

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790597  
 研究課題名（和文） 新規足細胞保護因子および傷害因子の同定と  
 新たな糸球体再生・修復治療法の開発  
 研究課題名（英文） Research for novel podocyte-protective and podocyte-destructive  
 factors for development of glomerular regeneration therapy  
 研究代表者  
 澤井 一智（SAWAI KAZUTOMO）  
 国立循環器病センター研究所・生化学部・特任研究員  
 研究者番号：80393213

研究成果の概要：人工腎臓（透析）治療中の末期腎不全患者は国内で27万人を突破し、その右肩上がりの増加にもかかわらず腎臓病の根本的治療法は存在しない。これは腎臓病特異的な傷害機序が十分に解明されていないことに起因するが、特に腎臓の血液濾過装置を構成する糸球体足細胞（podocyte）の傷害は新しい腎臓特異的な治療標的として注目されている。そこで足細胞に焦点を絞り「足細胞傷害因子」および「足細胞保護因子」の探索を行い、候補因子の同定に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学、podocyte、糸球体足細胞、ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓内科が対処すべき最大の課題のひとつに「末期腎不全へ進行する腎疾患の克服」があるが、現時点ではその根本的な治療法は存在しない。その原因のひとつに、糸球体硬化性病変の原則的不可逆性が挙げられる。特に podocyte の傷害が不可逆的な糸球体硬化への主たる原因であると考えられているが (*Physiol Rev* 83:253, 2003)、これは podocyte

が再生能を持たず、高度に分化した細胞であることと関連している。

そこで研究代表者は、糸球体再生・修復機構の解明目的に、修復性糸球体腎炎（Thy-1腎炎）の糸球体修復時に発現亢進する podocyte 特異的遺伝子のスクリーニングを行い、CCN1 (Cyr61)、Sema3C、新規セリンプロテアーゼ SL451 を含む 40 個の遺伝子を同定した (*J Am Soc Nephrol*, 2002, abstract)。

その中で、血管新生因子 CCN1 に注目し、糸球体修復過程に podocyte が分泌因子を介して関与している可能性を初めて提唱した (*J Am Soc Nephrol* 14:1154, 2003)。更に、ヒト腎症における CCN1 の podocyte における発現低下がメサンギウム拡大に関与している可能性を示し、動物モデルとして podocyte 特異的 CCN1 過剰発現マウスを作製し、この糖尿病モデルでの糸球体腫大抑制を含めた腎症改善効果を報告した (第 49 回日本腎臓学会学術集会、2006)。さらに糖尿病性腎症では、アルブミン尿出現以前から podocyte 関連遺伝子発現変化が見られること (*Diabetes* 55:2747, 2006)、またヒト糖尿病性腎症顕性蛋白尿期の podocyte におけるギャップ結合蛋白 connexin43 の局在異常が、腎予後と強い相関を示すことを報告し (*Nephrol Dial Transplant* 21:2472, 2006)、糖尿病性腎症進展における podocyte 機能異常の重要性を示した。

このように、研究代表者は腎症や糸球体修復における podocyte の新しい機能を明らかにし、それらの機能異常が腎症進展に関与することを報告してきたが、その一方で、podocyte のこれらの機能維持にどのような因子が関与しているかについてはいまだに不明な点が多い。さらに腎症においては、特に巣状糸球体硬化症では、1) 腎臓移植後に再発する確率が約 40%と高率であり、吸着療法が功を奏することから液性因子の関与が示唆されている (*N Engl J Med* 330:7, 1994)、2) 腎移植後再発患者血漿中に蛋白尿を惹起する因子が存在すること (*N Engl J Med* 334:878, 1996)、3) この因子は直接 podocyte へ作用し、podocyte 細胞内カルシウム濃度を上昇させること (*J Am Soc Nephrol* 16:629, 2005)、4) LDL アフェレーシスの治療効果の認められる症例が存在し、既に日本で保険が

適応されていることが知られているが、最初の報告から 10 年以上が経過した今日に至ってもこの進行性再発性糸球体硬化症の原因因子はいまだに同定されていない。この停滞の原因としては、ヒト podocyte で本来の機能を維持した培養細胞系が最近になるまで開発されていなかったこと (*J Am Soc Nephrol* 13:630, 2002)に加え、podocyte の機能維持に働く「podocyte 保護因子」や蛋白尿を惹起する「podocyte 傷害因子」が単独ではない可能性や、この因子がヒト podocyte 特異的に作用する新規な因子であるために、ヒト podocyte を用いた特異的なスクリーニングの系が必要であることなどが考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の 3 点を目的として研究を行う。

(1) 進行性糸球体硬化症の新しい治療法の開発を確立するために podocyte に焦点を絞り、巣状糸球体硬化症の腎移植後再発患者血漿中における「podocyte 傷害因子」の同定を行う。

(2) ラットやブタの各種臓器抽出液のヒト培養 podocyte への反応性から、podocyte の形態・機能維持に必要な内因性「podocyte 保護因子」の同定を行なう。

(3) これらの新規「podocyte 保護因子」ならびに「podocyte 傷害性因子」の動物モデルへの投与、および、発生工学的な手法を用いて、糸球体硬化に対する新しい治療法開発の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 糸球体硬化に関わる新規「podocyte 傷害因子」の探索

