

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07367

研究課題名(和文)ポドサイトの活性化シグナルの解析による各種腎障害の鑑別法の開発

研究課題名(英文)Development of a method for differentiating various renal disorders by analyzing podocyte activation signals

研究代表者

櫻井 明子(SAKURAI, Akiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70707900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎機能低下の直接の原因となるポドサイト細胞膜に存在するCXCR-4・CXCR-7の解析を行った。培養不死化ヒトポドサイトを用いて、高血糖刺激、過酸化水素刺激、BMP4刺激、SDF-1刺激下でのCXCR-4・CXCR-7遺伝子発現をReal-Time PCRで確認した。ヒト尿中に排出されるエクソソーム内CXCR-4・CXCR-7タンパク発現確認のため、健常者随時尿、患者尿検体を用いて尿中エクソソーム抽出方法の検討を行った。糖尿病性腎症モデルによる病態を反映するポドサイト特異的分子群解明のために経時的に採取したマウス腎組織において、CXCR-4・CXCR-7の発現変化を免疫組織化学染色にて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)の主たる原因である糖尿病性腎症によって新規に透析導入となる患者数は最も多い。現行の治療法では、腎不全への進展をわずかに遅延させるのみであり、他のCKDの原因と比較しても、予後は極めて不良である。そのため、診断法を明確なものとし、腎症に特異性の高く、有効な治療法を開発することは急務である。腎症における分子病態を統合的に理解し、腎症の病態・病期ごとに特異的な分子を抽出し、ポドサイトの活性化シグナルの解析による各種腎障害の鑑別法の探索を行うことで、腎臓病の分子病態把握、治療の奏功性の評価、透析にいたる予後予測等の評価ができるようになる。

研究成果の概要(英文)：Analyzed CXCR-4 and CXCR-7, which are present in the cell membrane of podocytes and are the direct cause of proteinuria and decline in renal function. Using cultured immortalized human podocytes, changes in CXCR-4 and CXCR-7 gene expression levels under hyperglycemic stimulation, hydrogen peroxide stimulation, BMP4 stimulation, and SDF-1 stimulation were confirmed by Real-Time PCR. In addition, confirm the expression of CXCR-4 and CXCR-7 proteins in exosomes excreted in human urine, we investigated a method for extracting urinary exosomes using occasional urine from healthy subjects and urine samples from patients. Elucidate the functions of podocyte-specific molecular groups that reflect pathological conditions in a diabetic nephropathy model, changes in the expression of CXCR-4 and CXCR-7 were analyzed using immunohistochemical staining in mouse kidney tissues collected over time.

研究分野：内科学一般

キーワード：ポドサイト バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は我が国のみならず全世界において最も重要な病態である。この主たる原因は糖尿病性腎症であり、年々増加している。我が国では末期腎不全の 45%を占める。また、CKD は心血管病変 (CVD) の重大な危険因子であり、さらに血管合併症は糖尿病性腎症では高頻度におこる合併症であり、予後は極めて不良である。CKD は進行すると透析導入となり、患者の医療費負担が高騰し QOL (Quality of Life) が低下する。そのため早期の診断と治療開始が重要となる。

### 2. 研究の目的

糖尿病性腎症の診断は難しく、アルブミン尿は腎症以外のほとんどの CKD で認められるという問題があり、治療の面でも、現行の治療では腎不全や透析になるのを少し遅らせるだけであり、進行する腎症を画期的に治癒させる治療法はない。本研究ではタンパク尿の出現や腎機能低下の直接の原因となる糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 細胞膜上に存在する CXCR4・CXCR7 のシグナル解析を行い、各種腎障害の鑑別法に CXCR4・CXCR7 のポドサイト活性シグナルが有用か探索を行う。

