

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590950

研究課題名(和文)糸球体上皮細胞スリット膜保護による新規蛋白尿治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapy for proteinuria

研究代表者

河内 裕 (KAWACHI HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60242400

研究成果の概要(和文)：蛋白尿に対する新規治療法、診断法開発のターゲットとなる分子を特定するための研究を進めた。アンジオテンシン II の2型受容体刺激、シナプス小胞関連分子の活性化はスリット膜保護に向けた重要な戦略となること、スリット膜部に発現している NEPH1 の発現形式の観察、尿中に漏出するポドプラニンの検出は糸球体上皮細胞傷害の早期マーカーとして有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to identify the target molecules for establishment of a novel therapy for proteinuria. This study demonstrated that the stimulation to type II receptor of angiotensin II and the enhancement of the function of synaptic vesicle molecules have protective effects for slit diaphragm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：蛋白尿、糸球体上皮細胞、スリット膜、アンジオテンシン、ポドプラニン、シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全の治療法は、透析療法、腎移植しかなく、腎移植療法は限られた患者しか機会がないというのが現状である。全国で25万人(日本人の500人に1人)以上の方が血液透析もしくは、腹膜透析療法を受けている。血液透析療法に要する総コストは、年間1兆円を超えていると報告されている。また持続蛋白尿、腎機能低下を示す慢性腎臓病(CKD)の患者数は、480万人と推定されている。慢性腎臓病患者は透析に至る可能

性が高いばかりでなく、心血管イベントのリスクが高く死亡率が高い集団であると考えられている。蛋白尿は、糸球体障害を示す指標であるだけでなく、腎不全進行の悪化因子であること、心、脳血管イベントの危険因子であることが明らかになっていることが明らかになっている。このような現状において、慢性腎臓病、蛋白尿の発症・進行機序の解明、治療法の確立は、極めて重要な国民的課題である。

2. 研究の目的

蛋白尿を抑制することは、多くの種類の腎臓病の予後を改善することにつながると考えられるが、既存の蛋白尿治療法は充分でなく、蛋白尿の発症機序の解明も充分に進んでいない。研究代表者らのグループは、糸球体上皮細胞の足突起間に存在するスリット膜と呼ばれるフィルター様の構造が、血清蛋白の漏出を防ぐバリアーとして極めて重要な役割を果たしていること、多くの病態における蛋白尿発症の責任部位がスリット膜であることを明らかにしてきた。本研究の目的は、スリット膜保護による新規蛋白尿治療法の開発に向けた基礎研究を進めることである。

3. 研究の方法

研究代表者は、これまでの研究から新規治療法の有望なターゲット分子の候補として①シナプス小胞関連分子、②糸球体局所のアンジオテンシン作用を制御する分子、③スリット膜近傍に発現する膜蛋白が有望であると考えた。これらの分子群の発現動態、スリット膜機能維持に果たす役割、新規治療法、診断法開発にターゲット分子としての有用性についての解析を行った。

(1) 発現動態についての検討。

①動物モデル材料での検討。

微小変化型ネフローゼ症候群モデル (PAN 腎症)、巣状糸球体硬化症モデル (ADR 腎症)、膜性腎症モデル (ヘイマン腎炎) における発現動態、機能変化の解析を行った。解析は免疫組織学的検討、可溶化材料を用いた Western blot 法、RNA 材料を用いた RT-PCR 法で行った。

②培養糸球体上皮細胞を用いた検討。

糸球体上皮の培養細胞は、P. Mundel 博士が分離、確立した細胞を用い検討を行った。

(2) 糸球体上皮細胞 (スリット膜) 機能維持に果たす候補分子の役割の検討。

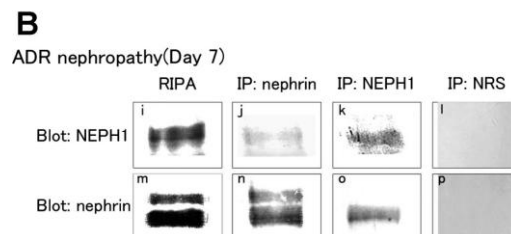
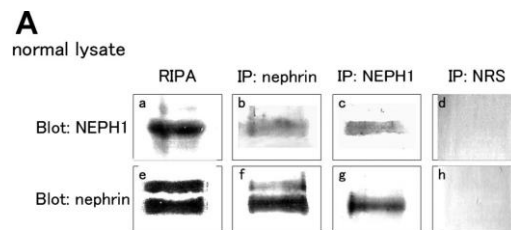
①siRNA 技術を用い候補分子をノックダウンさせた培養糸球体上皮細胞の形態の観察、スリット膜関連分子群の局在、発現の検討を行った。

