

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20591278

研究課題名（和文）小児の進行性腎疾患における活性酸素種(ROS)の役割解明とその治療応用

研究課題名（英文）The role of reactive oxygen species (ROS) in the progressive kidney disease in children, and therapeutic strategy based on its mechanisms.

研究代表者 香美 祥二 (KAGAMI SHOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00224337

研究成果の概要（和文）：

腎炎進行での細胞形質制御機構として活性酸素種(ROS)の役割を検討した。WKYマスキ腎炎では、半月体形成部位に強いROS産生が認められ、NADPHオキシダーゼ構成蛋白の発現や細胞外基質(ECM)リモデリング異常などの細胞反応の発生時期と一致した。同時に、アンジオテンシンII(Ang II)産生、AngII受容体発現が認められた。培養実験では、Ang IIやH₂O₂刺激によるROSシグナル経路の検討を行い、ERK5のリン酸化亢進などのシグナル変化が観察された。siRNAを用いた検討により、ROSシグナル経路は細胞生存能などの細胞形質を亢進し、腎炎進行に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The role of reactive oxygen species for cell phenotypic changes was investigated in glomerulonephritis (GN). Increased ROS production was observed in crescents of GN. The increased ROS production was associated with enhanced Nox2 (an NADPH component) expression and parietal epithelial cell proliferation. We also observed the expressions of angiotensin II and its receptor. In addition, cultured glomerular cells stimulated with angiotensin II and H₂O₂ showed the enhanced phosphorylation of Erk5, a ROS-related MAPK family. Inhibition with siRNA showed that ROS-MAP kinase signaling pathway might enhance cell potential to survive, and thereby play a role in progression of glomerulonephritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学

メサンギウム細胞，ポドサイト，ボウマン囊上皮細胞，半月体，活性酸素，NAD(P)Hオキシダーゼ，腎炎進行，腎不全

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症、巣状分節性糸球体硬化症、紫斑病性腎炎等を代表とする小児の進行性腎疾患は、最近の治療法の進歩によりその予後に改善の兆しが見られるものの、未だ不幸にも腎不全に進行する患児が数多く存在している。従って、腎炎の進行機序の解明とその制御法の開発は小児腎疾患診療に携わる我々、小児科医にとって喫緊の課題である。従来より腎不全に至る進行性腎疾患には、糸球体メサンギウム細胞(MC)の活性化(MC増殖と細胞外基質(ECM)の産生増加)、糸球体ポドサイト(POD)障害による剥離・アポトーシス、活性化ボウマン嚢上皮細胞(PEC)の上皮-間葉移行(EMT)による半月体形成などといった糸球体構成細胞の形質変化が共通して認められ、最終的に糸球体硬化と称される腎炎末期像を呈するようになる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎炎の進行を左右する細胞形質変化の制御機構における活性酸素種(ROS)の役割を明らかにし、活性酸素産生系(NAD(P)H オキシダーゼ)や消去系をターゲットとした新しい腎炎治療法の開発に応用することである。

3. 研究の方法

1) 進行性糸球体病変における ROS の役割の組織学的検討

2) ラット進行性腎炎モデルにおける NAD(P)H オキシダーゼ活性の検討

3) 腎炎進行に関わる細胞形質変化における NAD(P)H オキシダーゼ由来 ROS の役割の細胞生物学的検討

4) 腎炎進行に関わる細胞形質変化を制御する ROS シグナル伝達経路の解析

4. 研究成果

1) 進行性糸球体病変における ROS の役割の組織学的検討

片腎Thy1腎炎及びWKYマスキ腎炎の糸球体をDHE染色を用いてROS 活性を検討したところ、MC増殖部位及び半月体形成部位に強いROS産生が認められ、それはNAD(P)Hオキシダーゼ構成蛋白(Nox2)の発現推移や腎炎におけるメサンギウムECMのリモデリング異常やPEC増殖などの細胞反応の発生時期とも一致していた。

片腎Thy1腎炎、WKYマスキ腎炎ともに、アンジオテンシンII(Ang II)産生、AngIIレセプター(AT1R)発現が認められ、それはメサンギウムECMリモデリングや半月体形成などの腎炎進行性の細胞反応に先行して観察された。興味深いことに、これらの変化はアンジオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB)およびROSスカベンジャーの投与により軽減された。

2) ラット進行性腎炎モデルにおけるNAD(P)Hオキシダーゼ活性の検討

WKY マスキ腎炎の単離糸球体を可溶性シグニンケミルミネッセンスアッセイを用いてNAD(P)Hオキシダーゼ活性の測定をおこなった。腎炎におけるMC活性化、EMTによる半月体形成などの細胞形質変化の発生時期と一致してNAD(P)Hオキシダーゼ活性が上昇していた。

