

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15027

研究課題名(和文)ポドサイトにおける転写因子OASISを標的とした慢性腎臓病治療法の開発

研究課題名(英文)The development of therapeutic strategies for chronic kidney disease targeting the transcription factor OASIS in podocytes

研究代表者

尾花 理徳 (Obana, Masanori)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50745883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎疾患病態形成機構の解明を目指し、ポドサイトにおける転写因子OASISに着目し検討を行った。LPSは、ポドサイトにおいてOASISの発現を上昇させることを明らかにした。また、ポドサイト特異的OASIS欠損マウスでは、LPS投与や糖尿病による腎機能の低下が抑制された。他方、ポドサイト特異的OASIS過剰発現マウスでは顕著な尿中アルブミン/クレアチニン比の上昇やポドサイト障害が惹起された。以上より、ポドサイトにおけるOASISの上昇は、腎臓の恒常性維持の破綻に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎疾患、特に慢性腎臓病は新たな国民病として注目され、透析導入や心血管病のリスクファクターであるため、その予防や治療が重要である。腎臓病の予防法や治療法を確立する上で、腎臓病の成り立ちを理解することは重要だが、未だ腎疾患病態形成機構には不明な点が多い。本研究では、腎構成細胞のポドサイトにおける転写因子OASISが、腎疾患病態形成に関わることを見出した。本研究成果は、新たな腎臓病治療法の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Although there is an unmet medical need in the treatment of kidney diseases, the pathological mechanisms of kidney diseases remain to be elucidated. Previously, we found that OASIS is expressed in podocytes of murine kidneys. Therefore, in the present study, we examined the pathological roles of OASIS in podocytes. OASIS was increased in cultured podocytes and murine glomeruli by LPS treatment. Moreover, LPS- or diabetes-induced kidney dysfunction was reduced in podocyte-specific OASIS knockout mice. Surprisingly, podocyte-specific OASIS transgenic mice showed severe albuminuria, accompanied by increased podocyte/tubular injury and tubulointerstitial fibrosis. Taken together, the upregulation of OASIS in podocytes contributes to disruption of kidney homeostasis.

研究分野：分子腎臓病学

キーワード：ポドサイト 慢性腎臓病 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は我が国の 8 人に一人が罹患している国民病と言われ、その治療の重要性が唱えられている。しかしながら、CKD を含め、腎臓を標的とした腎疾患治療法はほとんどなく、治療戦略の開発のため、新たな治療標的の発掘が重要である。申請者はこれまで、腎臓において機能が明らかにされていない転写因子 old astrocyte specifically induced substance (OASIS) が、マウスの CKD モデル等で発現上昇すること、また、その OASIS はポドサイトに発現することも明らかにしてきた。ポドサイトは腎臓の糸球体において、血液濾過の最終バリアーとしての役割を担う細胞である。ポドサイトの障害や機能不全は、多くの腎疾患の病態形成に関与すると考えられている。しかしながら、ポドサイトにおける OASIS の CKD などの腎病態形成への関与は不明である。本研究は、ポドサイトにおける OASIS の病態生理学的意義を解明し、治療標的としての可能性を追究することを目的に行った。

2. 研究の目的

腎疾患病態形成におけるポドサイトの OASIS の関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養ポドサイトを用いた検討

マウス培養ポドサイト株に、 $10\sim 10^5$ ng/mL の濃度のリポポリサッカライド (LPS) を添加し、OASIS の発現をウェスタンブロッティングにより評価した。

マウス培養ポドサイトにレンチウイルスを用いて OASIS を過剰発現させ、DNA マイクロアレイを行った。その結果から、2 倍以上の発現変動があり細胞外に局在しうる因子を抽出した。

(2) 病態モデルマウス及び遺伝子改変マウスを用いた検討

動物実験は、大阪大学薬学研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。

ポドサイト特異的 OASIS 欠損 (cKO) マウスを作製し、LPS 投与、または片腎摘出/ストレプトゾシン (STZ) 投与 (糖尿病性腎臓病; DKD モデル) により腎障害を惹起させた。一定時間後、血液、尿、腎臓を採材し、血清クレアチニン値や組織学的解析、定量的 PCR による各種遺伝子発現により腎障害の程度を評価した。

また、ポドサイト特異的 OASIS 過剰発現 (TG) マウスを作製し、血液、尿、腎臓を採材し、尿中アルブミン/クレアチニン比や組織学的解析により腎障害の程度を評価した。

