

平成23年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790811

研究課題名 (和文) SHP-1 をターゲットとした腎性貧血治療の可能性についての検討

研究課題名 (英文) Assessment of the possibility for treating renal anemia by targeting SHP-1.

研究代表者

赤木 滋 (AKAGI SHIGERU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80509315

研究成果の概要 (和文)：

造血前駆細胞内に存在する SHP-1 が真に腎性貧血の治療ターゲットとなる分子であるかどうかを確認することを目的として、SHP-1 の機能阻害について siRNA 導入を試みた。腎性貧血モデルマウス (5/6 腎摘マウス) の骨髄より c-kit 陽性造血前駆細胞を分離培養して、SHP-1 siRNA 発現レトロウイルスベクター、および shRNA 発現レンチウイルスベクターの導入を試みたが、c-kit 陽性造血前駆細胞への導入は困難であった。今後も細胞培養、導入条件などを変更して導入を試み、SHP-1 の発現変化および細胞内シグナル伝達系への影響につき検討したい。

研究成果の概要 (英文)：

To determine whether SHP-1 is a therapeutic target molecule for renal anemia, SHP-1 siRNA induction was performed to knockdown SHP-1 expression in renal anemia model mice. The c-kit positive hematopoietic progenitor cells were isolated from bone marrow of 5/6 nephrectomized mice, and transfection of the c-kit positive hematopoietic progenitor cells with SHP-1 siRNA and shRNA was attempted. Eventually, the experiment was not successful maybe due to the condition for transfection or cell viability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：腎臓病学

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：SHP-1、腎性貧血

1. 研究開始当初の背景

わが国では、世界的にも質の高い透析医療により長期生存が可能になっていること、腎移植の普及が遅れていることなどを背景として、維持透析患者が増加の一途を辿っている。血液透析患者では、鉄欠乏、ビタミン欠乏、重度の副甲状腺機能亢進症、透析不足などの明らかな原因がないにもかかわらず、遺伝子組換えヒトエリスロポエチン製剤 (rHuEPO) を高用量 (週9000単位) 投与しても貧血が改善しない症例が散見される。rHuEPOを週9000単位以上投与している患者は30,265人 (22.1%) を占めており、医療経済的な面も含めてEPO等の赤血球生成刺激薬 (ESA; Erythropoiesis stimulating agent) 投与への反応に乏しいESA低反応性が透析医療における1つの大きな問題となっている。ESA低反応性の原因としては、鉄欠乏、透析不足・重度の副甲状腺機能亢進症、水溶性ビタミン不足が指摘されているが、その分子機序については依然解明されていない。これまでの当教室での研究で、ESA低反応性の血液透析患者の末梢血よりCD34陽性造血前駆細胞を分離して、rHuEPO、stem cell factor (SCF) やinterleukin (IL)-3等のサイトカインを添加したメチルセルロース半固形培地で培養したところ、EPO反応性あるいはEPOが不要である透析患者と比較して明らかに赤芽球系コロニー (BFU-E; burst forming unit of erythroid) の形成が明らかに低下していた。また、ESA低反応の血液透析患者では、CD34陽性造血前駆細胞の細胞質内に存在するSrc homology-2 domain containing tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) の発現がmRNAレベル、蛋白レベル、リン酸化のいずれにおいても亢進しており、その結果 signal transducer and activators of

transcription 5 (STAT5) が脱リン酸化されることによりEPO受容体を介した造血前駆細胞内シグナル伝達が減弱すると報告した。さらに、CD34陽性造血前駆細胞に、HVJ-envelopeベクターを用いてSHP-1のantisense oligodeoxynucleotide (S-oligo) を導入して培養すると、培養細胞におけるSHP-1発現の減弱、リン酸化STAT5発現の増強、およびメチルセルロース培地のBFU-Eコロニー数の増加をもたらされ、血液透析患者のESA低反応に、SHP-1発現亢進による造血細胞内シグナルの異常が関与している可能性が示唆された (Akagi S et al.; JASN, 2004)。

2. 研究の目的

SHP-1が真に腎性貧血の治療ターゲットとなる分子であるかどうかを確認することを目的として、個体レベルのマウスを用いた実験において、siRNA等を用いたさらに強力なSHP-1の発現抑制を試み、赤芽球系の造血機能への影響を評価する。腎性貧血モデルマウス (5/6腎臓摘出) やSHP-1 deficient modelマウス (C57BL/6J-Hcph^{mc-v}/J: Viable motheaten) を用いて、腎性貧血の進行、ESA投与に対する反応性や造血前駆細胞内シグナル伝達についてwild-typeとの比較検討を行う。また5/6腎摘モデルにSHP-1 siRNA等を導入してSHP-1を抑制することにより腎性貧血の改善、ESA反応性の変化を検討する。

3. 研究の方法

1) SHP-1 deficient modelマウス

(C57BL/6J-Hcph^{mc-v}/J: Viable motheaten) のbreeding

本研究に使用する十分なSHP-1 deficient modelマウス (C57BL/6J-Hcph^{mc-v}/J: Viable

motheaten)を得るために breeding pair を購入し、本学の動物資源施設において breeding を行う。genotyping は、生後 2 週にマウスの尾から DNA を抽出し、PCR にて行う。

2) 腎性貧血モデルの作成と腎性貧血発症の確認

腎性貧血モデル (5/6 腎臓摘出マウス) を作成し、腎摘出前、摘出後週一回の採血を行い、ヘマトクリット値や血清尿素窒素を測定し、研究モデルとして適切かどうかの検討を行う。

