

平成22年5月17日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2007年度～2009年度
課題番号： 19590943
研究課題名 (和文) 糸球体腎炎における新しい機能分子の同定と臨床応用
研究課題名 (英文) The investigation of new functional molecules that express during the development of glomerulonephritis for the clinical application.
研究代表者
坂爪 実 (SAKATSUME MINORU)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号： 70334662

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、糸球体腎炎の腎組織における網羅的発現遺伝子の解析結果から、糸球体傷害に関わる分子機構を明らかにし、新しい機能分子の同定とその分子機能を解明するとともに、それらの分子を病態理解のためのバイオマーカーとして臨床応用することを目的として行われた。

DNAマイクロアレイを用いた半月体形成性腎炎モデル(抗糸球体基底膜抗体腎炎)の発現遺伝子解析により見出されたSM22 α 遺伝子に着目し、傷害された糸球体の上皮細胞 (parietal epithelial cells=ポドサイト、および visceral epithelial cells=ボウマン囊上皮細胞) に発現することを見出した。ポドサイト特異マーカーであるポドカリキシンとの二重染色により、ポドサイトではポドカリキシンと共染色される細胞とどちらか一方が染色される細胞が観察される。また、もう一つのポドサイト特異マーカーであるネフリンとの二重染色では、ネフリンが消失したポドサイトにSM22 α が検出された。正常マウスおよび正常ラットでは糸球体にSM22 α の発現は認められなかった。このことからSM22 α は傷害されたポドサイトの炎症性形質変化に伴って新たに発現してくる分子であることが推測された。そして半月体形成性腎炎モデルの長期観察により、SM22 α は糸球体障害だけでなく、その後を引き起こされる間質障害に先行して間質細胞にも発現することも解った。免疫電子顕微鏡 (immuno-gold法) での観察により、糸球体上皮に発現するSM22 α はfoot processが融合した部分に一致して局在することが確認された。

そこで、1) 尿細管間質障害を特異的に惹起するモデル (虚血-再灌流モデル)、2) 間質障害の後に糸球体障害を生ずるモデル (5/6腎摘モデル)、3) 糸球体上皮障害だけを一過性に生ずるモデル (Puromycin aminonucleoside 腎症) での発現動態を観察した。その結果、1) では間質細胞だけに、2) では間質細胞、糸球体上皮細胞の順に障害の発生する順に、3) では糸球体上皮細胞だけに発現した。以上から、形態学的変化が生じる前に、病態特異的な腎細胞障害を感知するマーカーとすることができる可能性があることが示された。そこで、この傷害糸球体の上皮細胞に発現するSM22 α の機能を調べるため、SM22 α ノックアウトマウスとコントロールマウスに抗糸球体基底膜抗体腎炎を惹起し、糸球体腎炎の発症・進展・病像の違いを詳細に解析した。

また、ヒトの腎症においてもこの分子の発現が認められることを見出し、糸球体上皮障害との関連を解析した。さらに、この分子を尿中に検出するシステムを確立するため、数種の特異抗体を作成し、ヒト腎疾患のバイオマーカーとしての応用を検討している。

研究成果の概要（英文）：

The present study was carried out in order to clarify the molecular mechanism that was related to glomerular injuries, based on the results of comprehensive gene analyses in the kidney tissues of glomerulonephritis using DNA microarray, and to identify new functional molecules and their molecular function. Moreover, the project aimed to establish them as clinical biomarkers for understanding the condition of renal diseases.

SM22 α , which was focused on as a gene up-regulated during the development of glomerulonephritis in the comprehensive gene analysis using DNA microarray, had been found to express in epithelial cells of injured glomeruli. There observed cells, which were stained with anti-SM22 α and/or anti-podocalyxin (podocyte-specific marker). Moreover, SM22 α was detected in podocytes that loss nephrin expression by a double staining with anti-nephrin, which was another podocyte-specific marker. SM22 α was not detected in glomeruli in normal control mice and rats. It was suggested that SM22 α was a molecule that newly appeared during the inflammatory phenotypic change of podocytes. And, it has been revealed that SM22 α appeared in not only the glomerular injury, but also in interstitial cells by the long-term observation of crescent forming glomerulonephritis model, preceding to the interstitial injury. By the observation with an immunoelectron microscopy (immuno-gold method), SM22 α was detected in parts where the foot process of podocytes had fused.