- ① 巣状糸球体硬化症の腎臓移植後再発患者血漿を用いた因子の同定

英国ブリストル大学の Moin Saleem 博士か

ら供与された、腎臓移植後に巣状糸球体硬化症を再発した患者の血漿を、まず SEPPAK C18 カラムや SP や CM Sepharose といったイオン交換樹脂にて分子量により大まかに分画する。次に pH6.5 や pH4.8 条件下での CM イオン交換 HPLC や symmetry C18, diphenyl, chemcosorb 3-ODS などの各種逆相 HPLC により数百の分画に分離する。それぞれの画分に対する podocyte の反応性を、同じく同博士から供与されたヒト培養 podocyte (*J Am Soc Nephrol* 13:630, 2002) に対する反応性を、細胞内カルシウム変化を FLIPR で、細胞内 cAMP 変化を Fusion-Alpha で、actin や microtubules といった細胞骨格や、nephrin、podocin、CD2AP などといったスリット膜関連因子の発現量や局在の変化を INCELL analyzer を用いて検討し、活性因子を含む分画を同定する。HPLC にて純化した後、プロテインシークエンサーや質量分析機を用いて構造決定を行なう。

#### ② 巣状糸球体硬化症の LDL アフェレーシスカラム吸着因子を用いた因子の同定

同じく上記培養ヒト podocyte の反応性を用いて、LDL アフェレーシスカラム（デキストラン硫酸）に吸着した因子を 5%NaCl 溶液にて溶出し、Spectra Por Membrane を用いて透析し塩を除去し、50mM リン酸 buffer に置換する。次に CM Sepharose イオン交換樹脂にて 50mM、100mM、150mM、200mM、300mM、400mM、500mM NaCl/50mM リン酸 buffer にて溶出される分画に分離し、Centricon にて濃縮する。このようにして得られた分画を用いて、上述と同様にヒト podocyte の反応性を指標に、活性因子を含む画分を同定し、上記と同様に HPLC を用いて新規生理活性因子の単離・同定を行なう。

#### (2) Podocyte 機能維持に関わる新規「podocyte 保護因子」の探索

ラットおよびブタの内臓脂肪、大脳、小脳、視床下部、脊髄、脳幹、肺、心房、心室、肝臓、脾臓、小腸、十二指腸、腎臓、精巣などの組織を煮沸後、1M 酢酸でホモジェナイズした抽出液をアセトン沈殿し、その上清を SEPPAK C18 カラムで分離し、凍結乾燥する。これを SP sepharose カラムにて 2M pyridine、2M pyridine/酢酸溶液にて溶出される画分に分離する。さらにそれぞれの画分を Sephadex-G50 ゲル濾過にて分画し、それぞれの画分に対する培養ヒト podocyte の反応性を指標に、活性因子を含む画分を同定し、上記と同様に HPLC を用いて新規生理活性因子の単離・同定を行なう。

#### 4. 研究成果

##### (1) 巣状糸球体硬化症に関わる新規「腎傷害因子」の探索

巣状糸球体硬化症再発患者血漿ならびに LDL-A 吸着因子をイオン交換、逆相 HPLC により数百の分画に分離し、それぞれの画分に対する培養足細胞、メサンギウム細胞、尿細管細胞に対する反応性を細胞内カルシウム・cAMP 変化で検討し、活性因子を含む分画を同定、純化後、プロテインシークエンサーや質量分析機を用いて構造決定を行なった。培養足細胞に関しては、細胞内カルシウム変化を来す主成分はブラジキニンおよびヒドロキシプロリルブラジキニンであることが判明した。また、疾患再発時患者血漿中には高分子量キノノーゲンが正常コントロールおよび患者寛解期血漿中と比較して有意に多く含まれていた。現在その病態的意義に関して研究中である。

##### (2) 糸球体細胞、尿細管細胞の機能維持に関わる新規「腎保護因子」の探索

ラットおよびブタの組織を煮沸後、抽出液をアセトン沈殿し、その上清を分離し、凍結乾燥する。これを SP sepharose カラム、ゲル濾過にて分画し、それぞれの画分に対する培養足細胞、メサンギウム細胞、尿細管細胞の反応性を指標に、活性因子を含む画分を同定し、HPLC を用いて新規生理活性因子の単離・同定を行なった。活性因子としては、既知のものとしてリジンバゾプレッシン、アルギニンバゾプレッシン、EGF、プロスタグランジン E2 などが同定され、引き続き解析を続けている。

これらの腎疾患特異的に作用する因子の探索研究は、腎疾患発症機序の本質に直結する可能性のある研究であり、国内のみならず世界中からその成果が注目されている。

#### 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 3 件)

- (1) Nagae T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Tanaka I, Sugawara A, Kuwahara T, Nakao K. Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int* 74:70-80, 2008. 査読有
- (2) Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int.* 73: 446-455, 2008. 査読

有

- (3) Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Koshikawa M, Yokoi H, Yoshioka T, Ogawa Y, Sugawara A, Nishiyama H, Yamada S, Kuwahara T, Saleem MA, Shiota K, Ogawa O, Miyazato M, Kangawa K, Nakao K. Expression of CCN1 (CYR61) in developing, normal, and diseased human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1363-F1372, 2007. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 澤井一智、宮里幹也、Moin Saleem、寒川賢治、培養ヒト足細胞を用いた FSGS 因子の探索、第 53 回日本透析医学会学術集会・総会、2008 年 6 月 20 日、神戸

② 澤井一智、宮里幹也、Moin Saleem、寒川賢治、培養ヒト podocyte を用いた巣状糸球体硬化症の原因因子の探索、第 51 回日本腎臓学会学術総会、2008 年 5 月 30 日、福岡

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

澤井 一智 (SAWAI KAZUTOMO)

国立循環器病センター研究所・生化学部・特任研究員

研究者番号：80393213

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし