

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591201

研究課題名(和文)ポドサイトにターゲットを絞った腎障害メカニズムの解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Translating podocyte biology into new therapies and examinations for podocyte injury

研究代表者

浅沼 克彦 (ASANUMA, KATSUHIKO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60449064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糸球体足細胞(ポドサイト)は、血液濾過の最終障壁として働き、その障害により蛋白尿が起こり、慢性的に障害が続くと糸球体から脱落し、糸球体は硬化へと導かれて行く。我々は、ポドサイト障害により細胞死(アポトーシス)が起き、糸球体硬化へと導かれることを見つけた。また、ポドサイトアポトーシスを活性型ビタミンDとNotch2活性化抗体が抑制することを見つけ、慢性腎臓病の新規治療法となりえることを報告した。さらに、ポドサイトに特異的に発現する蛋白であるpodocalyxinがIgA腎症患者の尿中に脱落しており、その尿中濃度を測定することで、IgA腎症の活動性を予測できることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Glomerular visceral epithelial cells, also known as podocytes, serve as the final barrier to urinary protein loss. Podocyte injury may cause podocyte detachment, which leads to glomerulosclerosis. In our established model mice, severe podocyte injury induced podocyte loss and apoptosis, and glomerulosclerosis. Using the mice model, we reported that treatment of 22oxa-calcitriol and Notch2 agonist antibody suppressed podocyte loss and apoptosis. Furthermore, we reported that the measurement of urinary podocalyxin may be a useful biomarker to determine activity of IgA nephropathy and the effectiveness of corticosteroid treatment to IgA nephropathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト 腎障害 ネフローゼ症候群 スリット膜 アポトーシス 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは血中蛋白質の最終的な濾過障壁であり、その障害は著明な蛋白尿を引き起こす。ポドサイト障害は、多くの腎疾患(ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症、糖尿病腎症、ループス腎炎など)や実験腎炎モデルにおいて認められている共通現象である。ポドサイト障害の早期には、足突起間に存在するスリット膜の分子構造の変化が認められ、足突起のアクチン骨格の分布が変化し、足突起は消失してその噛み合わせを失い、その結果として蛋白尿を生じると考えられている(Clin Exp Nephrol. 7:255-9.2003)。ポドサイト障害の持続は、ポドサイトのアポトーシスや GBM からの脱落を引き起こす。ポドサイトの脱落やタンパク尿の持続は糸球体硬化を引き起こし、最終的には、慢性腎不全へと進行して行く(Nephrology. 12:S15-20.2007)。つまり、糸球体硬化から腎不全にいたる過程には、ポドサイトの重篤な障害による足突起の消失とポドサイトの GBM からの脱落が必要であることを示している。

スリット膜の構成蛋白である Neph rin が発見されて以来、ポドサイト障害の研究はスリット膜関連蛋白に集中してきた。しかし、微小変化型ネフローゼのように大量の蛋白尿を生じているにもかかわらず、糸球体硬化へ進展しない病態が存在することを考えると、ポドサイト障害から糸球体硬化への進展にはスリット膜以外の因子も存在することが想像される。蛋白尿から糸球体硬化進展へのメカニズムの解明と糸球体硬化抑制のための新規治療薬を開発するには、ポドサイト障害から糸球体硬化への過程を詳細に明らかにして行く必要がある。我々はこれまで、足突起消失を引き起こすアクチン骨格再構成・糸球体硬化に直接関連しているポドサイトアポトーシスの2点に焦点を絞って研究を続けてきた。

2. 研究の目的

腎臓の糸球体上皮細胞(ポドサイト)は、

糸球体基底膜(GBM)を外側から覆い、血液濾過の最終バリアーとして重要な役割を担っている。ポドサイト障害によりポドサイトの形態変化が起こり、結果として著明な蛋白尿(ネフローゼ症候群)を生じる。また、ポドサイト障害は、アポトーシスなどを誘発し、GBM からのポドサイトの脱落を引き起こし、糸球体硬化から慢性腎不全へと進展していくことがわかっている。しかしながら、ポドサイト障害から蛋白尿が生じる分子生物学的メカニズムやアポトーシスなどの GBM からのポドサイト脱落のメカニズムは、解明する余地が多く残っている。我々は、ポドサイト障害のメカニズムを分子生物学的手法を用い、細胞骨格(アクチン骨格)・アポトーシスの観点から包括的に解明し、糸球体硬化の病態解明と新規治療薬の開発を行うことを最終目的としている。