4. 研究成果

下記の成果については発表準備中のため、データは割愛する。

(1) ポドサイトにおいて OASIS は LPS により発現誘導される

ポドサイトにおける OASIS の発現誘導メカニズムを明らかにするため、マウス培養ポドサイトに LPS を添加し、OASIS の発現を評価した。なお、全長型の OASIS は N 末端側が切り出され、活性型として機能することが知られている。結果、OASIS は、特に低用量の LPS により全長型、活性型ともに発現誘導され、その発現上昇は LPS 添加後 6 時間でピークになることが明らかとなった。

また、LPS は toll-like receptor (TLR) 4 を介して細胞内にシグナルを伝達することが知られている。そこで、TLR4 阻害剤 TAK-242 を用いて検討したところ、TAK242 は LPS による OASIS の発現誘導を抑制することが明らかとなった。

(2) cKO マウスでは、LPS や DKD モデルにおける腎機能の低下が抑制される

ポドサイトの OASIS の腎病態形成に与える影響を検討するため、cKO マウスを作製し、LPS を 10 mg/kg の用量で投与した。なお、LPS モデルはネフローゼや急性腎障害モデルとして汎用されている。投与 24 時間後、尿中アルブミン/クレアチニン比、血清クレアチニン値を測定し、また組織学的評価を行った。その結果、cKO マウスではコントロールマウスと比べて、尿中アルブミン/クレアチニン比には何ら影響が認められなかったものの、血清クレアチニン値を有意に抑制した。さらに、電子顕微鏡解析やポドサイトマーカーの遺伝子発現解析から、cKO マウスとコントロールマウスとの間でポドサイト障害に差は認められなかった。一方で、LPS による尿細管傷害が cKO マウスでは有意に抑制されていることが明らかとなった。

また、DKD の病態形成に TLR4 が関与することが報告されている。そこで、cKO マウスに DKD を

惹起させ、腎障害の程度を評価した。その結果、LPS モデルと同様に、DKD による血清クレアチニンの上昇が cKO モデルでは有意に抑制された一方で、尿中アルブミン/クレアチニン比には大きな影響を与えなかった。加えて、組織学的にも DKD による尿細管傷害が cKO マウスでは有意に抑制されていた。

(3) cKO マウスにおける尿細管傷害抑制作用は PRKCI を介する

上述の結果より、ポドサイトにおいて OASIS の下流に位置する分泌因子が、尿細管傷害に寄与している可能性を想起し、OASIS の下流因子を探索した。具体的には、培養ポドサイトにレンチウイルスを用いて OASIS を過剰発現させ、DNA マイクロアレイを行った。その結果から、2 倍以上発現変動する因子のうち、細胞外にも局在する可能性のある因子に着目した。また、病態との関連性を担保するため、ポドサイトに LPS を処置することで、アレイの結果と同方向に発現変動し、さらに LPS 投与 cKO マウスで逆方向に発現変動する因子を絞り込み、Protein Kinase C Iota (PRKCI) を抽出した。また、cKO マウスの尿中では PRKCI の発現上昇が認められた。加えて、培養尿細管細胞を用いた検討から、LPS による尿細管傷害がリコンビナント PRKCI により抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、LPS 投与時、cKO マウスでは PRKCI の発現上昇を介し尿細管傷害が抑制される可能性が示唆された。

(4) TG マウスでは尿中アルブミン排泄量の増加をはじめとする重度の腎障害が惹起される

ポドサイトの OASIS の病態形成に与える影響をさらに追究するため、TG マウスを作製した。その結果、TG マウスはコントロールマウスに比べて体重が低く、また 12 週齢までに約 4 割が死亡した。8 週齢、12 週齢時点で尿中アルブミン/クレアチニン比を評価したところ、TG マウスでは有意に高値を示すことが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡解析の結果、重度のポドサイトの足突起消失（機能不全を伴う構造的異常）が認められた。加えて、H&E 染色、マッソントリクローム染色の結果、尿細管傷害や尿細管間質の線維化も亢進していた。

(5) OASIS 過剰発現の持続は、ポドサイトのアクチン骨格消失をもたらす

培養ポドサイトに、レンチウイルスを用いて OASIS を過剰発現させ 96 時間後、F-actin を染色により評価した。その結果、OASIS 過剰発現により、F-actin の有意な消失が確認された。

