

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16158

研究課題名（和文）ポドサイト障害抑制因子の探索と慢性腎臓病治療薬開発の試み

研究課題名（英文）Exploration for inhibiting factors of podocyte injury and development of therapeutic agents for Chronic Kidney Disease.

研究代表者

辰元 為仁（Tatsumoto, Narihito）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30444813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ポドサイト障害に対して保護的に働く分子であるNotch2のシグナル伝達経路にターゲットを絞り、ポドサイトにおけるNotch2活性化シグナルの下流因子としてSub-Xを特定し、アドリアマイシンによるポドサイト障害モデルを用いてSub-Xの機能解析を行った。Sub-Xはポドサイトにおいてアポトーシス抑制効果を示したが、ノックアウトマウスでは腎障害が促進された。その要因として、マクロファージの極性にSub-Xが関連していることを突き止め、Sub-XノックアウトによりマクロファージがM1からM2への分化を誘導されることにより、腎障害が軽減する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nothch2活性化シグナル伝達経路及びその役割を解明することは、他臓器への副作用を最小限に抑えた新規CKD薬物療法の創出に重要である。我々はNotch2の下流にあるSub-Xを特定し、培養細胞、動物実験により腎障害における役割を検証した。Sub-Xは腎構成細胞であるポドサイトではアポトーシス抑制効果から腎保護に、マクロファージではM2からM1への誘導を介して腎障害促進に関与しており、Sub-Xの多様な機能が示唆された。これらの結果は、Notch2をターゲットにした創薬において各臓器、細胞への影響を考慮した設定が必要であることを示唆し、今回より特異的な経路の一段階を解明できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we targeted the signaling pathway of Notch2, a molecule acts protectively against podocyte injury, identified Sub-X as a downstream factor of Notch2 signaling pathway in podocytes, and analyzed Sub-X function using an adriamycin-induced podocyte damage model.

Sub-X suppressed apoptosis in podocytes, but promoted renal damage in Sub-X knockout mice. We found that Sub-X was associated with macrophage polarity, suggesting that Sub-X knockout may alleviate renal injury by inducing M1 to M2 differentiation in macropahges.

研究分野：慢性腎臓病

キーワード：慢性腎臓病 ポドサイト

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

慢性腎臓病（CKD）は、腎機能の低下や蛋白尿、血尿といった腎障害が慢性的に持続する病態であり、進行すると生命維持のため腎代替療法（透析療法、腎移植）が必要になる。更に、CKD は脳梗塞、心筋梗塞、心不全、下肢虚血等の心血管病を介した死亡リスクの増加にも関連している。日本において CKD 患者は 1330 万人と推計され、実に成人の約 8 人に 1 人にのぼり、CKD に対する新規治療薬の創出は、国民の生命予後、生活の質の改善に繋がると共に、社会経済的な負担の軽減に寄与する。

ポドサイトは、糸球体の構成細胞として最外層に位置し、足突起の規則的な組み合わせ、濾過障壁（スリット膜）を構築することで血清蛋白の漏出を防いでいる。ポドサイトが障害されると、足突起の噛み合わせ構造の消失と濾過障壁崩壊により蛋白尿が生じ、CKD が進展する。ポドサイト障害メカニズムの解明は、CKD の成因と新規治療法を開発していく上で極めて重要である。

Notch 活性化シグナルは、細胞増殖・細胞分化・アポトーシス等の細胞運命を決定し、様々な細胞・臓器において重要な役割を果たしている。申請者の研究グループは、Notch 活性化シグナルとポドサイト障害について探求を進めており、Notch2 agonist 抗体をアドリアマイシン（ADR）腎症マウス（糸球体硬化、ネフローゼ症候群のマウスモデル）に投与すると、蛋白尿、ポドサイト障害、糸球体硬化が抑制されることを発見した（Nature Commun. 2014; 5: 3296）。培養ポドサイトにおいて、Notch2 agonist 抗体が ADR によるアポトーシスを軽減すること、逆に Notch2 ノックダウンがアポトーシスを増加させることを報告している。Notch2 活性化シグナルに対する薬物療法は、他臓器への影響を考慮する必要があるため、ポドサイト特異的な Notch2 活性化シグナル伝達経路及びその役割を解明することは、他臓器への副作用を最小限に抑えた新規 CKD 薬物療法の創出に極めて重要である。

申請者の研究グループは、培養ポドサイトに Notch2 agonist 抗体を添加し、その細胞から抽出した RNA をマイクロアレイにて解析し、ポドサイトにおける Notch2 活性化シグナルの下流に位置する物質 X（Sub-X）を特定した。興味深いことに、ADR 腎症マウスでは、ポドサイトでの Sub-X の発現が増加しており、Sub-X がポドサイト障害からの保護に関与していることが強く示唆された。Notch2 活性化シグナル伝達と Sub-X の関連についてはこれまでに報告がなく、極めて新規性が高い。更に刮目すべき点として、Sub-X は炎症時の細胞保護効果との関連が報告されており、今後のポドサイト研究に新たな潮流を生み出す可能性がある。

2．研究の目的

本研究の目的は、ポドサイトに特異的な Notch2 活性化シグナル経路を明らかにし、CKD におけるポドサイト障害の抑制、ポドサイト再生による CKD からの回復のメカニズムを解明

し、新規 CKD 治療薬を創出することである。

3．研究の方法

Sub-X は様々な炎症性疾患との関与が示されているが、腎疾患における詳細な役割は不明であり、培養細胞、動物実験による検証、ヒトの腎生検組織を用いた評価を行った。

(1) 培養ポドサイトにおいて Sub-X を過剰発現もしくはノックアウト (K0) し、ADR によりアポトーシスを誘導するモデルを用いて、Sub-X のポドサイト障害における役割を解明する。さらに、培養ポドサイトに ADR を投与した上で Sub-X を加え、そのアポトーシス抑制効果、アクチン骨格の変化の解析を行う。

(2) Sub-X K0 マウスにポドサイト障害を引き起こすモデルを導入し、蛋白尿、糸球体硬化、ポドサイト障害の程度を解析する。

(3) ヒトの腎生検組織を用いた検討では、糖尿病性腎症、IgA 腎症、巣状糸球体硬化症、ループス腎炎、半月体形成性糸球体腎炎において、ポドサイト、Notch2、Sub-X の免疫染色を行い、疾患毎の解析を行うことで、新規薬が有効となりうる疾患の候補を絞る。

4．研究成果

(1) 培養ポドサイトにおいては、ADR にて Sub-X の発現、分泌が亢進し、Notch2 にて効果が増強されることを確認し、マウスのポドサイト障害腎症モデルである ADR モデルにて、ポドサイトにおいて Sub-X の発現が亢進していることを確認した。続いて、Sub-X のポドサイト障害に関わる役割を検証した。培養ポドサイトに細胞死を誘導する ADR モデルにて、Sub-X 投与によりポドサイトのアポトーシスが抑制されることを確認し、ポドサイトにおいて Sub-X を過剰発現したところ同様に ADR によるアポトーシスを抑制することを確認した。また、Sub-X を K0 したポドサイトでは ADR による細胞死が促進されることを確認した。これらにより、培養ポドサイトにおいては、Sub-X がアポトーシス抑制効果を持つことが示唆された。

(2) Sub-X K0 マウスに ADR 腎症を導入したところ、予想に反して K0 マウスにおいてアルブミン尿、糸球体硬化といった腎障害が軽減していた。培養細胞と動物実験の相反する結果が得られた原因として免疫系細胞の関与を疑い、野生型、Sub-X K0 マウスの ADR 腎症モデルに、それぞれの骨髄移植をすることで免疫系細胞に対する Sub-X の効果を確認した。Sub-X K0 マウスの骨髄移植をした野生型、Sub-X K0 マウスにおいて腎障害が抑制されていたことより、骨髄細胞由来の Sub-X の欠損は腎保護に、腎臓構成細胞における Sub-X の欠損は腎障害促進に関与することが示唆された。Sub-X は炎症部位でのマクロファージの働きに強

く関与することが示されており、我々はマクロファージの極性に注目した。Sub-X KO の ADR 腎症マウスでは、野生型に比べて糸球体内の M2 マクロファージが増加しており、骨髄移植モデルでも Sub-X KO の骨髄移植群では野生型、Sub-X KO マウス両群において糸球体内の M2 マクロファージが増加していた。Sub-X KO マウスの ADR 腎症モデルに野生型マウスの M2 マクロファージを投与すると、腎障害が増悪することからも、マクロファージにおける Sub-X の発現が腎保護に関与していることが示された。マウスの骨髄由来マクロファージを M1、M2 に分化誘導したところ、Sub-X KO マウス由来のマクロファージでは M1 への分化抑制、M2 への分化促進がみられた。これらより、Sub-X はマクロファージにおいて M1 から M2 への分化を誘導することにより腎障害を軽減している可能性が示された。以上より、Sub-X KO によるマクロファージの M2 誘導、腎臓における炎症抑制効果が、ポドサイトのアポトーシスを凌駕するため、Sub-X KO マウスで腎障害が軽減したと想定された。

(3) ヒトの腎生検組織においても、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症、ループス腎炎といったポドサイト障害をきたす疾患でポドサイトにおける Sub-X の発現が亢進していることを確認した。これらの結果は、ポドサイト障害に Sub-X が Notch2 シグナルを介して関与することを支持している。

今回の検証を通じて、Notch2 シグナル伝達の下流にある Sub-X の各臓器、細胞における多様な機能を明らかにすることができたことは、Notch2 をターゲットにした創薬において非常に有用な情報となり得る。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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