3) SHP-1 発現と腎性貧血の関連の確認

C57BL/6J-Hcph^{me-v} マウスの breeding、genotyping で判別されたホモ、ヘテロ、wild type に対して 5/6 腎摘を行い、経時的にヘマトクリット値、血清尿素窒素およびクレアチニン値を測定する。さらにマウスの骨髄から造血前駆細胞を c-kit 特異抗体と磁気ビーズを用いて分離し、液体培地 (STEM-PRO34 SFM) を用いて培養してその後の検討に十分な細胞数を得る。SHP-1 の定量 PCR による mRNA 定量、SHP-1 抗体やリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット及び免疫沈降により、SHP-1 の活性化と腎性貧血の程度の関連について検討する。また、造血前駆細胞における EPO 受容体を介した細胞内シグナルを検討するために、JAK2 や STAT5 のリン酸化をウエスタンブロットで検討する。さらに、STAT5 の下流にある標的遺伝子 (oncostatin M, bcl-xL など) の発現に与える影響について定量 PCR で評価する。

4) SHP-1 の発現とエリスロポエチンに対する反応性の確認

C57BL/6J-Hcph^{me-v} マウスのホモ、ヘテロ、wild type の腎不全モデルに対してエリスロポエチンを投与し、SHP-1 の発現量とエリスロポエチンによる腎性貧血の改善の程度について、経時的観察を行う。

5) 腎性貧血モデルへの SHP-1 siRNA 導入に

よる腎性貧血改善の確認

1. SHP-1 siRNA 発現レトロウイルスベクターを作製する。この過程はタカラバイオ株式会社細胞遺伝子治療センターの蝶野英人氏の協力を得てレトロウイルス構築を行う。

2. 腎性貧血モデルマウスの骨髄から、c-kit 陽性造血前駆細胞を分離培養し、その過程で SHP-1 siRNA 発現レトロウイルスベクター (或いは shRNA レンチウイルスベクター) を導入して、再度腎性貧血モデルマウスの尾静脈より投与する。この方法で SHP-1 の変化や造血細胞内シグナル伝達系への影響および Hb 値の変化を経時的に検討していくことで、SHP-1 の抑制が腎性貧血の治療に有用であるかどうかを検証する。

6) SHP-1 の RNA アプタマー合成による検討
RNA アプタマーは分子進化法を用いて開発を行う。まず SHP-1 リコンビナント蛋白を大腸菌による系で産生する。pET ベクターに SHP-1 の翻訳領域を挿入し、BL21 を用いてリコンビナント蛋白を産生する。SHP-1 リコンビナント蛋白をもとに分子進化法で RNA アプタマー合成を行う。RNA アプタマー合成後、siRNA 実験と同様に下記の実験を行う。

1. 腎性貧血モデルマウスに RNA アプタマーを投与してその貧血改善効果を評価する。
2. ESA 低反応性透析患者の末梢血 CD34 陽性細胞を分離してメチルセルロース培地で培養後、RNA アプタマーを添加し赤芽球系コロニー数の変化について検討する。

4. 研究成果

SHP-1 deficient model (C57BL/6J-Hcph^{me-v}/J : Viable motheaten) の breeding を行い、genotyping によって、ホモ、ヘテロ、wild type に判別したが、5/6 腎摘施行後間もなくホモマウス、および殆どのヘテロマウスはすぐに死亡した。結局 wild type のみしか今回の検討に供するまでの生存期間を得ることができなかったため、この Viable motheaten を用いた検討は断念した (従って、前述の 3.

研究の方法 3) C57BL/6J-Hcph^{mc-v} マウスの SHP-1 発現と腎性貧血の関連の確認、および 4) SHP-1 の発現とエリスロポエチンに対する反応性の確認の検討は施行しなかった。C57BL/6マウスの5/6腎摘を施行し、4週間後の採血にて有意なHb値の低下および尿素窒素・クレアチニン値の上昇を確認した。従ってこれを腎性貧血モデルマウスとして使用することとし、これに対するSHP-1 siRNA導入による腎性貧血改善の確認を試みた。腎性貧血モデルマウスより骨髓を採取し、c-kit陽性造血前駆細胞を分離培養した。SHP-1 siRNA発現レトロウイルスベクター、およびshRNA発現レンチウイルスベクターを作製し、c-kit陽性造血前駆細胞への導入を試みたが、導入効率がきわめて悪く、種々の条件を試したが、結局c-kit陽性造血前駆細胞への導入に成功しなかった。細胞のviabilityの問題も考えられ、細胞培養の条件を変更した上でウイルスベクターの導入を試みたがこれも成功しなかった。したがって、SHP-1siRNAの造血前駆細胞への導入によるSHP-1の発現変化および細胞内シグナル伝達系への影響について検討することは不可能であった。また、他の方法として、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを腎性貧血モデルマウスの尾静脈に投与し、マウス血液におけるヘモグロビン値について検討してみたが、有意な上昇を認めなかった。これらの結果より、SHP-1の機能阻害についての検討ができなかったため、前述の3. 研究の方法6) SHP-1のRNAアプタマー合成による検討まで至っていない。今後も、腎性貧血モデルの見直し、造血前駆細胞培養の条件、siRNA導入の条件などを変更して検討を継続したいと考えている。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 滋 (AKAGI SHIGERU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80509315