### 3. 研究の方法

培養不死化ヒトポドサイトを用いて、高血糖刺激、過酸化水素刺激、BMP4 刺激、SDF-1 刺激下で細胞膜に存在する G タンパク共役受容体 CXC chemokine receptor type 4 (CXCR-4)・CXC chemokine receptor type 7 (CXCR-7)の遺伝子発現量の変化を Real-Time PCR にて検討する。また、ヒト尿中に排出されているエクソソーム内の CXCR-4・CXCR-7 タンパク発現を確認のため、徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会承認され、同意書の得られた、健常者ならびに患者検体を用いて尿中エクソソーム抽出方法の検討と評価を行う。糖尿病性腎症モデルによる病態を反映するポドサイト特異的分子群の機能解明のために経時的に採取したマウスの腎組織において、週齢による CXCR-4・CXCR-7 の発現変化を確認するため、免疫組織化学染色を実施する。また、腎糸球体ポドサイト特異的分子 podocin についてもマウス腎組織において、発現量変化は免疫組織化学染色を実施し評価する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト培養不死化ポドサイト Immortalized Human Podocytes for academic user, Human (APB)を用いて、ヒト培養不死化ポドサイト細胞膜上に CXCR-4・CXCR-7 が発現していることを免疫組織化学染色で確認し、培養条件を検討した。検討した培養条件下のヒト培養不死化ポドサイトに高濃度グルコース刺激、過酸化水素刺激、BMP4 刺激、SDF-1 刺激を実施した。刺激による CXCR-4、CXCR-7 の mRNA 発現レベルについて Realtime-PCR を用いて検討した。高濃度グルコース刺激、BMP4 刺激、SDF-1 刺激による CXCR4、CXCR7 の mRNA 発現レベルに変化は確認できなかった。高濃度過酸化水素刺激によるヒト培養不死化ポドサイトの CXCR-4、CXCR-7 の mRNA 発現レベルは増加していたが、高濃度過酸化水素の影響で生細胞数は減少していた。

(2) 徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会で承認され、徳島大学病院で腎生検を実施し同意書の得られた病理診断の確定した患者尿と、同意書の得られた健常者随時尿中エクソソーム抽出を行った。各検体 10mL 尿量からエクソソーム抽出法を検討した。エクソソーム抽出評価として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を実施し、銀染色にて評価した。エクソソーム抽出検体の Western Blotting を実施したが、CXCR4・CXCR7 タンパク発現は確認できなかった。またヒトエクソソーム膜タンパク質 CD9、CD63 の発現も Western Blotting にて確認できなかった。CD9/CD63 ELISA(ヒト由来エクソソーム定量用)を用いて抽出エクソソームの定量を行ったが、検出限界値以下であった。

(3) 糖尿病性腎症モデルによる病態を反映するポドサイト特異的分子群の機能解明のために経時的に採取したマウスの腎組織において、週齢による CXCR-4・CXCR-7 の発現変化を確認するため、20 週齢と 40 週齢のコントロールマウスと糖尿病性腎症モデルマウス (db/db) の免疫組織化学染色を実施した。コントロールマウス 20 週齢と 40 週齢の腎臓組織において、糸球体ポドサイトに Podocin、CXCR7 の発現が確認できた。40 週齢のコントロールマウスの Podocin と CXCR7 発現量は、20 週齢のコントロールマウスに比べ発現量は減少していた。20 週齢の糖尿病性腎症モデルマウス (db/db) 糸球体ポドサイトに Podocin、CXCR7 発現していたが、20 週齢のコントロールマウスと比較すると Podocin、CXCR7 発現量は減少していた。40 週齢の db/db では、Podocin の発現量は減少しており、CXCR7 の発現は確認できなかった。CXCR4 の発現はマウス腎臓組織糸球体ポドサイト上では確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda Sayo, Tominaga Tatsuya, Ochi Arisa, Sakurai Akiko, Nishimura Kenji, Shibata Eriko, Wakino Shu, Tamaki Masanori, Nagai Kojiro	4. 巻 11
2. 論文標題 TGF- 1 is involved in senescence-related pathways in glomerular endothelial cells via p16 translocation and p21 induction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01150-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若林龍矢、櫻井明子、越智ありさ、冨永辰也
2. 発表標題 小胞体ストレス誘導下における腎線維化とBMP4/CHOPの機能解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若林龍矢、櫻井明子、越智ありさ、冨永辰也
2. 発表標題 腎硬化症における小胞体ストレス分子メカニズムの解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智ありさ、櫻井明子、太田浩二、飛永恭兵、若林龍也、脇野修、右手浩一、冨永辰也
2. 発表標題 高吸水性ポリマーを用いた新規エクソソーム精製法
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村花菜子、若林龍矢、櫻井明子、富永辰也
2. 発表標題 血管内皮特異的BMP4発現マウスへの高脂肪食負荷による影響について
3. 学会等名 徳島県医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林龍矢、田村花菜子、櫻井明子、富永辰也
2. 発表標題 腎繊維化病変発症機序の解析
3. 学会等名 徳島県医学検査学会
4. 発表年 2021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	富永 辰也  (TOMINAGA Tatsuya)  (80425446)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授   (16101)	
研究分担者	田詩 昌憲  (TAMAKI Masanori)  (90528902)	徳島大学・病院・講師   (16101)	

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
---------	---------