3. 研究の方法

1) マウスにおけるネフローゼ症候群・糸球体硬化モデルを使用した糸球体硬化進展機序の解明とポドサイト障害にターゲットを絞った新規治療薬の探索と開発。

2) Small Rho GTPase Rac1 のポドサイト特異的ノックアウトマウス(KO)の作成とその解析

3) ポドサイト障害のバイオマーカーの探索

4. 研究成果

1) アドリアマイシン(ADR)腎症マウスは、ネフローゼ症候群・糸球体硬化モデルであるが、本モデルマウスを用い、活性化ビタミン D(オキサロール)が、ポドサイトアポトーシスを減らし、蛋白尿・糸球体硬化を軽減することを報告した。また、Notch2 活性化が、ポドサイト障害を軽減することを見つけ、Notch2 アゴニスト抗体が、ネフローゼ症候群・糸球体硬化に対する

新規治療薬となることを見つけ報告した。

2)ポドサイト特異的 Rac1 ノックアウトマウスは生理的条件下では phenotype に特記すべきことがないが、ADR 腎症を惹起すると WT を比べ、蛋白尿・糸球体硬化が悪化した。Rac1 KO で蛋白尿・糸球体硬化が悪化した原因として、Rac1 ノックアウトポドサイトの細胞移動の抑制が関与していると考えられた(投稿準備中)

3)ポドサイト特異的に発現する膜蛋白に podocalyxin があるが、IgA 腎症患者の尿中 podocalyxin 濃度と腎生検組織病変を比較検討したところ、急性管外性病変と尿中 podocalyxin 濃度に正の相関関係が認められ、尿中 podocalyxin 濃度は、IgA 腎症患者のポドサイト障害のバイオマーカーとして使用できる事が判明した。

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 13 件)

1. Trejo JAO, Asanuma K, Kim EH, Takagi-Akiba M, Nonaka K, Hidaka T, Komatsu M, Tada N, Ueno T, Tomino Y. Transient increase in proteinuria, poly-ubiquitylated proteins and ER stress markers in podocyte-specific autophagy-deficient mice following unilateral nephrectomy. *Biochem Biophys Res Commun.* 446:1190-6. 2014
2. Tanaka E, Asanuma K, Kim EH, Sasaki Y, Trejo JAO, Seki T, Nonaka K, Asao R, Nagai-Hosoe Y, Akiba-Takagi M, Hidaka T, Takagi M, Koyanagi A, Mizutani S, Yagita H, Tomino Y. Notch2 activation ameliorates nephrosis. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms4296 2014 (KA, YT are corresponding author)
3. Kodama F, Asanuma K, Takagi M, Hidaka T, Asanuma E, Fukuda H, Seki T, Takeda Y, Hosoe-Nagai Y, Asao R, Horikoshi S, Tomino Y. Translocation of dendrin to the podocyte nucleus in acute glomerular injury in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 28: 1762-72. 2013 (**F K**, **KA** contributed equally to this publication)
4. Campbell KN, Wong JS, Gupta R, Asanuma K, Sudol M, He JC, Mundel P. YAP promotes cell survival by inhibiting pro-apoptotic dendrin signaling. *J Biol Chem.* 288: 17057-62. 2013
5. Fukami K, Yamagishi SI, Kaifu K, Matsui T, Kaida Y, Ueda S, Takeuchi M, Asanuma K, Okuda S. Telmisartan inhibits AGE-induced podocyte damage and detachment. *Microvasc Res.* 88: 79-83. 2013
6. Ishibashi Y, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Takeuchi M, Asanuma K, Fukami K, Okuda S, Nakamura KI, Yamagishi SI. PEDF inhibits AGE-induced podocyte apoptosis via PPAR-gamma activation. *Microvasc Res.* 85:54-8. 2013
7. Nakata J, Ohsawa I, Onda K, tanimoto M, Kusaba G, Takeda Y, Kobayashi N, Asanuma K, Tanaka Y, Sato M, Inami Y, Suzuki H, Suzuki H, Masuda A, Nonaka K, Sasaki Y, Hisada A, Hamada C, Horikoshi S, Tomino Y. Risk of overexpression of kidney function using GFR-estimating equations in patients with low insulin clearance. *J clin Lab Anal.* 26. 248-253. 2012
8. Lei B, Nakano D, Fujisawa Y, Liu Y, Hitomi H, Kobori H, Mori H, Masaki T, Asanuma K, Tomino Y, Nishiyama A. N-type calcium channel inhibition with Cilnidipine elicits glomerular podocyte protection independent of sympathetic nerve inhibition. *J Pharmacol Sci.* 119. 359-67. 2012
9. Asao R, Asanuma K, Kodama F, Akiba-Takagi M, Hosoe-Nagai Y, Seki T, Takeda Y, Ohsawa I, Mano S, Matsuoka K, Kurosawa H, Ogasawara S, Hirayama Y, Sekine S, Horikoshi S, Hara M, Tomino Y. Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes and histological injury in adult

patients with IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 7. 1385-93. 2012 (**R A, K A contributed equally to this publication**)

