第8版, pp1019-1021	

1. 著者名 山縣邦弘、南学正臣 (編) 和田健彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 384
3. 書名 腎疾患・透析最新の治療2020-2022, pp110-112	

1. 著者名 矢崎義雄（編）和田健彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1960
3. 書名 新臨床内科学 第10版, pp1185-1188, 2020	

1. 著者名 岡田浩一（編）和田健彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 308
3. 書名 最新ガイドラインに基づく 腎・透析 診療指針 2021-' 22	

1. 著者名 和田健彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 3672
3. 書名 内科学書 改訂第9版. 中山書店, pp528-533, 2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海大学医学部腎内分泌代謝内科ホームページ
<http://u-tokai-nem.jp>

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
研究分担者	深川 雅史 (FUKAGAWA Masafumi) (00211516)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	豊田 雅夫 (TOYODA Masao) (00349383)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	
研究分担者	澤田 佳一郎 (SAWADA Kaichiro) (10420952)	東海大学・医学部・客員講師 (32644)	

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