

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24年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890196

研究課題名（和文） 腎臓足細胞の障害は不可逆か。足細胞特異的遺伝子欠損動物を用いた治療可能性の検討

研究課題名（英文） Does the podocyte damage is non-invertible? Inquest therapeutic modality for the damage.

研究代表者

渡邊 秀美代 (WATANABE SUMIYO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：30422314

研究成果の概要（和文）：当研究では腎臓足細胞が骨格筋や筋のようにアクチン細胞骨格のシグナル伝達経路を持つことに着眼した。つまりこれは腎足細胞には力学的負荷を受けてリモデリングを繰り返している骨格筋組織と共通するシステムが存在する可能性を示唆しており、即ち現在不可逆と考えられている慢性腎不全の治療可能性を示している。そこでまず腎足細胞特異的機能異常マウスを作成し、治療を試みる。治療の際には当研究室で開発した遺伝子ナノキャリアを用いる予定である。

研究成果の概要（英文）： Brief overview : This theme is focused on the point that ‘ podocyte has the same signal transduction as skeletal muscle to the extent of existing actin signal pathway’ . The skeletal muscle tissue and renal podocyte have a common pathway, it means that podocyte damage can be healed as muscle skeletal damage though the accepted notion of nowadays is that ‘ podocyte damage is never recovered’ . We made podocyte damage mice. We will try to cure their renal function by ‘ genetic manipulation nanocarrier’ which have been developed by ourselves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：腎臓

キーワード：慢性腎不全 腎足細胞 p130-Cas 遺伝子治療 ナノキャリア

1. 研究開始当初の背景

日本の CKD(慢性腎不全)患者数は増え続け、GFR が 60ml/min/1.73m²未満人口は 20 歳以上人口の約 1/5 にも達し、血液透析予備群は 2009 年度には 2 千 2 百万人超存在した。このように血液透析患者数は年々増加しており、患者の QOL と生命予後の低下、そして医療費増大には著しい影響がある(血液透析費用だけで年間 1 兆 5000 億円を超えている)。

日本人の三大死因は「悪性新生物」「心血管系・CKD が大きく影響を及ぼしている。

即ち世界的にも (Atkins, R.C. *Kidney Int Suppl*, 2005, Rosamond, W. *Circulation* 117, 2008) 日本でも (Ogihara. *Hypertension* 2008) 心血管系疾患の最大危険因子は CKD であるとされており、一方で CKD 患者の死因では悪性腫瘍と感染が首位を占める。なお、正常範囲アルブミン尿の段階でも既に心血管系疾患のリスクは 3 倍に増大する (Framingham 研究(1996))。

しかしながら現在の治療では腎機能障害は進行を抑制するのが最大限の目標であり、CKD では一度進行した腎機能低下を正常に戻すことができない。

2. 研究の目的

当研究では腎足細胞の機能を改善することによって現在不可逆とされる慢性腎機能の治療を可能にすることを目的とする。

腎臓糸球体の足細胞は糸球体において濾過するものを選別するだけでなく、そのアクチン細胞骨格で毛細血管を覆い、糸球体を外側から包み、強力な血管内圧などに耐えて腎臓の形態と機能を維持するために力学的負荷を随時受けている。この足細胞が力学的支持

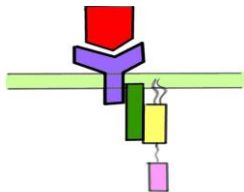
組織であるという視点に基づき、足細胞におけるアクチン細胞骨格のシグナル伝達機構を解明し、骨格筋や腱の様なりモデリングシステムの側面からその正常システムと異常状態を比較解明し、修復不可能だといわれてきた足細胞の修復可能性を検討する。この結果、慢性腎不全(CKD)の発症と進行を予防するだけでなく、一度低下した腎機能を再び正常化する手段を開発することが目的である。

3. 研究の方法

足細胞への注目：腎臓の糸球体濾過障壁の最外層である足細胞は、サイズ・バリアー、チャージ・バリアーとして血漿蛋白からアルブミンまでを通過させない役割を有している。この足細胞の異常からも CKD がもたらされるが、足細胞は高度に分化した細胞で一度壊れると再生能がないというのが通説であった。このため、足細胞は治療ターゲットとして考えられてこなかった。しかし筆者は、足細胞の骨格筋に似た支持組織としての側面に着目した。即ち、足細胞は骨格筋と似たシグナル伝達経路をもつ。例えば、足細胞に特異的に存在するネフリンは細胞外 IgG ドメインを持つ免疫グロブリンのスーパーファミリーである。受容体複合体側鎖の膜貫通部位に ITAM(immunoreceptor tyrosin-based activation motif)を持ち、この ITAM に Nck(N Jones, *Nature*, 2006), CD2 associated protein (Andrey S, 2001)などの Src family kinase であるアダプター蛋白が結合する。ネフリンはアダプター蛋白によるリン酸化を受けてアクチン細胞骨格を再構築する (KariT et al, *Cell*, 2006)。