②リコンビナント (GST fusion protein) 材料を正常および傷害培養糸球体上皮細胞に添加し細胞の生存率、viability、形態の変化、スリット膜関連分子の発現についての検討を行った。

③培養糸球体上皮細胞をこれらの分子を強制発現させた COS cell と共培養し、形態の変化を検討した。

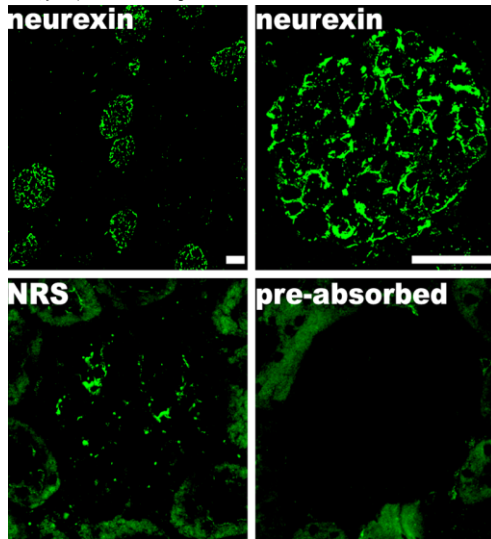
4. 研究成果

(I) スリット膜関連分子である NEPH1 は糸球体上皮細胞障害の早期マーカーとして有用であること、nephrin と乖離した NEPH1 量をモニターすることにより病態の予後を予測できることを明らかにした。下図は nephrin と NEPH1 の結合性を解析した免疫沈降法所見である、(A) 正常糸球体では nephrin-NEPH1 が結合している (b, g)。予後の悪い病態である巣状糸球体硬化症のモデルである ADR 腎症材料 (B) では、極めて初期 (蛋白尿の発症が見られる直前) から、既に両者が乖離している (j)。



(2) 前シナプス膜分子である Neurexin が糸球体上皮細胞に発現しており、蛋白尿発症時にその発現が著明に低下していること、PDZ 結合部位を介して CASK と結合し細胞骨格と連結していること、CD2AP を介してスリット膜と連結していること、Neurexin は多くの splice variant を有するが、糸球体に発現している分子型は splice site#1+, #2-, #3+, #4+, #5+ の 1 種類だけであること、Neurexin を siRNA 法にてノックダウンさせた細胞では突起形成が抑制されることを明らかにした。

下図は糸球体におけるNeurexinの免疫蛍光法所見である。糸球体上皮細胞に発現が観察される。



(3) 糸球体上皮細胞膜分子であるポドプラニンは、足突起の全周、スリット膜部に強く発現していることを示した(下図、免疫電顕像)病態での検討で、ポドプラニンは微小変化型ネフローゼ症候群モデルで病変初期から尿中に遊離することを観察した。また、小児腎生検材料での検討を行い、微小変化型ネフローゼ症候群患児の糸球体ではポドプラニンの発現が低下していることを観察した。ポドプラニンは糸球体上皮細胞傷害のマーカーとして臨床応用可能であると考えられる。ポドプラニンの分子性状についての検討を進め、ポドプラニンはエズリンを介して細胞骨格と連結していること、微小変化型ネフローゼ症候群モデルでは、ポドプラニンとエズリンの結合性が変化していることを観察した。エズリンと乖離したポドプラニンは尿中にリリースされることを示した。病態におけるポドプラニンの発現低下は合成低下でなくリリースの亢進による部分が大きいと考えられること、膜表面におけるポドプラニンの低下が蛋白尿発症の引き金になることを示した。これらの観察結果から、ポドプラニン-エズリン複合体が糸球体上皮細胞の構造維持に重要な役割を果たしていること、この結合の維持が治療ターゲットとなると考えられた。



(4) 微小変化型ネフローゼ症候群モデルにおける Angiotensin II 1型受容体阻害薬(ARB)の効果、作用機序の検討を行った。ARBは、スリット膜の細胞外部を構成する分子の1つである NEPH1 の発現低下を顕著に抑制することを観察した。ARBは、NEPH1などのスリット膜関連分子に対する保護作用により極期の蛋白尿を改善させることを明らかにした。

以上、報告したように本研究費補助金による研究で、蛋白尿の新規治療法、新規診断法開発のための標的分子を特定した。臨床応用に向けた今後の研究に重要な情報を与えることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計27件)

1. Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M, Sumi T, Tomita M, Ikezumi Y, Suzuki K, Koitabashi Y, Shimizu F, **Kawachi H**. Neurexin-1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol*; 300: R340-8. 2011 (査読有)
2. Suzuki K, Sun X, Nagata M, Kawase T, Yamaguchi H, Sukumaran V, Kawachi Y, **Kawachi H**, Nishino T, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathol Int.*; 61:228-238. 2011 (査読有)
3. Ohtsuka Y, Kanaji T, Nishi M, Sakai N, Sato T, Aoki S, Wakayama K, Nakazato S, Hisano S, Sado Y, **Kawachi H**, Izuhara K, Hamasaki Y. A notable case report of May-Hegglin anomaly with immune complex-related nephropathy: a genetic and histological analysis. *Clin Nephrol.*; 75:255-262. 2011 (査読有)
4. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, Narita I, **Kawachi H**, Polkinghorne KR, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset

- paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology*. 58:198-210, 2011. (査読有)
5. Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, Kimura T, Kitamura H, **Kawachi H**, Li XK, Hünig T, Takahara S, Rakugi H, Isaka Y. CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol*.15:50-7. 2011 (査読有)
 6. Tanaka M, Asada M, Higashi AY, Nakamura J, Oguchi A, Tomita M, Yamada S, Asada N, Takase M, Okuda T, **Kawachi H**, Economides AN, Robertson E, Takahashi S, Sakurai T, Goldschmeding R, Muso E, Fukatsu A, Kita T, Yanagita M. Loss of the BMP antagonist USAG-1 ameliorates disease in a mouse model of the progressive hereditary kidney disease Alport syndrome. *J Clin Invest*. Mar;120:768-77,2010 (査読有)
 7. Zhu J, Attias O, Aoudjit L, Jiang R, **Kawachi H**, Takano T. p21-activated kinases regulate actin remodeling in glomerular podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 298:F951-61. 2010 (査読有)
 8. Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kondo S, Kinoshita Y, Suga K, Kitamura A, Matsuura S, Yoshizumi M, Tamaki T, **Kawachi H**, Kagami S. ERK5 activation enhances mesangial cell viability and collagen matrix accumulation in rat progressive glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*.;298:F167-76, 2010 (査読有)
 9. Fukuda A, Fujimoto S, Iwatsubo S, **Kawachi H**, Kitamura K. Effects of mineralocorticoid and angiotensin II receptor blockers on proteinuria and glomerular podocyte protein expression in a model of minimal change nephrotic syndrome. *Nephrology* 15:321-6, 2010 (査読有)
 10. Sun X, Suzuki K, Nagata M, Kawauchi Y, Yano M, Ohkoshi S, Matsuda Y, **Kawachi H**, Watanabe K, Asakura H, Aoyagi Y. Rectal administration of tranilast ameliorated acute colitis in mice through increased expression of heme oxygenase-1. *Pathol Int*. 2010 60:93-101.2010 (査読有)
 11. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, **Kawachi H**, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Contrasting effects of steroids and mizoribine on macrophage activation and glomerular lesions in rat thy-1 mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am J Nephrol*. 31:273-82, 2010 (査読有)
 12. Attias O, Jiang R, Aoudjit L, **Kawachi H**, Takano T. Rac1 contributes to actin organization in glomerular podocytes. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;114:e93-e106. (査読有)
 13. **Kawachi H**, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Suzuki K, Shimizu F. Therapeutic targets in the podocyte: findings in anti-slit diaphragm antibody-induced nephropathy. *J Nephrol*.;22:450-6. 2009 (査読有)
 14. Okada T, Sakaguchi T, Hatamura I, Saji F, Negi S, Otani H, Muragaki Y, **Kawachi H**, Shigematsu T. Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2 receptor antagonist, ameliorates podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephrotic rats. *Clin Exp Nephrol*.;13:438-46.2009 (査読有)
 15. Matsui I, Hamano T, Tomida K, Inoue K, Takabatake Y, Nagasawa Y, Kawada N, Ito T, **Kawachi H**, Rakugi H, Imai E, Isaka Y. Active vitamin D and its analogue, 22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant*; 24:2354-61. 2009 (査読有)
 16. **Kawachi H**, Suzuki K, Miyauchi N, Hashimoto T, Otaki Y, Shimizu F. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol*.;13:275-80. 2009 (査読有)
 17. Mii A, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, **Kawachi H**, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y. Angiotensin II receptor blockade inhibits acute glomerular injuries with the alteration of receptor expression. *Lab Invest*.;89:164-77. 2009 (査読有)
 18. Otaki Y, Miyauchi N, Higa M, Takada A, Kuroda T, Gejyo F, Shimizu F, **Kawachi H**. The dissociation of NEPH1 from nephrin