10. Lydia A, **Asanuma K**, Nonaka K, Takagi M, Jeong K-H, Kodama F, Asao R, Asanuma E, Prodjosudjadi W, Tomino Y. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. *Am J Nephrol.* 35. 58-68. 2011 (**A L, K A contributed equally to this publication**)
11. Takagi-Akiba M, **Asanuma K**, Tanida I, Tada N, Trejo JAO, Nonaka K, Asanuma E, Eiki Kominami E, Ueno T, Tomino Y. Doxorubicin-induced glomerulosclerosis with proteinuria in GFP-GABARAP transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302. F380-389. 2011
12. Ito N, Nishibori Y, Ito Y, Takagi H, Akimoto Y, Kudo A, **Asanuma K**, Sai Y, Miyamoto KI, Takenaka H, Yan K. mTORC1 activation triggers the unfold protein response in podocytes and leads to nephritic syndrome. *Lab Invest.* 91. 1584-1595. 2011
13. **Asanuma K**, Akiba-Takagi M, Kodama F, Asao R, Nagai Y, Lydia A, Fukuda H, Tanaka E, Shibata T, Takahara H, Hidaka T, Asanuma E, Kominami E, Ueno T, Tomino Y. Dendrin location in podocytes is associated with the disease progression in animal and human glomerulopathy. *Am J Nephrol.* 23: 537-549, 2011

[学会発表](計14件)

1. 田中 絵里子、**淺沼 克彦**、高木 美幸、児玉 史子、浅尾 りん、福田 裕光、八木田 秀雄、川崎 明美、水谷 修紀、富野 康日己。糸球体上皮細胞における Notch 経路再活性化の阻害についての検討。第 45 回日本小児腎臓病学会学術集(平成 22 年 7 月)大阪
2. 高木美幸、**淺沼克彦**、児玉史子、浅尾り

ん、永井佳子、福田裕光、田中絵里子、淺沼悦子、木南英紀、上野隆、富野康日己。

ネフローゼ症候群・糸球体硬化モデルとヒト糸球体疾患におけるスリット膜関連蛋白—デンドリンの核移行と糸球体病変との関連性。第 12 回東京腎炎・ネフローゼ研究会(平成 23 年 7 月 23 日)東京

3. **Katsuhiko Asanuma**, Miyuki Takagi, Kanae Nonaka, Etsuko Asanuma, Takashi Ueno, Yasuhiko Timino. Overexpression of GFP-GABARAP causes deterioration of proteinuria and glomerulosclerosis in adriamycin-induced nephropathy mice. **ASN Annual Meeting, 2011. November 12.** Philadelphia

4. 田中絵里子、**淺沼克彦**、関卓人、野中香苗、浅尾りん、細江佳子、高木美幸、水谷修紀、八木田秀雄、富野康日己。ポドサイト障害における Notch 再活性化と receptor 特異的糸球体硬化抑制機能の検討。第 55 回日本腎臓学会学術総会(平成 24 年 6 月 1 日)横浜

5. Lidia Aida、**淺沼克彦**、野中香苗、高木美幸、富野康日己。Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. 第 55 回日本腎臓学会学術総会(平成 24 年 6 月 3 日)横浜

6. 田中絵里子、**淺沼克彦**、関卓人、野中香苗、浅尾りん、細江佳子、高木美幸、水谷修紀、八木田秀雄、富野康日己。ポドサイト障害における Notch2 pathway 再活性化は糸球体硬化を抑制する。第 47 回小児腎臓病学会学術集会(平成 24 年 6 月 29 日)東京

7. Rin Asao, **Katsuhiko Asanuma**, Fumiko Kodama, Miyuki Akiba-Takagi, Yoshiko Nagai-Hosoe, Takuto Seki, Yukihiko Takeda, Isao Ohsawa, Satoshi Mano, Kiyoshi Matsuoka, Hiroyuki Kurosawa, Shinya Ogasawara, Yoshiaki Hirayama, Satoshi,

Sakari Sekine, Satoshi Horikoshi, Masanori Hara, Yasuhiko Tomino. Relationship between Urinary Podocalyxin Level and Histological Activity in Patients with IgA Nephropathy. **The 9th international podocyte conference, 2012, April 23, Miami.**

8. Yoshiko Nagai-Hosoe, Katsuhiko Asanuma, Kanae Nonaka, Takuto Seki, Rin Asao, Eriko Tanaka, Lawrence B. Holzman, Ryuichi Nisahnakamura and Yasuhiko Tomino. The role of *Sall1*, indispensable protein for kidney development, in podocytes under physiological and pathological conditions. **9th International Podocyte Conference, 2012. April 24, Miami**

9. Eriko Tanaka, Katsuhiko Asanuma, Kanae Nonaka, Takuto Seki, Rin Asao, Yoshiko Hosoe, Miyuki Takagi, Alejandro Oliva, Shuki Mizutani, Hideo Yagita, Yasuhiko Tomino. Notch2 pathway reactivation ameliorates urinary protein and glomerular sclerosis in adriamycin nephropathy mice. 9th International Podocyte Conference. April 2012.

10. 細江佳子、淺沼克彦、西中村隆一、富野康日己. 腎臓の発生に必須な *Sall1* 蛋白の糸球体足細胞 (ポドサイト) における役割. 第3回分子腎臓フォーラム(平成24年9月1日)ベルサール八重洲、東京

11. 細江佳子、淺沼克彦、上野隆、西中村隆一、富野康日己. 腎臓の発生に必須な蛋白質である *Sall1* のポドサイト障害からの回復期における保護的役割. 第56回日本腎臓学会学術総会(平成25年5月12日)東京国際フォーラム、東京

12. 田中絵里子、淺沼克彦、佐々木有、関卓人、Oliva Trejo Juan Alejandro、野中香苗、浅尾りん、細江佳子、日高輝夫、水谷修紀、八木田秀雄、富野康日己. Notch2 アゴニスト抗体による糸球体硬化改善効果の検討.

第56回日本腎臓学会学術総会(平成25年5月11日)東京国際フォーラム、東京

13. 木原正夫、鈴木仁、淺沼克彦、堀越哲、富野康日己. 血液透析患者における大動脈弓部石灰化とその増悪因子の検討. 第58回日本透析医学会学術集会・総会(平成25年6月23日)福岡国際会議場、博多

14. 淺沼克彦、浅尾りん、関卓人、富野康日己. ポドサイト障害時における *Rac1* の役割について. 第9回弥彦ポドサイトセミナー(平成26年3月1日)コープシティー花園ガレソンホール、新潟

[図書](計10件)

1. ここが知りたい生活習慣病・腎臓病・高血圧対策 Q&A100 中外医学社 2012年(共著者)

Q34 血液中の尿酸値が高いと言われましたが、そのままですとどうなるでしょうか? P39

Q35 腎臓の機能評価に血清クレアチニン値が使われていますが、どういうことでしょうか? P40

2. ビジュアル糖尿病腎症のすべて 中山書店 2012年(共著者)
腎症の病因と病態生理:ポドサイト障害 p59-p64

3. 透析ナーシング Q&A 総合医学社 2012年(共著者)

Q44 透析患者の降圧目標はどのくらいですか? p90-p91

Q69 透析中に携帯電話を使用しても問題はありますか? p145

4. Annual Review 腎臓、中外医学社 2013年(共著者)

III. Clinical nephropathy, A 糸球体障害, 2. 足細胞障害とオートファジー p165-p171

5. 臨床医学の基礎 放射線診療を支える人のために、PILAR PRESS 2013年(共著者)

6 腎泌尿器 p169-206

6. はじめての根拠がわかる看護実践禁忌な

び、株式会社南江堂 2013 年（共著者）
肝・腎・皮膚などの生検後は、患者さんのバイタルサインの確認を怠ってはならない。脊髄造影後に安静をとる患者さんの頭位は、低くしてはならない。P62-p63

7. 「CKD の診療テキスト」中外医学社、2013 年（共著者） B. 腎臓専門医の診療、1. 腎機能・尿検査、尿蛋白の selectivity index（選択指数）とは何ですか？ p148、難治性ネフローゼ症候群とはどういう疾患ですか？ p217

8. Annual Review 腎臓、中外医学社 2014 年（共著者） D. 検査診断 ポドサイト障害の評価法 p129-p135

9. 臨床病理レビュー特集号、若手医師と臨床検査技師のための尿検査・腎機能検査の実際と臨床的意義、第 2 章 各論 I. 尿検査尿検査の実際と臨床的意義、1 2) ポドカリキシン定量

10. わかりやすい内科学(第 4 版)文光堂 2014 年（共著者）第 10 章 腎・尿路疾患、水・電解質異常、5. 原発性糸球体疾患、III 慢性糸球体腎炎、a. 慢性糸球体腎炎、b. IgA 腎症 p832-p836

〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：「腎疾患治療薬」・
発明者：田中絵里子、八木田秀雄、淺沼克彦、富野康己
権利者：学校法人順天堂
種類：
番号：特願 2012-105132
出願年月日：平成 24 年 5 月 2 日
国内外の別：国内

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
淺沼 克彦 (KATSUHIKO ASANUMA)、京都大学大学院医学研究科、特定准教授

研究者番号：60449064

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：