

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08686

研究課題名(和文) 創薬のための統合オミックス解析による難治性ネフローゼの病因・病態探索

研究課題名(英文) Integrated omics analysis for drug discovery of intractable nephrotic syndrome

研究代表者

楊 國昌 (YAN, KUNIMASA)

杏林大学・医学部・客員教授

研究者番号：70255389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウスにポドサイトCRB2に対する抗体を産生させた新規のネフローゼモデルを樹立した。抗CRB2抗体-CRB2結合は、その下流のezrinリン酸化とアクチンの偏位によるポドサイト足突起の癒合を形成させ、尿蛋白を惹起させた。この足場分子であるCRB2に結合する生理的免疫分子(chemokineX)を同定し、そのCRB2に作用する下流もezrinであることを証明した。本モデルの糸球体では、ミトコンドリア関連分子群の蛋白発現が著明に亢進していた。以上のことから、本モデルにおける創薬の標的パスウェイは、ezrinリン酸化系とmitochondria biogenesisであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤抵抗性ネフローゼは、小児と成人領域に共通する末期腎不全に至る難治性疾患である。現在、糖質ステロイドや免疫抑制薬が治療の柱として使用されているが、その効果は限定的である。近年の創薬研究は、細胞内のキナーゼ活性化経路を標的とする事が多いが、ネフローゼにおいては、いまだそのようなアプローチは存在しない。本研究は、生理的分子をシグナリングの責任分子とした新規のネフローゼマウスモデルを開発した。本モデルは、ネフローゼの病態を惹起するキナーゼ活性化経路の同定のツールに使用できる。

研究成果の概要(英文)：The present study developed novel mouse model resembling human nephrotic syndrome by means of generating antibody against podocyte plasma membrane protein Crb2 in mice. Anti-CRB2 antibody binding to CRB2, activated ezrin phosphorylation and actin reorganization, leading to nephrotic range of proteinuria. The present study also identified novel physiological ligand of CRB2, chemokineX, which also activated ezrin phosphorylation and actin reorganization. Glomeruli in nephrotic mouse exhibited upregulation of mitochondria related molecules. Taken together, we concluded that ezrin pathway and mitochondrial biogenesis may be targets for developing novel drugs against intractable nephrotic syndrome.

研究分野：腎臓病

キーワード：ネフローゼ ポドサイト キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の終末像は、末期腎不全である。難治性ネフローゼは、この慢性腎臓病の主要原因疾患である。難治性ネフローゼは、発症後から種々の免疫抑制薬治療が始まるが、多くは薬剤抵抗性であり、それによる副作用も深刻である。難治性ネフローゼの病変の主座は、腎糸球体上皮(ポドサイト)障害である。この病理像は、微小変化型、あるいは巣状糸球体硬化型であるが、これらの病態、すなわちポドサイト障害に至る代謝パスウェイは未知である。このパスウェイこそが、新規の抗ネフローゼ薬の作用標的部位である。

2. 研究の目的

我々は、予備実験として、ポドサイト特異的細胞膜蛋白分子である crumbs2 (CRB2) 機能異常を介した新規の後天性ネフローゼモデルを樹立していた。このモデルは、CRB2 を介する outside-in signaling を端緒とするポドサイト障害によるネフローゼであり、ポドサイト障害の重症度依存性に、ヒトの微小変化型および巣状糸球体硬化型の病理像を呈した。本研究の目的は、本モデルマウスのポドサイト障害の病態を詳細に探索し、またオミックス解析により、本モデルでの各病型の病態特性、重症度バイオマーカー、ポドサイト内治療標的代謝部位の同定を行うことである。

