

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461634

研究課題名(和文) 微小変化型ネフローゼ症候群における標的療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for idiopathic nephrotic syndrome targeted against molecules expressed on podocytes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：微小変化型ネフローゼ症候群(本症)の病因としてポドサイト関連分子の発現異常が注目されている。エンドセリン(ET)も受容体(ET受容体：ETA)がポドサイトに発現している事が明らかになり、ETがポドサイトの異常や蛋白尿を惹起する可能性が報告されている。そこで本症モデルラットにETA拮抗薬(アンプリセンタン)を投与し、その抗蛋白尿効果を検討した。その結果アンプリセンタン投与群では蛋白尿が減少した(尿量は有意差はなかった)。また本症に特徴的なポドサイトの形態変化も認めなかった。以上よりアンプリセンタンはポドサイトへの直接作用で抗蛋白尿効果を発揮するため本症の治療薬としての可能性があると思われた。

研究成果の概要(英文)：The abnormal expression of podocyte-related molecules has been attracting attention with respect to the pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome (MCNS). Even in the case of endothelin (ET), which has a potent vasoconstrictor effect, it has become clear that the receptor is expressed in the podocytes, and the possibility of ET causing proteinuria and structural changes in podocytes has been reported. Therefore, the possibility of using ET antagonistic drug was investigated using rat models. According to the results, the proteinuria in the treatment group was lower than the significant proteinuria in the untreated group. Upon electron microscope observation, the characteristic foot process fusion of podocytes was found in the untreated group, but not in the treatment group. The results suggested that the ETA antagonists directly act on podocytes to exhibit an anti-proteinuric effect, and it was thought to have potential as a therapeutic agent for MCNS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：微小変化型ネフローゼ症候群 ポドサイト エンドセリン エンドセリン受容体拮抗薬 アンプリセンタン

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の有病率は人口10万あたり30~35人と比較的高い疾患であるが、いまだに病因は解明されていない。約80%は、微小変化型 (minimal change nephrotic syndrome: MCNS) と呼ばれる特徴的な組織型 (光学顕微鏡で明らかな異常を認めず、電子顕微鏡でのみ腎糸球体上皮細胞 [Podocyte] の足突起の融合や平坦化を呈するもの) が占める。MCNSの90%近い症例は糖質コルチコイド (ステロイド) が著効を示すが、その作用機序も明らかになっていない。

MCNSの病因について、これまでは著者らの報告を含め、患者循環血液中のTリンパ球やBリンパ球を主体とするリンパ球の機能異常が示唆されてきた (Shalhoub RJ: Lancet, 1974; Kemper MJ, et al: Clin Nephrol. 2003; Iharada A, Kaneko K, et al: Pediatr Nephrol. 2009)。しかし2004年、抗原提示細胞にのみ発現すると考えられていた共刺激因子・CD80(B7.1) がPodocyteにも発現することが報告 (Reiser J, et al: J Clin Invest. 2004) された。それ以来、MCNSの病因論にパラダイムシフトが起こった。すなわちMCNSはPodocyteの免疫学的異常活性化を伴う構造変化によるものであるという仮説 (Two-hit theory) が提唱された (Shimada M, et al: Pediatr Nephrol. 2011;26:645-9)。この仮説によれば、MCNSの発症機序は以下の様である: 腎糸球体Podocyteの足突起に存在するToll Like Receptors (TLR)に何らかの抗原 (ウイルスRNAやある種の血清蛋白) が結合する (1st hit)、TLRからの刺激によりNF- κ Bが活性化し、NF- κ Bの活性化によって、Podocyteに共刺激因子・CD80(B7.1)が過剰発現する、同時にNF- κ B経路の活性化はPodocyteのシナプトポジンの減少やアクチン骨格の構造変化をきたす、構造変化の結果として血漿蛋白が糸球体毛細血管内からボウマン嚢 (尿中) に漏出する、⑥一方、循環血中ではCD80の発現を抑制する制御性T細胞 (Treg)が機能的または量的に減少しており (2nd hit)、上記 ~ の病的状態を維持させるためにタンパク尿が持続する。

上記の仮説は主にヒト培養Podocyteを用いたin vitroの実験結果から導き出されている。そこで、本研究では、MCNSモデル動物を用いてin vivoでこの仮説を検証する。

強力な血管収縮作用を有するエンドセリン (endothelin: ET)も、その受容体 (ET typeA receptor: ETA) がポドサイトに発現していることが近年、明らかになり、ETがポドサイトの構造変化やタンパク尿を惹起する可能性が報告されている (Miguel D, et al: Curr Opin Nephrol Hypertens. 2016;25:35-41.)。そこで、ETA拮抗薬 (アンプリセンタン) のMCNS治療薬としての可能性を探求する。本研

