

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591195

研究課題名（和文）モデルマウスを用いた遺伝性腎炎に対する画期的腎再生法の研究

研究課題名（英文）Research of revolutionary kidney regeneration for hereditary nephritis using a mouse model

研究代表者

金子 一成 (KANEKO KAZUNARI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00214453

研究成果の概要（和文）：小児の微小変化型ネフローゼ症候群（本症）の病因は不明である。最近、本症において転写因子 NF- κ B の活性化が病因に関与しており本症の治療薬・ステロイドはその機能抑制を介して有効性を発揮するとの考えがある。そこで本研究では本症モデルマウスを用い近年開発された NF- κ B 阻害薬・DHMEQ の治療効果を検討した。

その結果、DHMEQ 非投与群では有意な蛋白尿、低アルブミン血症を呈したのに対し、DHMEQ 投与群ではこれらの所見は軽減した。また DHMEQ 投与群では NF- κ B の核内移行阻害が確認された。以上より NF- κ B は本症の発症に重要な役割を果たしており NF- κ B 阻害薬 DHMEQ は本症の新規治療薬となる可能性があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Recent observations have revealed that the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) plays an important role in minimal-change nephrotic syndrome (MCNS), and there is a theory that therapeutic efficacy of steroids in MCNS is associated with the inhibition of NF- κ B activity. Dehydroxy-methyl-epoxyquinomicin (DHMEQ) is a newly developed inhibitor of NF- κ B that directly binds specifically to NF- κ B components to inhibit DNA binding. Therefore, it is thought to be more specific than most other NF- κ B inhibitors.

We conducted this study to determine whether DHMEQ may ameliorate puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephrosis in a murine model for MCNS. As a result, DHMEQ could reduce the albuminuria and ameliorate the hypercholesterolemia and hypoalbuminemia in comparison with PAN injection without DHMEQ in the mice. DHMEQ also inhibited PAN-induced NF- κ B translocation from the cytoplasm to the nucleus. In conclusion, NF- κ B plays an important role in the pathogenesis of MCNS, and these results suggest that DHMEQ is a candidate therapeutic agent for MCNS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：マウス、ネフローゼ症候群、NF- κ B、Dehydroxy-methyl-epoxyquinomicin (DHMEQ)

1. 研究開始当初の背景

小児における特発性ネフローゼ症候群（以下、本症）はステロイドに対する感受性が良く、副腎皮質ステロイド薬の治療により殆どが寛解に至るとされている。しかし80%は再発を起し、そのうち半数が頻回再発し、成長障害・高血圧等のステロイド薬による副作用が発現しやすい。また、ステロイド治療に反応しないステロイド抵抗性ネフローゼ症候群は腎不全に進行する事も多い。腎不全に至った患児は、腹膜透析を導入し長期にわたる透析を余儀なくされている。唯一の根本治療は腎移植であるが、本邦ではドナー登録が少なく実施できる施設も限られ、広く普及するにはいたっていない。したがって小児の本症に対する新たな治療法の確立は、患者のQOL向上のためにも急務である。

2. 研究の目的

近年の様々な臨床的・基礎的検討から、本症の病因として免疫異常の関与が示唆されている。NF- κ Bは免疫系の活性化に重要な役割を果たす転写因子で、実際にネフローゼ症候群の患者においてもNF- κ Bの異常活性化が関与しているとの報告もみられる。

NF- κ B阻害薬である dehydroxy- methyl- epoxyquinomicin (DHMEQ)は、NF- κ Bに直接結合し、活性化されたNF- κ Bの核内局在を阻害することで特異的にNF- κ B分子の活性を抑制する。DHMEQの臨床応用は、すでに癌やリウマチなどで検討されており、今回ネフローゼ症候群においてその効果を検討した。

3. 研究の方法

マウスに本症を起こす事が知られているPANを用いてネフローゼモデルマウスを作成した。

すなわちC57BL/6マウスにPAN(450mg/kg)を投与し、DHMEQ投与群においては、その投与直前および翌日から4日間DHMEQ(10mg/kg)を連日投与した。

PAN単独投与群(DHMEQ非投与群)と、DHMEQ投与群間で、尿蛋白量の経時的な変化、並びにPAN投与8日目における血中コレステロール・アルブミン・総蛋白濃度、腎糸球体の形態的变化等の比較検討を行った。また、腎細胞におけるnephritinとpodocinのmRNA変化をRT-PCR法によって評価した。

NF- κ B活性に対する評価として、NF- κ Bの活性化によって産生されるサイトカインの一つであるinterleukin-6(IL-6)の血中濃度をPAN投与8日目に測定した。また、糸球体細胞におけるNF- κ Bの核内局在を、腎

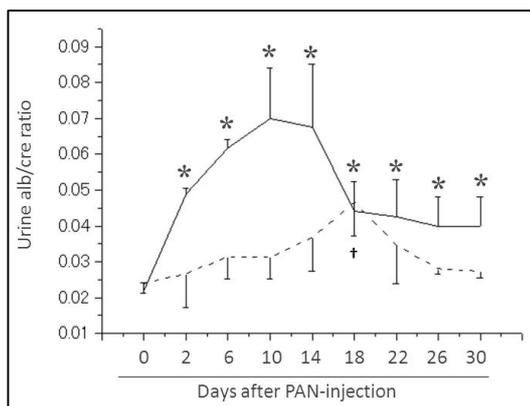
組織と糸球体培養細胞を対象に、免疫染色を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 尿蛋白における検討

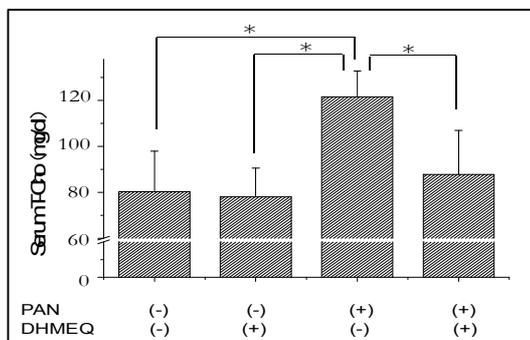
尿蛋白量の評価として、U-Alb/Crを用いた。下図に示すように、正常マウスと比較し(U-Alb/Cr:0.02)、DHMEQ非投与群では、PAN投与10日目をピークとするA/C比の上昇が認められた(U-Alb/Cr:0.07)。一方、DHMEQ投与群ではA/C比のピークはPAN投与18日目に認められ(U-Alb/Cr:0.05)、そのピークはDHMEQ非投与群と比較し、有意に低かった(*, †: p<0.05)。

(2) 血清学的検討



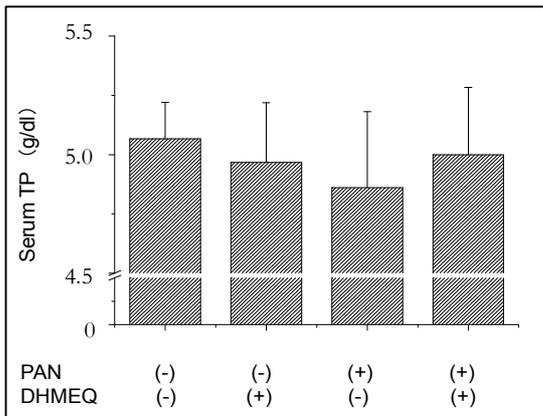
① 血中総コレステロール値

下図に示すように、DHMEQ非投与群では、正常マウスと比較し、高コレステロール血症が認められたが、DHMEQ投与群では血中コレステロールの上昇が有意に抑制された(*:p<0.05)。



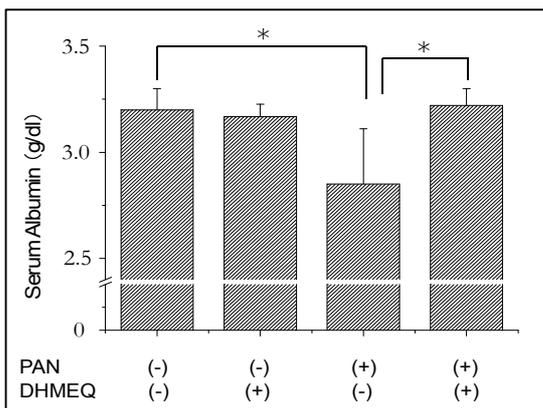
② 血中総蛋白値

図に示すように、DHMEQ 非投与群では、正常マウスと比較し、総蛋白値の低下が認められたが、DHMEQ 投与群では低下が抑制された。



③ 血中総アルブミン値

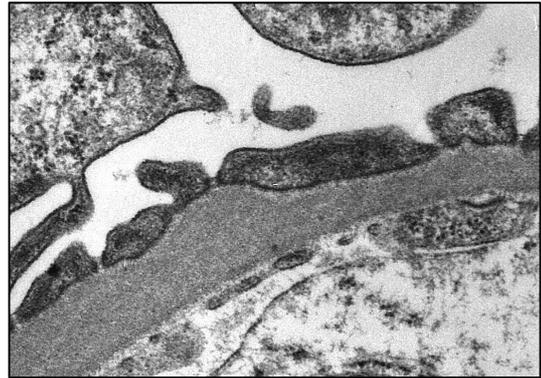
下図に示すように、DHMEQ 非投与群では、正常マウスと比較し、低アルブミン血症が認められたが、DHMEQ 投与群では血中アルブミンの低下が有意に抑制された(*:p<0.05)。



(3) 電子顕微鏡における腎組織の病理学的検討

微少変化型ネフローゼ症候群では、腎糸球体において、電子顕微鏡で糸球体上皮細胞の足突起の融合が起こることが特徴とされており、本症の蛋白尿出現の重要な機序であることが分かっている。

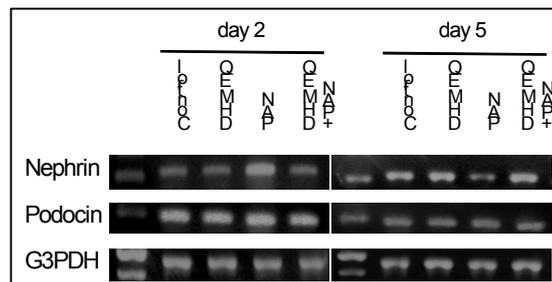
そこで、DHMEQ 投与群と非投与群間で、電子顕微鏡を用いて糸球体の病理学的変化を観察した。結果、DHMEQ 非投与群では足突起の融合が多く認められた(図)が、DHMEQ 投与群では上記像は、稀に認めるのみであった。



(4) 腎細胞における nephrin と podocin の mRNA 変化

DHMEQ 投与・非投与群間で、nephrin と podocin の mRNA の変化を比較した。すなわち、PAN 投与 2 日目・5 日目の時点で腎臓を摘出し、RT-PCR 法を行った(下図)。Nephrin の mRNA は、DHMEQ 非投与群では 2 日目の時点で発現の増強が認められたが、5 日目の時点では減弱していた。

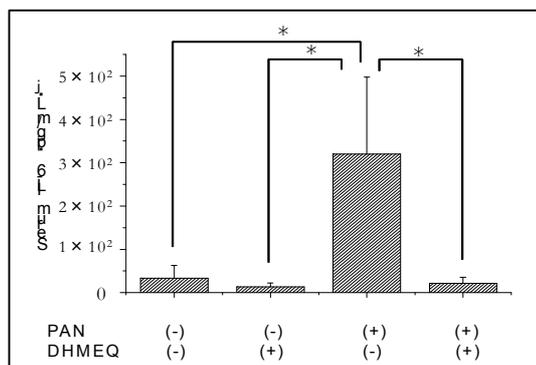
DHMEQ 投与群ではコントロール群と同様のパターンを示した。一方、podocin は一貫して発現の差異を認めなかった。



(5) 血中 IL-6 濃度の検討

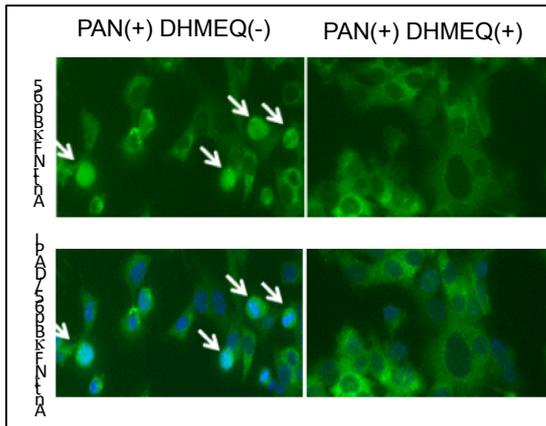
NF- κ B 活性の評価として、PAN 投与 8 日目血中 IL-6 濃度の比較検討を行った。

下図に示すように、DHMEQ 非投与群では、正常マウスと比較し、高 IL-6 血症が認められたが、DHMEQ 投与群では血中 IL-6 の上昇が有意に抑制された(*:p<0.05)。

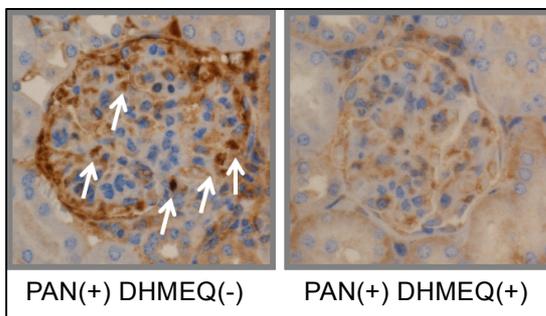


(6) 腎系球体での NF- κ B 核内局在の検討

マウス腎系球体培養細胞に PAN (450 μ g/ml) を添加し、DHMEQ(10 μ g/ml) 添加群・非添加群の 2 群に分け、免疫染色による NF- κ B の核内局在を比較した。抗体は、anti-NF- κ B P65 rabbit antibody を使用した。その結果、DHMEQ 非添加群では、核に一致し NF- κ B の核内局在が確認された (左カラム最下段図矢印)。一方、DHMEQ 添加群では、NF- κ B の核内局在は抑制されていた。



また、生体においても検討を行った。PAN 投与後 8 日目にマウスから腎臓を摘出し、同抗体を用いて免疫染色を行った。DHMEQ 非投与群では腎系球体において NF- κ B の核内局在が確認されたが (下図矢印)、DHMEQ 投与群では NF- κ B の核内局在は抑制されていた。生体においても検討を行った。すなわち PAN 投与後 8 日目にマウスから腎臓を摘出し、anti-NF- κ B P65 rabbit antibody を用いて免疫染色を行ったところ、DHMEQ 非投与群では腎系球体において NF- κ B の核内局在が確認されたが (下図矢印)、DHMEQ 投与群では NF- κ B の核内局在は抑制されていた。



以上の結果より、NF- κ B 阻害薬 DHMEQ は、NF- κ B の核内移行を阻害することで、IL-6 をはじめとするサイトカインの産生や腎系球体上皮細胞足突起の融合を抑制し、MCNS の発症を阻害する可能性が示唆された。

DHMEQ は癌やリウマチなどの様々な疾患動物モデルでも重篤な副作用を呈することなく、有効性が確認されており、創薬分野でも注目されている。MCNS においてもステロイドに替わる新たな治療薬となる期待を抱かせる結果であった。

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 1 件)

- ① Tomohiko Shimo, Yasushi Adachi, Sohsaku Yamanouchi, Shoji Tsuji, Takahisa Kimata, Kazuo Umezawa, Mitsuhiko Okigaki, Junji Takaya, Susumu Ikehara, Kazunari Kaneko. A novel NF- κ B inhibitor DHMEQ ameliorates puromycin aminonucleoside induced nephrosis in mice. American Journal of Nephrology, 査読有, 37, 2013, 302-309
DOI: 10.1159/000348803

[学会発表] (計 3 件)

- ① 下智比古, 足立靖, 山内壮作, 木全貴久, 辻章志, 梅澤一夫, 金子一成.
ピューロマイシン腎症マウスにおける新規 NF- κ B 阻害薬・DHMEQ の臨床的有効性の検討.
第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会、東京 2012. 6. 29
- ② 下智比古, 足立靖, 山内壮作, 北尾哲也, 田中幸代, 木全貴久, 辻章志, 金子一成.
腎症モデルマウスにおける新しい NF- κ B 阻害薬・DHMEQ の抗蛋白尿効果.
第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡 2012. 4. 20
- ③ Shimo T, Adachi Y, Kimata T, Umezawa K, Ikehara S, Kaneko K
Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel inhibitor for NF- κ B, ameliorates proteinuria in murine puromycin- aminonucleoside- induced nephrosis.
The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, 2011. 6. 3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 一成 (KANEKO KAZUNARI)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00214453

(2) 研究分担者

足立 靖 (ADACHI YASUSHI)
関西医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 10268336