Then, to examine the specificity of SM22 α expression, its expression profiles were analysed in 3 kinds of renal injury models: 1) Ischemic-reperfusion (I/R) model, which showed only tubulointerstitial injury, 2) 5/6 nephrectomised model, which presented focal segmental glomerulosclerosis late after interstitial injury, 3) Puromycine aminonucleoside nephrosis (PAN), which showed transient podocyte injury. SM22 α was expressed in interstitial cells of the I/R model, first in interstitial cells and later in glomerular epithelial cells of the 5/6 nephrectomised model, and only in glomerular epithelial cells of the PAN. Thus, it may be possible to assume SM22 α as a marker, which present the specific disease condition before obvious morphologic changes caused by renal damages. Then, to examine the function of SM22 α expression, analyses has been started focusing on the difference of the development, the progression and the histological changes of the glomerulonephritis using anti-GBM nephritis between SM22 α -knockout mice and control mice.

Moreover, SM22 α was also detected in human glomerular diseases, and the relationship of its expression to severity of glomerular epithelial cell damage has been analyzed. In addition, several kinds of specific antibodies have been established in order to set up the system that can detect this molecule in urine. Its application as the biomarker of the human kidney disease is now under consideration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基盤研究）

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：なし

1. 研究開始当初の背景

本邦では透析療法を必要とする慢性腎不全患者が増加し、原因疾患の慢性腎臓病が心血管系に及ぼす多大な影響が問題となっていて、原因の解明と有効な早期診断法・治療法の開発が急務であった。申請者らは、DNAマイクロアレイを用いた腎炎モデルの腎臓における網羅的な発現遺伝子解析により、細胞性免疫系と糸球体レジデント細胞の相互作用による糸球体腎炎の病像を発現遺伝子プロファイルとしてデータ化していた。

2. 研究の目的

この網羅的発現遺伝子の解析結果から、(1)糸球体傷害に関わる分子機構を明らかにし、新しい機能分子の同定とその分子機能を解明するとともに、(2)病態理解のためのバイオマーカーとして臨床応用すること、そして(3)分子の機能に応じて治療のターゲット分子として新しい治療法の開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)特異抗体による病理組織での発現様式から病態との関連性の検討する：腎炎、あるいは非免疫学的機序による腎障害モデルにおいて、その発現部位と組織障害との関係、他の細胞成分との関連を、特異抗体を用いて経時的に観察し、病理学的意義を検討する。観察手法としては免疫染色法、免疫電子顕微鏡法を用いる。

(2)ノックアウトマウスを用いて分子機能を検討する：ノックアウトマウスとコントロールマウスに腎炎、あるいは非免疫学的機序による腎障害を惹起し、発症・進展・病理像の違いを詳細に解析する。

(3)尿検体による検出法の検討：蛋白泳動、

ウェスタンブロット、ELISA法あるいはPCR法により尿中に検出できるかを、バイオマーカーとしての応用が可能かを検討する。

4. 研究成果

発現が増加した遺伝子群の中でSM22 α 遺伝子に着目し、半月体形成性腎炎モデルの傷害を受けた糸球体の上皮細胞に発現することを見出した。ポドサイト特異マーカーであるポドカリキシンとの二重染色により、ポドサイトではポドカリキシンと共染色される細胞とどちらか一方が染色される細胞が観察される。また、もう一つのポドサイト特異マーカーであるネフリンとの二重染色では、ネフリンが消失したポドサイトにSM22 α が検出された。正常マウスおよび正常ラットでは糸球体にSM22 α の発現は認められなかった。このことからSM22 α は傷害を受けたポドサイトの炎症性形質変化に伴って新たに発現してくる分子であることが推測された。そして腎炎モデルの長期観察により、SM22 α は糸球体障害だけでなく、その後引き起こされる間質障害に先行して間質細胞にも発現することも解った。免疫電子顕微鏡（immuno-gold法）での観察により、糸球体上皮に発現するSM22 α はfoot processが融合した部分に一致して局在することが確認された（論文発表済）。

1)尿細管間質障害を特異的に惹起するモデル、2)間質障害の後に糸球体障害を生ずるモデル、3)糸球体上皮障害だけを一過性に生ずるモデルでの発現動態観察を行うと、1)では間質細胞だけに、2)では間質細胞、糸球体上皮細胞の順に障害の発生する順に、3)では糸球体上皮細胞だけに発現した。以上から、形態学的変化が生じる以前の、病

態特異的腎細胞障害マーカーとすることができ
る可能性があることが示された(論文採択済
済)。

また、SM22 α ノックアウトマウスとコントロ
ールマウスに抗糸球体基底膜抗体腎炎を惹起
し、糸球体腎炎の発症・進展・病像の違いを
詳細に解析した(論文を投稿中)。