究の特筆すべき点として、臨床応用の可能性の高さにある。すなわちアンプリセンタンはすでにわが国で肺高血圧症 (商品名: ヴォリプリス) として臨床使用認可されており、本研究で治療薬としての可能性が確認できれば、成長障害などのステロイドの副作用に悩む小児MCNS患者にとって大きな福音となる。

2. 研究の目的

MCNSの病因として、背景に記載した通り、Podocyteの機能的・構造的異常が目玉されている。すなわちウイルスRNAなどがPodocyte表面のToll様受容体を介して細胞表面に共刺激分子CD80抗原を発現させ、リンパ球を活性化するとともに、Podocyteのシナプトポジンが減少し、アクチン細胞骨格が変形した結果、バリア機能が損なわれ大量の血漿蛋白が持続的に尿中に漏出する、という考え方である。本研究の目的は、MCNSのモデル動物を用いて、Podocyteを標的とした特異療法を探求することであり、今回の研究の目的はアンプリセンタンの治療薬としての可能性について明らかにすることである。

3. 研究の方法

ラットに本症を起こす事が知られている puromycin aminonucleoside (PAN) を用いてネフローゼモデルラットを作成した。

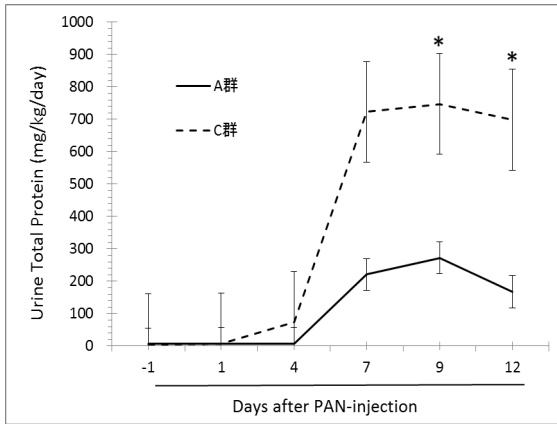
すなわちWister系ラットにPAN (50mg/kg) を単回、静脈内投与し、アンプリセンタン投与群 (A群) においては、その投与2日前から計12日間アンプリセンタン (10mg/kg) を連日経口投与した。アンプリセンタン非投与群 (C群) と、A群間で、尿中総蛋白量の経時的な変化、並びにPAN投与9日目における血中クレアチニン濃度、腎糸球体の形態的变化等の比較検討を行った。また、腎細胞におけるCD80とsynaptopodinのmRNA変化をRT-PCR法によって評価した。

またET活性に対する評価として、腎細胞におけるETのmRNA変化について、RT-PCRを用いてPAN投与9日目に評価した。

4. 研究成果

(1) 尿蛋白における検討

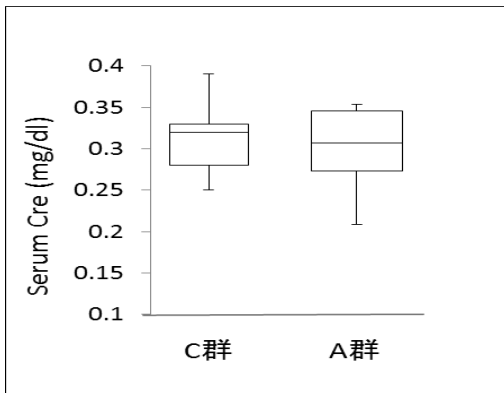
タンパク尿の評価として、尿中総蛋白 (U-TP: mg/kg/day) を用いた。下図に示すように、C群では、PAN投与9日目をピークとするU-TPの上昇が認められた (U-TP: 747.7 mg/kg/day)。一方、A投与群でもU-TPのピークはPAN投与9日目に認められたが (U-TP: 272.6 mg/kg/day)、そのピークはC群と比較し、有意に低かった (*: $p < 0.05$, C群とA群共に $n=5$)。



(2) 血清学的検討

血中クレアチニン値

下図に示すように、C 群、A 群間において、血中クレアチニン値に有意差を認めなかった。(p=0.88, C 群と A 群共に n=5)。



(3) 電子顕微鏡における腎組織の病理学的検討

本症では、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、本症のタンパク尿出現の重要な機序であることが分かっている。そこで、A 群と C 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、C 群では足突起の融合が多く認められた (図 1) が、A 群では上記像は、稀に認めるのみであった (図 2)。