以上は既知の事実であるが、当研究で注目し

たのはアダプター蛋白の一つである p130-cas (Crc-associated substrate) である。P130-cas は力学的センサーでもあり、外力に依って細胞がストレッチすると Src family kinase に依ってリン酸化されてアクチンを含む下流シグナルへ伝達される (Sawata Y et al, Cell 2006)。



上図で、赤色→アゴニスト
 紫色→2 量体ネフリン
 黄緑→細胞膜
 緑→p130-cas 等、アダプター蛋白
 黄色、桃色→kinase が活性化された下流シグナル

そこで当研究では、

- (1) Src, Syk シグナル伝達経路が足細胞に存在していることの解明：足細胞の修復可能性を示すと考えられる ITAM を介した Src, Syk シグナル伝達経路が足細胞に発現しているかどうかをウェスタンブロット、RT-PCR で確認した。
- (2) 足細胞障害動物モデルの構築：上記シグナルの異常を持つと考えられる動物モデルを作成した。その動物モデルの機能異常のメカニズムを解明した上で、その治療方法も検討する。
- (3) in vivo 共焦点顕微鏡による解析：機能異常検討のメカニズム解明の一つとして、in vivo で腎臓におけるアルブミンの漏出を、in vivo 共焦点顕微鏡でリアルタイムに観察した。また、治療後の改善に

ついても同じく in vivo 共焦点顕微鏡で確認する。

- (4) ナノキャリアを用いた治療方法の検討：腎機能異常が確認されたら、次はその腎機能の修復治療を試みる。この際には当研究室で開発した遺伝子キャリアを用いる予定である。

4. 研究成果

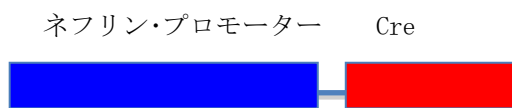
(1) Src, Syk シグナル伝達経路が足細胞に存在していることの解明：当研究では B 細胞受容体、T 細胞受容体、Fc 受容体といった adaptive 免疫反応を行っているシグナル伝達経路から類推して、アダプター蛋白である p130-cas が Src family kinase (Fyn, Lyn, ZAP70 など) や Syk family kinase の SH2 (Src homology2) がネフリンの存在する腎足細胞に発現している可能性を考えた。そこで Mundel の樹立した腎足細胞株を用いてウェスタンブロットと RT-PCR を行い、これらの Src family kinase, Syk family kinase とそのシグナル伝達経路が腎足細胞に発現していることを当研究ではまず解明した。このことは、足細胞の異常が不可逆的なものばかりではなく、アクチン再構築を通して治療できる可能性を示唆している。

(2) 足細胞障害動物モデルの構築：足細胞障害の治療可能性を検討するに当たって、まず足細胞障害の動物モデルを構築する必要がある。そこで当研究では、ネフリンが腎足細胞にしか発現していないことを利用して、ネフリン・プロモーターの下流に Cre 遺伝子を

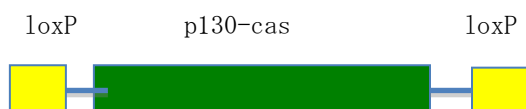
発現するマウスと p130-cas 遺伝子の両端を loxP サイトで挟んだマウスを掛け合わせて、足細胞特異的に p130-Cas をノックアウトしたマウスを作成した。このマウスでは微量アルブミン尿が認められることも見いだしたが、腎障害の程度は軽い。そこで p130-cas の機能を補償していると考えられる cas-L をも同様にして足細胞特異的にノックアウトしたマウスを作成し、p130-cas と Cas-L のダブルノックアウトマウスを作成した。

現在はこのマウスの腎機能異常原因を解析中である。

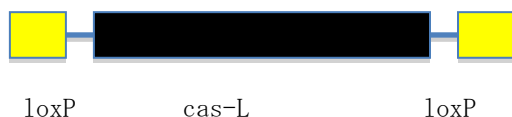
- ① ネフリンプロモーターの下流に Cre 発現遺伝子と導入したトランスジェニックマウス



