

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591571

研究課題名(和文)腎発生及びCAKUTでの活性酸素と細胞接着のシグナルクロストークとそ役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of signal crosstalk by reactive oxygen species and cell adhesion in nephrogenesis and CAKUT

研究代表者

近藤 秀治 (KONDO, Shuji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：00380080

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)：先天性腎尿路奇形(CAKUT)の病態には、尿管芽分岐やネフロン形成の腎発生の基本的現象が密接に関与している。本研究では、尿管芽分岐やネフロン形成部位でNADPHオキシダーゼとその産物である活性酸素が検出され、阻害実験から尿管芽分岐やネフロン形成が抑制され低形成・異形成腎の病態に関与する可能性があることが判明した。この機構には細胞増殖、遊走、アポトーシス等の細胞機能と接着関連分子・MAPキナーゼ等のリン酸化シグナル伝達が密接に関与していることが判明した。以上から、NADPHオキシダーゼ由来の活性酸素は尿管芽分岐とネフロン形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Two nephrogenic basic phenomena, ureteric bud branching and nephrogenesis, closely participate in the development of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). In this study, NADPH oxidase and the product, reactive oxygen species (ROS), were detected in the area of ureteric bud branching and nephrogenesis. The inhibition of NADPH oxidase and ROS production resulted in the suppression of ureteric bud branching and nephrogenesis, which contributed to hypoplastic and dysplastic kidney. Cell behavior (cell proliferation, migration, apoptosis) and phosphorylation signal transduction by both of cell adhesion-related molecules and MAP kinase were closely associated with the mechanism. Thus, ROS produced by NADPH oxidase plays an important role in ureteric bud branching and nephrogenesis.

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：CAKUT 活性酸素 NADPHオキシダーゼ 尿管芽分岐 ネフロン形成

1. 研究開始当初の背景

低・異形成腎をはじめとする先天性腎尿路奇形(CAKUT)は、近年の小児末期腎不全をきたす主要な原因疾患となっており、小児腎移植の原因疾患として最多を占めている(移植33:69, 2009)。腎不全の子どもを一人でも少なくするために、CAKUTを引き起こす腎発生異常の病態を明らかにし、治療法を開発する必要がある。また腎移植医療のレベルが進歩したにも関わらず、倫理上の問題などから腎不全の子どもへ腎臓が十分に提供されていない。日本が発信するiPS細胞を分化させ腎臓を再生し移植応用されることが期待されている現在、いかに糸球体構成細胞、尿管及び集合管、腎血管細胞などからなる複雑な腎臓を再生するのか、iPS細胞から再生された臓器の腫瘍発生のリスクをいかに回避するのか等、腎臓再生のために腎発生に関する多くの基礎的研究が要求されている(Exp Cell Res 416:2571, 2010)。さらに、近年の社会構造の変化と新生児医療レベルの向上から、早期出生の子どもが出生時のネフロン数減少により高血圧を罹患するリスクの増加も指摘されるようになってきた(Devel Cell 18:698, 2010)。

我々は、進行性腎炎が糸球体硬化に至る機序として細胞-細胞外基質(ECM)間接着を通じて増殖や遊走などの細胞機能及びECM構築の異常が関わっている事を報告した(J Am Soc Nephrol. 10:779,1999, Kidney Int. 58:1088,2000, J Cell Physiol.198:470,2004, Nephrol Dial Transplant. 21:2380, 2006 Life Sci. 78:1794, 2006)。一方で、活性酸素(ROS)産生系 NADPH オキシダーゼから産生されるROSも糸球体硬化病変形成に関与していることも報告した(Am J Physiol Renal Physiol. 298:F167, 2010, Am J Physiol Renal Physiol. 295:F1457, 2008, J Am Soc Nephrol. 17:783, 2006)。これらの腎炎等の病理像形成に関わる分子は腎発生の段階でも発現がみられ重要な役割を果たすと考えられている。

2. 研究の目的

CAKUTの病態と密接に関わる尿管芽分岐やネフロン形成という腎発生の基本的現象と細胞増殖、細胞遊走などの細胞機能が接着関連分子やNADPH オキシダーゼ由来ROSの直接的、又はシグナル伝達のクロストークにより間接的に制御されているかを以下の3点を中心に検討する。

(1) NADPH オキシダーゼ由来ROSが腎発生の尿管芽分岐とネフロン形成、細胞の接着や遊走などの調整機能に関わっているかを培養細胞や器官培養の手法を用いて検討する。

(2) ROSが細胞接着シグナル伝達に関わる機構を明らかにする。

(3) ROS産生異常や細胞接着シグナル伝達

の異常がCAKUTでの発症及び進展に関わっているかを明らかにし、治療法開発を推進する。

3. 研究の方法

(1) 尿管芽分岐やネフロン形成にNADPH オキシダーゼ由来ROSが関与しているかの検討
ラット胎生14日~16日(E14~E16), E18, 日齢1日(P1), P7, P20, P42の腎を採取し、Nox1, 2, 3, 4, 5とp22phox, p47phox, p67phoxに対する抗体を用いて免疫組織化学(ABC法)とwestern blot法で腎発生における蛋白発現と局在の経過を調べた。

器官培養を用いて、NADPH阻害剤(DPI, apocynin)の尿管芽の分岐とネフロン形成への影響を調べた。

活性酸素の尿管芽分岐とネフロン形成への関与の検討(DHEを用いた組織内活性酸素検出):NADPH オキシダーゼ阻害剤を用いて活性酸素産生を抑制し、活性酸素の尿管芽分岐やネフロン形成への関与を検討。

細胞増殖とアポトーシスの腎発生での検討:増殖マーカー(PCNA)とアポトーシス(カスパーゼの活性化)の検出

シグナル機構の解析:器官培養を用いて活性酸素などを阻害することにより、細胞接着やその働きと、シグナル分子のリン酸化への影響を調べる。

(2) 細胞接着分子と活性酸素産生系、活性酸素との関わり

上記リン酸化分子の検出・局在への関わりを比較検討により解析

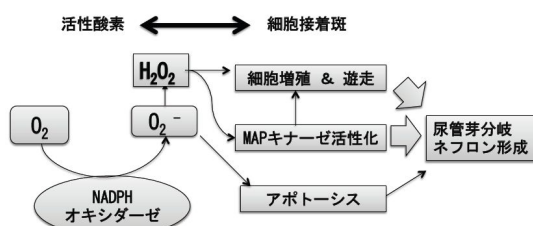
4. 研究成果

免疫組織化学ではNADPH オキシダーゼの構成因子(Nox1, 2, 3, 4, 5, p22phox, p47phox, p67phox)の発現は、尿管芽上皮細胞、及びネフロン形成部位の上皮細胞で認められた。未熟糸球体のメサンギウム細胞、内皮細胞でも認められた。ウェスタンブロットで、胎児期及び新生児期にNADPH オキシダーゼのすべての構成因子が発現していることが分かった。DHE assayでは、尿管芽分岐とネフロン形成部位で活性酸素の産生が亢進しており、NADPH オキシダーゼの発現と一致した。E14の器官培養ではNADPH阻害剤diphenyleneiodonium (1×10^{-5} M)とapocynin (1×10^{-3} M)は有意に尿管芽の分岐を抑制した。これは、活性酸素の産生抑制、ERK1/2のリン酸化の抑制と活性型カスパーゼ3の亢進を伴っていた。一方、E18の器官培養ではNADPH阻害剤はネフロン形成を抑制した。この現象には、活性酸素の産生抑制、Pax2の発現低下、PCNA陽性細胞数の減少、ERK1/2のリン酸化の抑制と活性型カスパーゼ3の亢進を伴っていた。また、尿管芽分岐とネフロン形成部位では、細胞接着斑蛋白(FAKやパキシリン)のリン酸化も同様に亢進していた。

以上から、NADPH オキシダーゼ由来の活性

酸素は細胞増殖とアポトーシスに影響し、尿管芽分岐とネフロン形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

また、これらの現象は、CAKUT や低形成 / 異形成腎の発生にも影響していることが判明し、腎発生でみられる活性酸素と細胞接着のシグナルが相補に補う作用のバランスの異常が、CAKUT の形成に関与しており、このメカニズムを標的とした介入が CAKUT の治療の手段となる (下図) 。



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 9 件)

Urushihara M, Seki Y, Tayama T, Nagai T, Kinoshita Y, Jamba A, Kondo S, Kagami S. Glomerular angiotensin-converting enzyme 2 in pediatric IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 査読無. 2013, 38, 355-367. DOI: 10.1159/000355618.

Kishi N, Suga K, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Kondo S, Kitano E, Hatanaka M, Kitamura H, Sato T, Maeda A, Kagami S. A case of infantile systemic lupus erythematosus with severe lupus nephritis and EBV infection. *CEN Case Rep*, 査読無, 2013, 2, 190-193.

Urushihara M, Kinoshita Y, Kondo S, Kagami S: Involvement of the intrarenal renin-angiotensin system in experimental models of glomerulonephritis. *J Biomed Biotechnol* 査読有, 2012:601786, 2012

Suga K, Kondo S, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Kagami S: Glomerular expression of hydrogen peroxide-inducible clone-5 in human and rat progressive mesangial proliferative glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol*, 査読有, 120:e59-68, 2012

DOI:10.1159/000335780

近藤秀治、Ariunbold Jamba, 松浦里、漆原真樹、木下ゆき子、須賀健一、香美祥二: ラット腎発生でのFAKのリン酸化と役割. 発達腎研究会誌 査読有 20:21-24, 2012

Matsuura S, Kondo S, Suga K, Kinoshita Y, Urushihara M, Kagami S: Expression and localization of focal adhesion proteins in the developing rat kidney. *J Histochem Cytochem*. 査読有, 59:864-74, 2011

DOI:10.1369/0022155411413929

Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, Shimizu M, Nishiyama A, Kawachi H, Kagami S: Angiotensin II type 1 receptor blockade suppress glomerular renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-GBM glomerulonephritis. *Transl Res*. 査読有, 158:235-48, 2011

DOI:10.1016/j.trsl.2011.05.003

Shimizu M, Sekiguchi T, Kishi N, Goji A, Takahashi T, Kozan H, Sakaguchi Z, Kinoshita Y, Matsuura S, Suga K, Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Ohara K: A case of a 6-year-old girl with ANCA-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*. 査読有, 21:2380-90, 2011

DOI:10.1007/s10157-011-0423-3

松浦里、近藤秀治、須賀健一、木下ゆき子、漆原真樹、香美祥二. 尿管芽分岐とネフロン形成におけるNADPHオキシダーゼの役割. 発達腎研究会誌 査読有 19: 11-13, 2011.

[学会発表] (計 29 件)

Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Tamaki T, Kagami S: Contribution of hydrogen peroxide-inducible clone-5 to the regulation of mesangial cell proliferation in mesangioproliferative glomerulonephritis

The annual meeting of American society of nephrology Kidney Week 2013 ,2013年 11月5-10日, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA.

Tayama T, Urushihara M, Seki Y, Kinoshita Y, Nagai T, Jamba A, Kondo S, Kagami S: Effect of direct renin inhibitor on renal inflammation and (pro)renin receptor in crescentic glomerulonephritis. The Sixteen Congress of the International Pediatric Nephrology Association. 2013年8月30日 -9月3日, Shanghai International Convention Center, Shanghai, China.

Seki Y, Urushihara M, Tayama T, Nagai T, Kinoshita Y, Jamba A, Kondo S, Kagami S: Glomerular ACE2 expression is enhanced in pediatric IgA nephropathy. The Sixteen Congress of the International Pediatric Nephrology Association. 2013年8月30日 -9月3日, Shanghai

International Convention Center, Shanghai, China.
松浦 里、永井 隆、木下ゆき子、須賀健一、漆原真樹、近藤秀治、香美祥二：レニンアンジオテンシン系阻害薬を投与しているアルポート症候群の3例
第30回中国四小児腎臓病学会. 2013年11月17日、徳島シビックセンター (徳島県).
今田久美子、永井 隆、漆原真樹、近藤秀治、高橋正幸、庄野実希、藤野修司、山上貴司、松岡 優、香美祥二：精神運動発達遅滞と右多趾症を合併した常染色体劣性多発性嚢胞腎(ARPKD)と考えられた1例
第30回中国四小児腎臓病学会. 2013年11月17日、徳島シビックセンター (徳島県).
永井隆、富本亜由美、木下ゆき子、漆原真樹、近藤秀治、宮崎雅仁、香美祥二：Septo-optic dysplasiaの末期腎不全に対して維持血液透析を導入した一例
第35回日本小児腎不全学会学術集会. 2013年10月24日-25日、磐梯熱海温泉 ホテル華の湯 (福島県).
永井隆、尾崎夏子、木下ゆき子、松浦里、漆原真樹、近藤秀治、香美祥二：重症心身障害児(者)に透析を導入した二症例. 第43回日本腎臓学会学術集会西部大会 2013年10月11日-12日、松山全日空ホテル (愛媛県)
漆原真樹、関勇輔、田山貴広、永井隆、木下ゆき子、Ariunbold Jamba、近藤秀治、香美祥二：小児IgA腎症の病態進展におけるACE2の役割検討.
第48回日本小児腎臓病学会学術集会. 2013年6月28日-29日、あわぎんホール (徳島県).
永井隆、万野朱美、漆原真樹、近藤秀治、森健治、香美祥二：ネフローゼ症候群を呈したCockayne症候群の一例.
第48回日本小児腎臓病学会学術集会. 2013年6月28日-29日、あわぎんホール (徳島県).
Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Joo-ri Kim-Kaneyama, Miyazaki A, Kagami S: Hic-5 regulates mesangial cell proliferation in proliferative glomerulonephritis
第48回日本小児腎臓病学会学術集会. 2013年6月28日-29日、あわぎんホール (徳島県).
漆原真樹、木下ゆき子、永井隆、Ariunbold Jamba、近藤秀治、香美祥二：ラット半月体形成性腎炎モデルにおけるアリスケレンの治療効果 第56回日本腎臓学会学術総会. 2013年5月10-12日、東京国際フォーラム (東京都).
永井隆、万野朱美、漆原真樹、近藤秀治、森健治、香美祥二：ネフローゼ症候群を呈したCockayne症候群の一例 第116回日本小児科学会学術集会. 2013年4月19-21日、広島国際会議場 (広島県).

Matsuura S, Kondo S, Kinoshita Y, Suga K, Urushihara M, Kishi N, Nagai T, Jamba A, Kagami S: Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase contribute to ureteric bud branching and nephrogenesis. Pediatric Academic societies annual meeting 2012. 2012年4月28日-5月1日、Hynes Convention Center, Boston, MA, USA.
Urushihara M, Kinoshita Y, Nagai T, Kondo S, Jamba A, Tamaki T, Kagami S: Effect of aliskiren on renal inflammation and (pro)renin receptor in crescentic glomerulonephritis.
The American Society of Nephrology Renal Week 2012. 2012年10月30日-11月4日、San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.
永井隆、木下ゆき子、岸夏子、松浦里、須賀健一、漆原真樹、近藤秀治、香美祥二：ブドウ膜炎に伴う尿細管間質性腎炎の再発に対してシクロスポリンが奏効した一女兒例. 第42回日本腎臓学会学術集会西部大会. 2012年10月26日-27日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県).
近藤秀治、松浦里、Ariunbold Jamba、漆原真樹、木下ゆき子、永井隆、須賀健一、岸夏子、香美祥二：進行性糸球体腎炎と培養糸球体内皮細胞における p63 の発現検討. 第47回日本小児腎臓病学会学術集会. 2012年6月29日-30日、都市センターホテル (東京都).
Ariunbold Jamba、近藤秀治、漆原真樹、木下ゆき子、永井隆、松浦里、須賀健一、岸夏子、香美祥二：Enhanced expression of glomerular angiotensinogen in the progressive mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat
第47回日本小児腎臓病学会学術集会. 2012年6月29日-30日、都市センターホテル (東京都).
近藤秀治、Ariunbold Jamba、松浦里、漆原真樹、木下ゆき子、須賀健一、永井隆、香美祥二：進行性糸球体腎炎でのアンジオテンシン 関連糸球体内皮細胞障害における p63 の発現. 第55回日本腎臓学会学術総会. 2012年6月1日-3日、パシフィコ横浜 会議センター (神奈川県).
Ariunbold Jamba、近藤秀治、漆原真樹、木下ゆき子、松浦里、須賀健一、永井隆、香美祥二：ラット進行性メサンギウム増殖性糸球体腎炎におけるアンジオテンシノーゲンの発現亢進 (glomerular angiotensinogen expression is enhanced in the progressive mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat) 第55回日本腎臓学会学術総会. 2012年6月1日-3日、パシフィコ横浜 会議センター (神奈川県).

漆原真樹、木下ゆき子、近藤秀治、須賀健一、松浦里、高松昌徳、香美祥二：尿中アンジオテンシノーゲン測定による小児慢性腎炎患者の新たな病態指標 第115回日本小児科学会学術集会. 2012年4月20日-22日、福岡国際会議場 (福岡県).

- ⑳ Urushihara M, Kinoshita Y, Matsuura S, Suga K, Takamatsu M, Shimizu M, Kondo S, Kobori H, Kagami S. Urinary angiotensinogen as a biomarker of the intrarenal status of the renin-angiotensin system in patients with chronic glomerulonephritis. 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology 2011. 2011年6月2日-4日、Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan.
- ㉑ Matsuura S, Kondo S, Kinoshita Y, Suga K, Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kishi N, Kagami S. The role of NADPH oxidase (Nox) in ureteric bud branching and nephrogenesis. 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology 2011. 2011年6月2日-4日、Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan.
- ㉒ Nagai T, Kinoshita Y, Matsuura S, Suga K, Urushihara M, Kondo S, Kagami S: A case of membranous nephropathy with cavernous hemangioma. 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology 2011. 2011年6月2日-4日、Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan.
- ㉓ Matsuura S, Kondo S, Suga K, Kinoshita Y, Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kishi N, Kagami S. A case of membranous nephropathy and open angle glaucoma complicated with asymptomatic Sjogren's syndrome. 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology 2011. 2011年6月2日-4日、Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan.
- ㉔ Kondo S, Matsuura S, Kinoshita Y, Suga K, Urushihara M, Nagai T, Tamaki T, Kagami S: The expression of NADPH oxidase and reactive oxygen species (ROS) production contribute to ureteric bud branching and nephrogenesis. World Congress of Nephrology 2011. 2011年4月8日-12日、Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada.
- ㉕ 木下ゆき子、近藤秀治、須賀健一、松浦里、清水真樹、高松昌徳、漆原真樹、香美祥二：半月体形成性糸球体腎炎の進展におけるRAS、活性酸素の役割。第23回腎とフリーラジカル研究会。平成23年10月2日、グランドパレス (徳島県)。
- ㉖ 木下 ゆき子、森 達夫、須賀 健一、松浦

里、近藤 秀治、漆原 真樹、永井 隆、中川 竜二、西條 隆彦、森 健治、香美 祥二：伊藤白斑、滑脳症、難治性てんかんに膀胱尿管逆流(VUR)を合併した一男児例 第41回日本腎臓学会西部学術大会.平成23年9月30日、あわぎんホール (徳島県)。

- ㉗ 近藤秀治、Jamba Ariunbold、松浦里、漆原真樹、木下ゆき子、須賀健一、香美祥二：ラット腎発生でのFAKの発現とそのリン酸化。第20回発達腎研究会.平成23年8月27日、駿河台日本大学病院 (東京都)。
- ㉘ 松浦里、近藤秀治、須賀健一、木下ゆき子、漆原真樹、香美祥二：腎発生におけるNADPH オキシダーゼ(Nox)の役割 第54回日本腎臓学会学術集会.平成23年6月15日 17日、パシフィコ横浜 (神奈川県)。

〔図書〕(計 3 件)

小児特発性ネフローゼ症候群診療ガイドライン作成委員会 (近藤秀治)、診断と治療社、小児特発性ネフローゼ症候群診療ガイドライン 2013, 2013. 80 (62-69)

香美祥二、近藤秀治、東京医学社、エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン2013, 2013.259 (163-207)

近藤秀治、診断と治療社、小児腎臓病学 (第2章 腎の発生と分化 1) 腎の発生・分化の概要, 2012(初版).460(31-33)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 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
徳島大学医学部小児科
<http://www.tokudai-pediatrics.net/index.html>

(1)研究代表者

近藤 秀治 (KONDO, Shuji)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師
研究者番号：00380080

(2)研究分担者

香美 祥二 (KAGAMI, Shoji)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：00224337

(3)連携研究者

()

研究者番号：