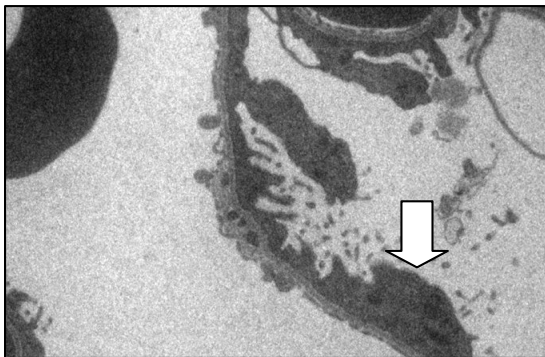


図 1 足突起の癒合を認める (矢印)

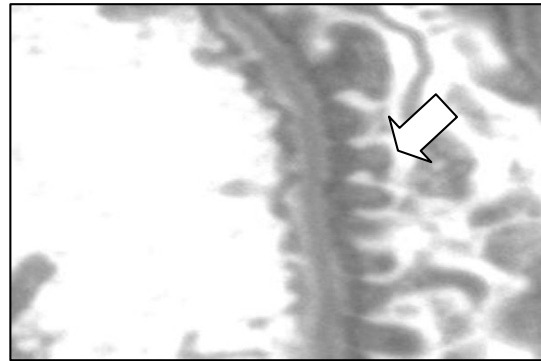
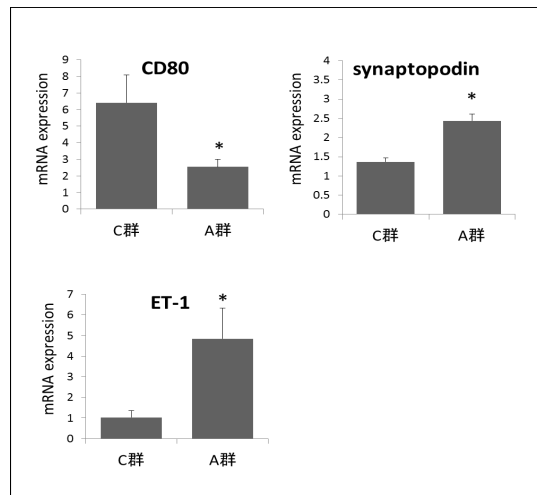


図 2 足突起の癒合を認めていない (矢印)

(4) 腎細胞における CD80 と synaptopodin、ET の mRNA 変化

A 群、C 群間で、CD80 と synaptopodin の mRNA の変化を比較した。すなわち、PAN 投与 9 日目の時点で腎臓を摘出し、RT-PCR 法を行った (下図)。CD80 の mRNA は、A 群と C 群ともに発現の増強が認められ、A 群では C 群に比較し CD80 の発現が有意に抑制された (p<0.04, n=3)。synaptopodin の mRNA は、A 群で有意に発現の増強が認められた (p<0.01, n=3)。ET 活性の評価として行った腎細胞中の ET の mRNA の変化については、A 群において発現の増強を認めたが、C 群では認めなかった (p<0.01, n=3)。



以上の結果から PAN 投与による MCNS モデルラットのタンパク尿が出現する機序は CD80 の発現が関与していることを示すことができた。また MCNS に対する新規治療薬としてアンプリセンタンが有用であることを示すことが出来た。

<引用文献>

Shalhoub RJ, Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function, *Lancet*, 2(7880), 1974, 556-60.

Kemper MJ, et al, Combined T- and B-cell activation in childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome, *Clin Nephrol*, 60, 2003, 242-7.

Iharada A, Kaneko K, et al, Increased nitric oxide production by T- and B-cells in idiopathic nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol*, 24, 2009, 1033-8.

Shimada M, et al, Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder?, *Pediatr Nephrol*, 26, 2011, 645-9.

Miguel D, et al, Endothelin-1 and the kidney: new perspectives and recent findings, *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 25, 2016, 35-41.

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0件)

投稿準備中

〔学会発表〕(計2件)

木野仁郎、北尾哲也、山内壮作、木全貴久、辻 章志、金子一成: 微小変化型ネフローゼ症候群モデルラットにおけるエンドセリン受容体拮抗薬の抗蛋白尿効果の検討. 第59回日本腎臓学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川)2016.6.18.

木野仁郎、北尾哲也、山内壮作、駿田竹紫、木全貴久、辻 章志、金子一成: 微小変化型ネフローゼ症候群モデルラットにおけるエンドセリン受容体拮抗薬の抗タンパク尿効果. 第119回日本小児科学会学術集会、ロイトン札幌(北海道)2016.5.13.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

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