また、ヒトの腎症においてもこの分子の発
現が認められることを見出し、糸球体上皮障
害との関連を解析して発表した(論文投稿中
)。さらに、この分子を尿中に検出するシス
テムを確立するため、数種の特異抗体を作成
し、ヒト腎疾患のバイオマーカーとしての応
用を検討している(方法論を特許出願および
論文発表済)。

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 6 件)

1. Sakamaki Y, Sakatsume M, Wang X et al
(8 人): Injured kidney cells express
SM22 α (Transgelin): Unique features
distinct from α SMA. Nephrology (in
press), 2010 査読有
2. 坂爪 実: 尿の免疫細胞解析 腎と透
析: (特集) 尿からさぐる病態と疾患
67(6):819-822, 2009 査読無
3. Nakayama A, Sakatsume M, Kasama T
et al (8 人): Molecular heterogeneity of
urinary albumin in glomerulonephritis:
comparison of cardiovascular disease with
albuminuria. Clinical Chemistry Acta
402(1-2): 94-101, 2008 査読有
4. Ajiro J, Alchi B, et al(9 人,6 番目):
Mortality predictors after 10 years of
dialysis: a prospective study of Japanese
hemodialysis patients. Clin J Am Soc
Nephrol 2(4): 653-660, 2007 査読有
5. Ogawa A, Sakatsume M, Sakamaki Y, et
al (11 人): SM22 α : The novel phenotype
marker of injured glomerular epithelial
cells in anti-glomerular basement
membrane nephritis. Nephron
Experimental Nephrology 106(3):
e77-e87, 2007 査読有
6. Sakatsume M, Kubota R, Ogawa A et
al(7 人): The rapid and sensitive
electrophoresis of urinary protein clearly

reveals the pathophysiological feature of
renal diseases. Nephrology 12(2):
191-196, 2007 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 坂爪 実: 尿赤血球・尿蛋白泳動・尿免
疫細胞解析が示す腎病態 第 41 回日本
臨床検査自動化学会 シンポジウム
2009 年 10 月 10 日 横浜
2. 王 興智: ヒト腎疾患およびラット腎疾
患モデルにおける糸球体上皮細胞障害
分子 SM22 α 発現の病理学的意義 第 52
回日本腎臓学会総会 2009 年 6 月 3 日
横浜
3. 猪俣 繁 各種腎障害モデルにおける
腎細胞障害マーカー SM22 α の発現 第
52 回日本腎臓学会総会 2009 年 6 月 3
日 横浜
4. Inomata S, Sakatsume M, et al: The novel
marker of injured kidney cells, SM22 α , in
various models of renal diseases. Annual
meeting of American Society of
Nephrology 2008 年 11 月 4 日 アメリカ合
衆国 (フィラデルフィア)
5. Wang X, Sakatsume M, et al: The nov
el marker of injured kidney cells, SM22
 α , in rat adriamycin-induced nephropath
y and in human. Annual meeting of A
merican Society of Nephrology 2008 年
11 月 4 日 アメリカ合衆国 (フィラデルフィ
ア)
6. 坂爪 実: 腎臓病の尿バイオマーカー
: 尿の免疫細胞解析と尿蛋白分析.
第 51 回日本腎臓学会学術総会 シンポ
ジウム 2008 年 5 月 30 日 福岡
7. Wang X, Sakatsume M, et al: The nov
el marker of injured kidney cells, SM22,
in human glomerulonephritis. Annual me
eting of American Society of Nephrolog
y 2007 年 11 月 2 日 アメリカ合衆国 (サ
ンフランシスコ)
8. Sakamaki Y, Sakatsume M, et al: The n
ovel marker of injured renal cells, SM2
2, in the chronic phase of glomeruloneph
ritis. Annual meeting of American Socie
ty of Nephrology 2007 年 11 月 3 日 アメ
リカ合衆国 (サンフランシスコ)

〔図書〕(計1件)

Sakatsume M: Proceedings of the 22th Niigata Symposium of Nephrology: Inflammatory and immune responses against nephritogenic stimuli. KOKO-DO, p1-11, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 銀染色を用いる電気泳動法により腎疾患などの病態を判定する方法

発明者: 坂爪実ほか

権利者: 常光(株)ほか

種類: 特許

番号: 特願 2008-47281

出願年月日: H20. 2. 28

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 腎疾患の活動性判定法及びその装置

発明者: 坂爪実ほか

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 第 4487081

取得年月日: H22. 4. 9

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂爪 実 (SAKATSUME MINORU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 70334662

◇ 研究協力者

小川 麻 ・大学院生

酒巻 裕一 ・大学院生

猪俣 繁 ・大学院生

王 興智 ・大学院生

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