3. 研究の方法

- 1) CRB2 out-side in signaling マウスモデルの確立。リコンビナント CRB2 の 3 回免疫法に加え、1 回免疫法による再現も行った。尿蛋白の推移、腎組織像、血清抗 CRB2 抗体の同定、糸球体および培養ポドサイトにおけるリン酸化パスウェイの解析を行った。
- 2) CRB2 に結合する生理的液性因子の同定。胸腺ライブラリーを材料に、CRB2 細胞外ドメインに結合する免疫成分(液性因子)を、yeast-2-hybrid system で探索した。同定された分子と CRB2 の結合性を、免疫沈降と免疫染色で確認を行った。
- 3) ネフローゼマウスの単離糸球体のタンパク試料を用いて、比較質量分析を行った。

4. 研究成果

リコンビナント皮下注 1 回法も 3 回法と同様に、免疫 4 週後から 100% の確立でネフローゼレベルの蛋白尿が惹起された。ただし、3 回法のマウスでは、1 回法に比して有意に尿蛋白量は多く、その約半数が血尿を伴い、それらの組織像は全て巣状糸球体硬化型であった。残りの群は、全て微小変化型であった。ネフローゼマウスでは、尿蛋白の出現時期と同時期に、血清中の抗 CRB2 抗体が同定されたが、そのレベルと蛋白尿の程度は相関しなかった。最も蛋白尿の程度と関連があったものは、糸球体ポドサイトにおける抗 CRB2 抗体の沈着強度であった。糸球体および CRB2 発現培養ポドサイトを用いた検討から、抗 CRB2 抗体-CRB2 結合の下流には、ezrin のリン酸化亢進、それによるアクチンの再構成の発動が存在すること、その結果、ポドサイト足突起の癒合が起きることがネフローゼの主病態であることが判明した。本研究では、人為的に抗 CRB2 抗体を作成させた系である。しかし、現在のところ、ヒトの特発性ネフローゼの液性因子として、抗 CRB2 抗体が同定されたとする報告はない。そこで、本研究は、生理的に存在する CRB2 に結合可能な液性免疫分子を探索した。その結果、胸腺やリンパ節に高発現する chemokine-X がスクリーニングされた。シアル酸欠損細胞などを用いた免疫沈降法により、CRB2 とこの chemokine-X の結合は、シアル酸を介することが判明した。CRB2 発現培養ポドサイトに chemokine-X を添加したところ、やはり ezrin のリン酸化亢進がみられ、単離糸球体における添加では、著明な足突起の癒合が観察された。以上のことからこの chemokine およびそのファミリーが、ネフローゼの惹起液性分子である可能性が示唆された。本研究におけるもう一つのポイントは、同一の etiology により、2 つの組織像が形成されたことである。そこで、高度蛋白尿ではあるが、血尿の発症以前(糸球体硬化にいたる直前と推定される時期)の糸球体を試料に質量解析を行った。ネフローゼの単離糸球体がコントロールに比して 2 倍以上の高発現を示した 187

の分子のうち、ミトコンドリア関連分子が 88 (47%) と高率に観察された。以上のことは、本ネフローゼの病態に、CRB2 を足場としたポドサイト内のシグナリング活性化によるエネルギー消費とミトコンドリア機能異常とのクロストークが関与することが強く推測された。これは、ヒトネフローゼの病態における新知見であり、新規抗ネフローゼ薬の標的パスウェイの一つは、ミトコンドリアエネルギー産生系でもあることを示唆した。今後の研究としては、まずは ezrin リン酸化の下流としての cofilin のリン酸化を含んだパスウェイに作用する化合物のスクリーニングを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ichiro Hada
2. 発表標題 A novel mechanism of podocyte injury in crumbs-homolog2-mediated nephrotic syndrome in mice
3. 学会等名 International Pediatric Nephrology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽田伊知郎
2. 発表標題 Crumbs2を足場としたネフローゼモデルマウスの樹立
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽田伊知郎
2. 発表標題 ポドサイトCrb2を自己免疫の標的分子とした 特発性ネフローゼ類似マウスモデルの樹立
3. 学会等名 日本腎臓病学会
4. 発表年 2022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 分 担 者	清水 章 (Shimizu Akira) (00256942)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田中 絵里子 (Tanaka Eriko) (80439827)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	

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