- is involved in the development of rat model of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F1376-87, 2008 (査読有)
19. Koop K, Eikmans M, Wehland M, Baelde H, Ijpelaar D, Kreutz R, **Kawachi H**, Kerjaschki D, de Heer E, Bruijn JA. Selective loss of podoplanin protein expression accompanies proteinuria and precedes alterations in podocyte morphology in a spontaneous proteinuric rat model. *Am J Pathol* 173:315-26, 2008 (査読有)
 20. Furuichi K, Wada T, Kitajikma S, Toyama T, Okumura T, Hara A, **Kawachi H**, Shimizu F, Sugaya T, Mukaida N, Narumi S, Matsushima K, Kaneko S. IFN-inducible protein 10 (CXCL10) regulates tubular cell proliferation in renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol.* 109: c29-38, 2008 (査読有)
 21. Wittmann S, Daniel C, Braun A, Vogelbacher R, Shimizu F, **Kawachi H**, Hugo C. The mTOR inhibitor everolimus attenuates the time course of chronic anti-Thy1 nephritis in the rat. *Nephron Exp Nephrol.* 108:e45-56, 2008 (査読有)
 22. Uchida K, Suzuki K, Iwamoto M, **Kawachi H**, Ohno M, Horita S, Nitta K. Decreased tyrosine phosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. *Kidney Int.* 73:926-32, 2008 (査読有)
 23. Krämer S, Kron S, Wang-Rosenke Y, Loof T, Khadzynov D, Morgera S, **Kawachi H**, Shimizu F, Martini S, Neumayer HH, Peters H. Rosuvastatin is additive to high-dose candesartan in slowing progression of experimental mesangioproliferative. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294: F801-811, 2008 (査読有)
 24. Krämer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, Khadzynov D, **Kawachi H**, Shimizu F, Diekmann F, Budde K, Neumayer HH, Peters H. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294: F440-449, 2008 (査読有)
 25. Nakhoul F, Khankin E, Yaccob A, **Kawachi H**, Karram T, Awaad H, Nakhoul N, Hoffman A, Abassi Z. Eplerenone potentiates the antiproteinuric effects of enalapril in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294: F628-637, 2008 (査読有)
 26. Zhu J, Sun N, Aoudjit L, Li H, **Kawachi H**, Lemay S, Takano T. Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney Int.* 73:556-566, 2008 (査読有)
 27. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, **Kawachi H**, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Use of mizoribine as a rescue drug for steroid-resistant pediatric IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 23:645-650, 2008 (査読有)
- [学会発表] (計 3 2 件)
(主要な国際学会発表のみ以下に記述)
1. Tomita M, Calcineurin is involved in the development of proteinuria in an experimental model of MCNS. 米国腎臓学会 2010 年 11 月 19 日, 米国デンバー
 2. Suzuki K, Expression of Podoplanin in MCNS: Urinary podoplanin is a Novel Marker to Predict Podocyte Injury. 米国腎臓学会 2009 年 10 月 31 日, 米国サンディエゴ
 3. Suzuki K, Podoplanin was expressed on both apical and basal surfaces of podocyte, and the basal podoplanin plays a role in maintenance of not only the foot process structure but also the barrier function of glomerular capillary wall. 米国腎臓学会 2008 年 11 月 6 日, 米国フィラデルフィア
 4. Han GD, An Adhesion Molecule Ninjurin-II Is Expressed in the Podocyte and Its Expression Is Altered in Podocyte with Slit Diaphragm Dysfunction 米国腎臓学会 2008 年 11 月 6 日, 米国フィラデルフィア
- [図書] (計 1 件)
河内 裕「専門医のための腎臓病学」医学書院、2009 年、p16-21.
- [産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

[学会以外での研究会での招待講演など]
(計21件) 主要なもの、以下

1. **河内 裕**:糸球体上皮細胞の新しい機能分子－蛋白尿の新規治療法開発のためのターゲット分子の探索－ 第31回腎臓セミナー、2009、東京
2. **河内 裕**:ポドサイト研究の最前線－臨床応用に向けての展望－第1回 Front J、2009、東京
3. **河内 裕**:スリット膜関連分子 - 最近の知見 - 第93回東京腎生理集談会、2008、東京

[ホームページ : <http://www.med.niigata-u.ac.jp/welcomej.html> にて成果の概要を報告]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 裕 (KAWACHI HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 60242400