3) ROSの役割の細胞生物学的検討と培養MCを用いたROSシグナル経路の検討

ROSにより活性化を受ける細胞シグナル分子Erk5に着目し、シグナル経路の検討を行った。培養MCをAng IIやH2O2にて刺激して、ROSシグナル経路を検討したところ、容量、時間依存性にERK5のリン酸化亢進が観察された。ERK5のsiRNAやにROS産生阻害薬による検討では、ROS-ERK5シグナル経路はMCの生存能やECM産生能などの細胞形質を亢進するものであり、腎炎進行に関与する可能性が示された。今後、ERK5シグナルにたいする特異的な経口阻害剤の開発やROS産生阻害薬 (NAD(P)Hオキシダーゼ特異的阻害剤) を用いて、更なる動物実験を行い薬物の安全性を確認した後に臨床応用に進めていきたい。

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 11 件)

1. Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, Shimizu M, Nishiyama A, Kawachi H, Kagami S. Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular RAS activation, oxidative stress, and glomerular injury in crescentic glomerulonephritis. *Translational Res* 2011 査読有 (in press)
2. 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*. 査読有 298:F167-176, 2010
3. Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Kobori H. Urinary angiotensinogen accurately reflects intrarenal Renin-Angiotensin system activity. *Am J Nephrol*. 査読有 31:318-325, 2010
4. Suga K, Kondo S, Matsuura S, Kinoshita Y, Kitano E, Hatanaka M, Kitamura H, Hidaka Y, Oda T, Kagami S. A case of dense deposit disease associated with a group A streptococcal infection without the involvement of C3NeF or complement factor H deficiency. *Pediatr Nephrol*. 査読有 25:1547-1550, 2010

5. 香美祥二 レニン・アンジオテンシン系 (RAS)の歴史と新展開 from bench to bed, 日本小児腎臓病学会雑誌 査読有査読有 23: 179-182, 2010
6. Saito T, Urushihara M, Kotani Y, Kagami S, Kobori H. Increased urinary angiotensinogen is precedent to increased urinary albumin in patients with type 1 diabetes. Am J Med Sci. 査読有 338:478-480, 2009
7. Oto J, Suga K, Matsuura S, Kondo S, Ohnishi Y, Inui D, Imanaka H, Kagami S, Nishimura M. Low-density lipoprotein apheresis in a pediatric patient with refractory nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis. J Anesth. 査読有 23:284-287, 2009
8. 香美祥二 メサングウム細胞でのシグナル伝達と糸球体腎炎 腎と透析 査読有 67 : 311 - 315、2009
9. Kanematsu Y, Yamaguchi K, Ohnishi H, Motobayashi Y, Ishizawa K, Izawa Y, Kawazoe K, Kondo S, Kagami S, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 査読有 295:F1457-1462, 2008
10. Kitamura A, Tsukaguchi H, Maruyama K, Shono A, Iijima K, Kagami S, Doi T. Steroid-resistant nephrotic syndrome. Kidney Int. 査読有 74:1209-1215, 2008
11. Takamatsu M, Urushihara M, Kondo S, Shimizu M, Morioka T, Oite T, Kobori H, Kagami S. Glomerular angiotensinogen protein is enhanced in pediatric IgA nephropathy. Pediatr Nephrol. 査読有 23:1257-1267, 2008

[学会発表] (計6件)

1. 15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association (IPNA) (2010年8月29日~9月2日、New York, USA) Matsuura S, Kondo S, Suga K, Kinoshita Y, Tamaki T and Kagami S. Expression and localization of focal adhesion proteins in the developing rat kidney.
2. 15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association (IPNA) (2010年8月29日~9月2日、New York, USA) Kinoshita Y, Kondo S, Suga K, Matsuura S,

Urushihara M, Kagami S: Candesartan Suppresses Glomerular Renin-Angiotensin System (RAS) Activation, Oxidative Stress and Progressive Glomerular Injury in Rat Anti-GBM GN

3. ISN-Nexus Kyoto Symposium 2010 April 15 - 18, 2010 at Kyoto

Kondo S, Suga K, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Tamaki T, Kagami S. Enhanced expression of Hic-5 is involved in the development of human and rat mesangioproliferative glomerulonephritis.

4. The American Society of Nephrology Renal Week 2009 (2009年10月27日-11月1日, San Diego, CA, USA)

Kondo S, Suga K, Matsuura S, Kinoshita Y, Tamaki T and Kagami S: Expression and localization of proteins in focal adhesion in the developing rat kidney.

5. The American Society of Nephrology Renal Week 2008 (2008年11月4-9日, Philadelphia, Pennsylvania, USA)

Suga K, Kondo S, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Tamaki T, Kagami S: Enhanced expression of Hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) on activated mesangial cells in human glomerulonephritis.

6. The American Society of Nephrology Renal Week 2008 (2008年11月4-9日, Philadelphia, Pennsylvania, USA)

Kondo S, Suga K, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Tamaki T, Kawachi H, Kagami S: The Expression of Hic-5 Is Involved in the Development of Progressive Glomerulonephritis in the Rat.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tokudai-pediatrics.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香美 祥二 (KAGAMI SHOJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：00224337

(2) 研究分担者

近藤 秀治 (KONDO SHUJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00380080

六反 一仁 (ROKUTAN KAZUHITO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：10230898

(3) 連携研究者

研究者番号：