以上、本研究からポドサイトにおける OASIS の発現上昇は、腎臓の恒常性維持の破綻に寄与することが示された。現在、ヒト腎疾患患者の腎組織を用いて、ヒト腎病態と OASIS との関連性を検討中であり、OASIS を標的とした腎疾患治療薬の開発へと発展させていく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakae T, Obana M, Maeda T, Ikeda A, Miyazaki H, Tanaka S, Maeda M, Yamashita K, Terai K, Obika S, Fujio Y.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Gene Transfer by Pyro-Drive Jet Injector is a Novel Therapeutic Approach for Muscle Diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 GENE	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2021.145664.	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 Yamamoto A, Morioki H, Nakae T, Miyake Y, Harada T, Noda S, Mitsuoka S, Matsumoto K, Tomimatsu M, Kanemoto S, Tanaka S, Maeda M, Conway SJ, Imaizumi K, Fujio Y, Obana M.	4. 巻 35(2)
2. 論文標題 Transcription factor old astrocyte specifically induced substance is a novel regulator of kidney fibrosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB JOURNAL	6. 最初と最後の頁 e21158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202001820R.	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 該当する

1. 著者名 Tanaka S, Imaeda A, Matsumoto K, Maeda M, Obana M, Fujio Y.	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 2-adrenergic stimulation induces interleukin-6 by increasing Arid5a, a stabilizer of mRNA, through cAMP/PKA/CREB pathway in cardiac fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.590.	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12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原田 雄生、尾花 理徳、三宅 芳明、山本 彩葉、禿 宏保、田中 翔大、前田 真貴子、藤尾 慈.
2. 発表標題 Acute kidney injury-induced ZBTB38 contributes to tubular cell loss.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中江 崇文、尾花 理徳、前田 貴広、宮崎 洋、寺居 和宏、藤尾 慈.
2. 発表標題 Pyro-drive jet injector (PJI) as a novel gene transfer approach to muscle tissues.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiaki Miyake, Masanori Obana, Ayaha Yamamoto, Takeo Harada, Takafumi Nakae, Shunsuke Noda, Sayuri Mitsuoka, Koki Tanaka, Shota Tanaka, Makiko Maeda, Kazunori Imaizumi, Katsuhiko Asanuma, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 OASIS in podocytes promoted tubular injury by suppressing PRKCI expression.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本彩葉、尾花理徳、中江崇文、三宅芳明、光岡小百合、前田真貴子、今泉和則、松本浩太郎、藤尾慈.
2. 発表標題 Inhibition of transcription factor OASIS attenuated kidney fibrosis.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾花 理徳、三宅 芳明、山本 彩葉、田中 翔大、前田 真貴子、今泉 和則、浅沼 克彦、藤尾 慈.
2. 発表標題 ポドサイトにおける転写因子Old Astrocyte Specifically Induced Substance (OASIS) の欠損は、Protein Kinase C Iotaを介して LPSIによる尿細管傷害を抑制する.
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Obana, Ayaha Yamamoto, Takafumi Nakae, Yoshiaki Miyake, Takeo Harada, Sayuri Mitsuoka, Shunsuke Noda, Makiko Maeda, Kazunori Imaizumi, Kotaro Matsumoto, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 Suppression of transcription factor OASIS ameliorated kidney fibrosis.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾花理徳、山本彩葉、中江崇文、三宅芳明、原田雄生、光岡小百合、前田真貴子、今泉和則、松本浩太郎、藤尾慈.
2. 発表標題 転写因子Old Astrocyte Specifically Induced Substance (OASIS) は新規腎線維化制御因子である.
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会第55回高血圧関連疾患モデル学会合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaha Yamamoto, Masanori Obana, Takafumi Nakae, Yoshiaki Miyake, Sayuri Mitsuoka, Makiko Maeda, Kazunori Imaizumi, Kotaro Matsumoto, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 Inhibition of transcription factor OASIS attenuated kidney fibrosis
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅 芳明、尾花 理徳、山本 彩葉、中江 崇文、原田 雄生、金本 聡白、前田 真貴子、浅沼 克彦、今泉 和則、中山 博之、藤尾 慈
2. 発表標題 Podocytelにおける転写因子OASISは糖尿病性腎症進展に寄与する
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宅 芳明、尾花 理徳、山本 彩葉、野田 竣介、金本 聡自、前田 真貴子、浅沼 克彦、今泉 和則、中山 博之、藤尾 慈
2. 発表標題 Inhibition of OASIS in podocytes suppressed diabetes-induced kidney dysfunction
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾花 理徳
2. 発表標題 転写因子を標的とした慢性腎臓病治療法の開発を目指して
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾花 理徳、守沖 瞳、山本 彩葉、金本 聡自、前田 真貴子、今泉 和則、中山 博之、藤尾 慈、
2. 発表標題 転写因子OASISは筋線維芽細胞の増殖、遊走を介して腎線維化に関与する。
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Indiana University School of Medicine			