- ② p130-cas 遺伝子の両端に loxP サイトを導入したマウス



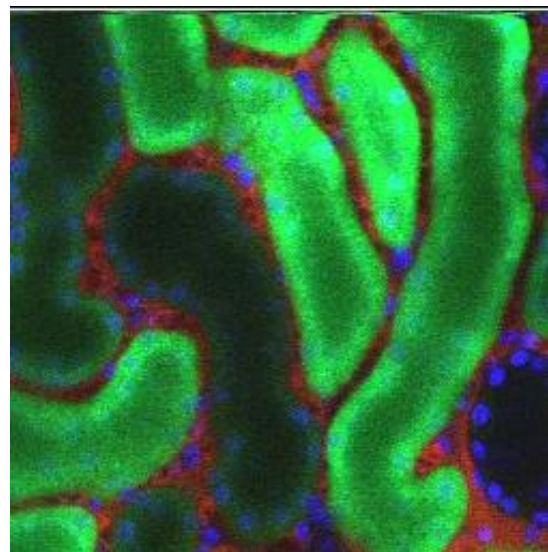
- ③ cas-L 遺伝子の両端に loxP サイトを導入したマウス



まず、①と②の掛け合わせで足細胞特異的 p130-cas ノックアウトマウスを作成した。次に①と③の掛け合わせで足細胞特異的 cas-L ノックアウトマウスを作成した。

最後に、それぞれのノックアウトマウスを掛け合わせることでダブルノックアウトマウスを作成した。

(3) in vivo 共焦点顕微鏡による解析：上述のノックアウトマウスの vivo での糸球体濾過状態をリアルタイムに、全身状態の良好なままで腎血管、尿細管のアルブミンの濾過状態を観察した。即ち、腎血流と糸球体を濾過して尿細管に流れ込む原尿の動きを、内因性アルブミンを Evans blue (MW960 であり、MW68000 のアルブミンの動きをほぼ阻害せずに結合することでマーカーとなる) でマーキングすることで観察した。また、尾静脈から Hoechst 33342 を投与することで観察しやすいように細胞の核も同時に染色できた。



上の写真は in vivo 共焦点画像の動画のある瞬間を静止画にしたものであるが、緑にみえるのが Evans blue でマーキングされた内因性のアルブミンであり、近位尿細管全体に広がっている。これは糸球体を通過したアルブミンを示している。青く見えるのが尿細管細胞の核であり、赤く見えるのが血管である。Evans blue 投与直後は血管のみが緑に染まっていたが、次第に糸球体を通過したアルブミンが尿細管に漏出している像がみえてくる。

このように尿細管においては、尿細管へのアルブミン分泌の動態を観察できた。その結果、足細胞特異的 p130-cas ノックアウトマウスでは特にアルブミンの動態には野生型と比較して僅かしか変化がなかったが、上述のように p130-cas の機能を補償すると考えられている cas L とのダブルノックアウトマウスではアルブミンが大量に尿細管に漏出している。この漏出を定量化する方法は検討中である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) F. Pittella, S.Watanabe et. al.
査読有、“Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles.”
J. Control. Release in press (掲載確定)
(DOI : 10.1016/j.jconrel.2012.05.005)

(2) Y. Matsumoto, S.Watanabe et. al.
査読有、“Direct and Instantaneous Observation of Intravenously Injected Substances Using Intravital Confocal Micro-Videography “
Biomed. Opt. Express, 1 (4), pp1209-1216, 2010
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Direct%20and%20Instantaneous%20Observation%20of%20Intravenously%20Injected%20Substances%20Using%20Intravital%20Confocal%20Micro-Videography>)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 学会名 : 第 61 回高分子学会年次大会
課題名 : ポリカチオン構造の精密設計に基

づいたポリイオンコンプレックス封入 siRNA 分子数の制御
発表者 : 茶谷洋行、渡邊秀美代 et. al
発表場所 : 【パシフィコ横浜、神奈川県横浜市】 2012 年 5 月 30 日

(2) 学会名 : Softinterface International Mini-Symposium on Biointerface-Interface between Bio and Materials
課題名 : Preparation of polyion complexes incorporating the regulated number of siRNA molecules by fine-tuning of polycationic structures
発表者 : Chaya H, Watanabe S et. al
発表場所 : 【つくば国際会議場、茨城県筑波市】 2012 年 3 月 18 日

[図書] (計 1 件)

著者名 : 渡邊秀美代、内田俊也、編集 : 福井次矢/辻 省次、総編集 : 井村裕夫、
出版社 : 中山書店
書名 : 「症候群ハンドブック」
発行年 : 2011,
総頁数と掲載頁 : 792(476-477)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 核酸デリバリー様ユニット構造体
発明者 : 片岡一則、渡邊秀美代 他 6 名
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : NC1201JP
出願年月日 : 平成 24 年 4 月 27 日
国内外の別 : 国際特許

[その他]

ホームページ等
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 秀美代 (WATANABE SUMIYO)

東京大学・大学院医学系研究科・

特任研究員

研究者番号 : 30422314

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし