

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659415

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の進展におけるポドサイトとメサンギウム細胞の相互作用の意義

研究課題名(英文) Role of secreted FSP1 in the progression of diabetic nephropathy, especially in podocyte-mesangial crosstalk.

研究代表者

岩野 正之 (IWANO, MASAYUKI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：20275324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：活動性糸球体病変には、ポドサイト特異的にFSP1の過剰発現が認められる。本研究では、分泌型FSP1を介したポドサイト-メサンギウム細胞連関について検討した。FSP1の生物活性が、FSP1の受容体として報告されているAGE受容体(RAGE)を介するか否かも検討した。リコンビナントFSP1の刺激により、メサンギウム細胞で発現誘導される腎保護因子5種と発現抑制される腎疾患進展因子1種が新たに同定された。FSP1の生物活性はRAGEを介するものではなかった。以上の成績から、ポドサイトで産生されるFSP1は、腎保護作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：FSP1-positive podocytes were observed in active glomerular damage. In this study, we investigated whether secreted FSP1 from podocytes has some biological effects on cultured mesangial cells through secreted FSP1 receptor, RAGE. We newly found that recombinant FSP1 induced five renoprotective factors and suppressed one factor associated with glomerular injury in cultured mesangial cells and these induction and suppression were not mediated through RAGE. These results suggest that secreted FSP1 has renoprotective effects and play a role in podocyte-mesangial crosstalk.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：FSP1 RAGE ポドサイト メサンギウム細胞

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast specific protein 1 (FSP1)は線維芽細胞特異的に発現する分子であり、線維芽細胞の形態維持や運動能に関与している。われわれは、腎間質線維化の進展に尿細管上皮細胞の FSP1 陽性線維芽細胞への形質変異(EMT) が重要な役割を果たすことを明らかにした (Iwano M, et al. J Clin Invest 2002, Iwano M, et al. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004, Iwano M, et al. Mol Ther 2001)。さらに、われわれは IgA 腎症患者の腎生検を用いた組織学的検討から、FSP1 陽性線維芽細胞数が IgA 腎症患者の予後を決定する最も重要な因子であることを明らかにしている (Nishitani Y, Iwano M, et al. Kidney Int 2005, Harada K, Iwano M, et al. Nephrol Dial Transplant 2008)。また、hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)を中心とした低酸素応答が EMT と腎間質線維化を誘導することも明らかにした (Higgins DF, Iwano M, et al. J Clin Invest 2007, Kimura K, Iwano M, et al. Am J Physiol-Renal 2008)。これらの検討は間質領域を中心に実施しており、糸球体内の FSP1 発現については検討されていなかった。最近になり、われわれは糖尿病性腎症を含めた糸球体疾患において、糸球体障害の進展とともにポドサイトでの FSP1 の発現亢進が認められ、分泌型 FSP1 が尿中に検出されることを報告している (Yamaguchi Y, Iwano M, et al. Am J Kidney Dis 2009, Iwano M, et al. J Am Soc Nephrol, 2012)。一方、糸球体メサンギウム細胞には RAGE が発現しており、糖尿病性腎症に認められる糸球体硬化の発症・進展に関与すると考えられている(Diabetes 55:2510-22, 2006)。

ポドサイトで産生された vascular endothelial cell growth factor (VEGF)は、糸球体基底膜内を拡散し、糸球体内皮細胞に発現した受容体(Flk-1)に結合して係蹄構造の維持に重要な役割を果たすと考えられて

いる (N Engl J Med 358:1129-36, 2008)。

すなわち、ポドサイトと内皮細胞間には細胞間相互作用の存在が示されているが、ポドサイトとメサンギウム細胞間の細胞間相互作用についての報告は極めて少ない。本研究では、ポドサイトで分泌された FSP1 が糸球体基底膜内を拡散し、メサンギウム細胞に発現した受容体(RAGE)に結合して生物活性を発揮するか否かを検討する。糖尿病性腎症の進展における FSP1-RAGE 系の意義を明確にできれば、新規発症機序の解明や新規治療薬開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

FSP1 は分泌蛋白としての生物活性も有しており、受容体は AGE 受容体(RAGE)であることが報告されている。そこで、われわれは FSP1-RAGE 系を介するポドサイトとメサンギウム細胞の相互作用が糖尿病性腎症の進展あるいは進展阻止に重要な役割を果たす可能性があると考えている。本研究では、リコンビナント FSP1 と RAGE ノックアウトマウス (RAGE^{-/-})から作製したメサンギウム細胞を用いた *in vitro* の実験系、および糖尿病性腎症モデルを用いた *in vivo* の実験系で、糖尿病性腎症の進展における FSP1-RAGE 系の重要性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養メサンギウム細胞に対する FSP1 の作用

RAGE^{+/+}マウス由来の培養メサンギウム細胞 (RAGE^{+/+}MC)と RAGE^{-/-}マウス由来の培養メサンギウム細胞 (RAGE^{-/-}MC)に、リコンビナントマウス FSP1 (rFSP1)を 10 μ M の濃度で添加後、12h 後に total RNA を抽出した。rFSP1 の添加により MC で有意に発現が亢進あるいは減弱する因子を新たに探索する目的で、cDNA アレイ解析を用いた網羅的遺伝子解析 (ジェネティックラボ社の Gene Chip 受託解析) を実施した。

(2) 糖尿病性腎症モデルマウスの作製

ポドサイトにおける FSP1 の発現が糖尿病性腎症の進展に関与するかを検討するために、糖尿病性腎症モデルの作製を試みた。われわれは、分泌型 FSP1 は新規 TLR4 抑制作用があることを見出して、特許出願中である。1型糖尿病モデルマウス(ストレプトゾトシン投与モデル)を high fat diet (HFD)条件下で飼育する(STZ+HFD モデル)ことで、メサンギウム増生と蛋白尿を誘導できることが報告されているが、このモデルにおいては TLR4 を介して糖尿病性腎症が惹起される(Diabetologia 2012 Aug;55(8):2256-66)。本研究ではこの手法を用いて、糖尿病性腎症を試みた。

4. 研究成果

(1) 培養メサンギウム細胞に対する FSP1 の作用

rFSP1 の添加により MC で有意に発現が亢進あるいは減弱する因子を新たに探索する目的で、cDNA アレイ解析を用いた網羅的遺伝子解析を実施した結果、2 倍以上発現が上昇している 24 種類の遺伝子と 0.5 倍以下に発現が低下している 20 種類の遺伝子が同定された。その中に、既報から腎炎の進行あるいは抑制に関与する 6 種類の因子が選択された(図 1)。発現上昇がみられた 5 種類の因子は、すべて腎炎の進展を抑制する可能性があり、発現低下がみられた 1 種類の因子は、腎炎の進展因子であった。これらの結果から、分泌型 FSP1 は腎保護的に働く可能性が高いことが示唆された。次に、RAGE+/+MC と RAGE-/-MC において、分泌型 FSP1 の添加による上記 6 種類の遺伝子発現の変動を検討した。これらの腎炎関連因子の発現が有意に変動することが確認できたが、RAGE の有無による発現変化は認められなかった。したがって、FSP1 による腎炎関連因子の変動は RAGE を介する可能性は低いと考えられた。この結果が

得られたため、RAGE-/-を用いる in vivo の実験系は中止することにした。

また、分泌型 FSP1 により発現が誘導されることが報告されている matrix metalloproteinases (MMP1,2,3,9,13) や osteopontin の RNA 発現は、MC では誘導されていなかった。

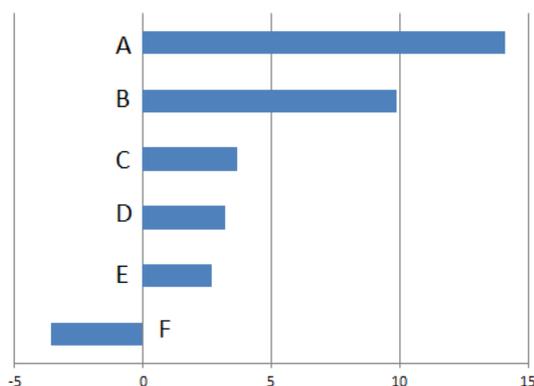


図 1 .FSP1 の添加により発現変動がみられた因子

(2) 糖尿病性腎症モデルマウスの作製

BALB/c マウスおよび C57/B6 マウスの 2 種類の野生型マウスを用いて、既報に従い、本モデルの作製を試みた。計 5 回の作製を行ったが、アルブミン尿の誘導はみられるものの糸球体病変は観察できなかった(図 2、図 3)。陽性コントロールにおいて、糸球体病変が認められなかったため、遺伝子改変マウスを用いたモデル作製実験は中止することにした。

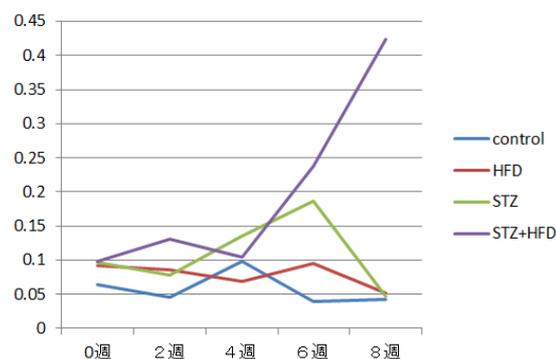


図 2 . 糖尿病性腎症モデルにおけるアルブミン尿

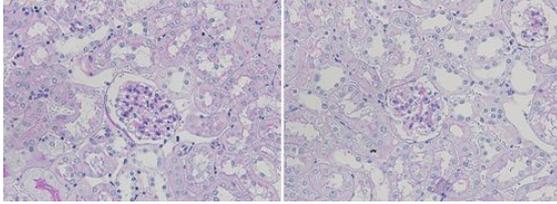


図3 . 糖尿病性腎症モデルにおける糸球体病変。STZ+HFD モデル (右図) では、糸球体病変は観察されなかった。左図は、正常コントロールマウスの糸球体。

今後は、確実に糸球体病変が出現するモデルである BTBR ob/ob マウスを用いることで、同様の研究を再度チャレンジする必要がある。

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 6 件)

Ikeda S, Yamamoto H, Masuda M, Takei Y, Nakahashi O, Kozai M, Tanaka S, Nakao M, Taketani Y, Segawa H, Iwano M, Miyamoto K, Takeda E. Downregulation of renal type IIa sodium-dependent phosphate cotransporter during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Apr;306(7):F744-50. doi: 10.1152/ajprenal.00474.2013 査読有り.

Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y, Konishi N, Saito Y. Reduced renal -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PLoS One.* 2014 Jan 23;9(1):e86301. doi: 10.1371/journal.pone.0086301.

eCollection 2014. 査読有り.

Mikami D, Kimura H, Kamiyama K, Torii K, Kasuno K, Takahashi N, Yoshida H, Iwano M. Telmisartan activates endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- and may have anti-fibrotic effects in human mesangial cells. *Hypertens Res.* 2014 May;37(5):422-31. doi: 10.1038/hr.2013.157. 査読有り.

Matsui M, Takeda Y, Uemura S, Matsumoto T, Seno A, Onoue K, Tsushima H, Morimoto K, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Samejima K, Kawata H, Kawakami R, Nakatani K, Iwano M, Saito Y. Suppressed soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014 Feb;85(2):393-403. doi: 10.1038/ki.2013.339. 査読有り.

Harada K, Akai Y, Sumida K, Yoshikawa M, Takahashi H, Yamaguchi Y, Kubo A, Iwano M, Saito Y. Significance of renal biopsy in patients with presumed diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest.* 2013;4:88-93. DOI: 10.1111/j.2040-1124.2012.00233.x 査読有り.

Hida Y, Hisada K, Shimada A, Yamashita M, Kimura H, Yoshida H, Iwasaki H, Iwano M. Rapid detection of the Mycobacterium tuberculosis complex by use of quenching probe PCR (geneCube). *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;50(11):3604-8. doi: 10.1128/JCM.01654-12. 査読有り.

[学会発表](計 2 件)

横井靖二、岩野正之、他 . 新規 TLR4 阻害

因子・分泌型 FSP1 を介したポドサイトー
メサンギウム細胞関連 .第 57 回日本腎臓
学会学術総会 平成 26 年 7 月 6 日 横浜
森本勝彦、岩野正之、他 . 結節病変を有
した糖尿病性腎症例における腎予後と臨
床および病理組織学的指標との関連性 .
第 55 回日本腎臓学会学術総会 平成 24
年 6 月 3 日 横浜

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 正之 (IWANO Masayuki)
福井大学・医学部・教授
研究者番号 : 20275324

(2) 研究分担者

糟野 健司 (KASUNO Kenji)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60455243

高橋 直生 (TAKAHASHI Naoki)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 30377460

三上 大輔 (MIKAMI Daisuke)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 90464586

(3) 連携研究者

なし