

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19595

研究課題名(和文) 活性化壁側上皮細胞に着目した新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Search for novel therapeutic targets focusing on activated parietal epithelial cells

研究代表者

岡本 孝之 (Okamoto, Takayuki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70636349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：透析医療を必要とする腎不全患者は年々増加しており、慢性透析患者数は約31万人に達しています。腎臓で尿を作っている場所である糸球体がつぶれてしまうと(糸球体硬化)、腎機能が低下してしまいます。もしも糸球体が硬化することを抑えることが出来れば腎機能が低下することを緩やかにしたり防ぐことが可能となることから、糸球体が硬化する仕組みを理解することは重要です。糸球体で作られた尿を受け止めるボウマン嚢という袋を構成している細胞である壁側上皮細胞が、この糸球体硬化の際に主な役割を果たしていることが明らかとなりました。本研究はどんな状況になると壁側上皮細胞が糸球体を硬化させてしまうのかを調べるのが目的です。

研究成果の概要(英文)：Patients with end-stage renal disease who need dialysis are increasing year by year, and the number of chronic dialysis patients reaches approximately 310,000 people. If the glomeruli, that produce urine in the kidneys, collapses (glomerulosclerosis), renal function will decline. If it is possible to suppress the glomerulosclerosis, deterioration of renal function will be prevented. Therefore, it is important to understand the mechanism of glomerulosclerosis. It was clarified that parietal epithelial cells of Bowman's capsule plays a major role of glomerulosclerosis. The purpose of this research is to investigate in what situation the parietal epithelial cells will participate the formation of glomerulosclerosis.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：糸球体硬化 糸球体壁側上皮細胞 ポドサイト プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

透析医療を必要とする腎不全患者数は年々増加の一途を辿り、慢性透析患者数は約31万人に達している。慢性腎臓病(CKD; chronic kidney disease)は、2002年に米国腎臓財団(NKF; national kidney foundation)が提唱した概念であり、「腎機能低下もしくは腎臓の障害を示唆する所見が慢性的(3か月以上)に持続するもの」と定義されている(日本腎臓学会編、CKD診療ガイド2012)。

CKDは、心血管疾患や末期腎不全発症における独立したリスクファクターであることが知られており、糸球体硬化は、CKDの腎機能低下に至る“共通経路”であることから、糸球体硬化病変の機序解明および進行抑制は腎臓病学の重要な課題である。

近年、糸球体硬化病変形成には、糸球体構造を囲むポウマン嚢を形成する壁側上皮細胞(PEC; parietal epithelial cell)が主な役割を果たす事が明らかにされた(J Am Soc Nephrol 20, 2604-2615, 2009; J Am Soc Nephrol 22, 1262-1274, 2011)。硬化病変を形成するPECは、活性化PECと呼ばれ、糸球体臓側上皮細胞(ポドサイト)の傷害・喪失によって露出した血管係蹄への癒着、遊走、増殖、細胞外基質の産生などの過程を経て硬化病変を形成する。糸球体硬化病変は不可逆的变化であることから、活性化PECの誘導因子同定することは、CKD進行の病態解明・進行抑制において手がかりとなるため重要である。

これまでに我々は、PECの活性化マーカーとして知られるCD44のPECにおける発現は、ポドサイト傷害の程度と相関することを報告した(Nephron Exp Nephrol 124, 11-8, 2014)。ポドサイト傷害は、糸球体硬化病変形成の引き金であることが知られている。そのポドサイト傷害の程度と、活性化PECの出現が深く関わっていることを併せて考えると、ポドサイト傷害が活性化PECの誘導因子と深く関わっていることが示唆される。そのため、活性化PECとポドサイト傷害の出現するタイミングに着目して解析することで、活性化PECの誘導因子の同定への手がかりが得られるのではと考え解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、活性化PECの誘導因子の同定である。そのために、活性化PECとポドサイト傷害の出現するタイミングに着目して解析を行った。

3. 研究の方法

複数の巣状分節性糸球体硬化症(FSGS; focal segmental glomerulosclerosis)マウスモデルを用いて、活性化PECおよびポドサイト傷害の出現時期について経時的に評価する目的で以下の解析を行った。

(1) FSGS マウスモデルの作成

FSGSモデルとして、アドリアマイシン(ADR)腎症マウスモデル(12週齢)シクロスポリン(CsA)腎症マウスモデルを作成した。各々の腎症モデルにおいて、光顕を用いてFSGS病変が再現性をもって形成される条件を探索した。

(2) ポドサイト傷害の評価

ポドサイトのマーカーであるポドシン(podocin)、シナプトポディン(synaptopodin)、Wilms' tumor-1(WT1)の発現について免疫組織学的方法を用いて評価した。ポドサイト傷害・喪失では、これらのポドサイトマーカーの発現低下がみられる。また、電子顕微鏡下における観察では、ポドサイト傷害を示唆する形態的变化であるポドサイトの足突起癒合について解析を行った。

(3) 活性化PECの評価

PECのマーカーとしては、クラウジン-1(claudin-1)の発現について免疫組織学的方法を用いて評価した。また、PECの活性化の評価として、PEC活性化マーカーであるCD44の発現について免疫組織学的方法を用いて評価を行った。

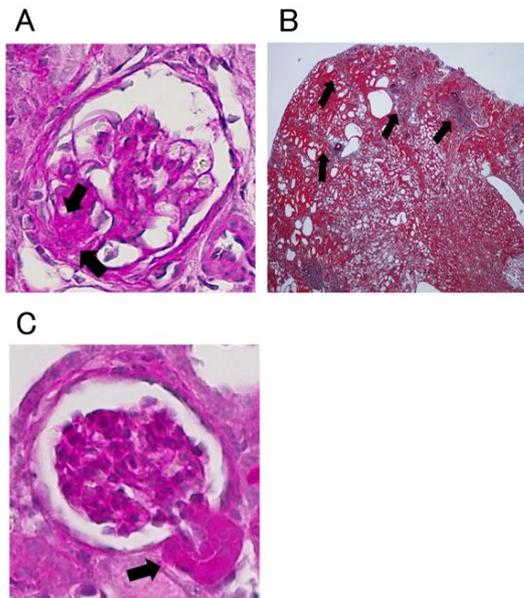
4. 研究成果

(1) ADR腎症マウスモデルでは、ADR単回投与によって、ADR投与後に有意にFSGS病変が形成される時期を同定することができ、再現性を確認することができた。

一方、CsA腎症モデルは、腎病理組織学的特徴として、尿細管間質病変、血管病変のほか、糸球体病変としてFSGSが挙げられる。ADR腎症モデルに比してFSGS病変形成までには長期間のCsA投与を要することが予測されるという欠点はあったが、緩徐にFSGS病変が形成されることから、活性化PECの出現時期とポドサイト傷害との時間的関係性を更に同定するためには有用と考え作成を試みた。

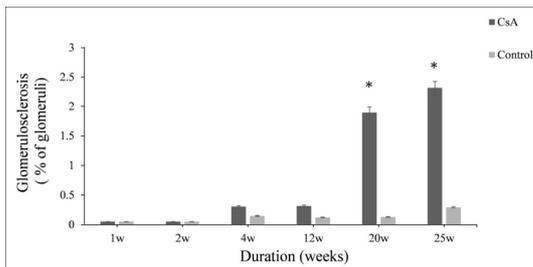
しかし結果としては予想以上にCsA腎症マウスモデルの作成に難渋した。最終的には、CsA投与量の調整を行い、長期間の投与を継続することで、FSGS病変が形成されることについて再現性を含めて確認することが出来た。また、前述したCsA腎症のFSGS以外の光顕所見である尿細管間質病変、血管病変に関してもCsA腎症として矛盾しない病変が形成されることを確認した。

図: CsA腎症モデルマウスの(A)硬化病変、(B)尿細管間質の縞状線維化、(C)血管(細胞動脈)の硝子様変性



また、硬化病変の形成は、ADR 腎症マウスモデルでは、ADR 投与 28 日後から増加し、CsA 腎症マウスモデルでは、CsA 投与 20 週から増加していた。

図：CsA 腎症モデルマウスの糸球体硬化(%)



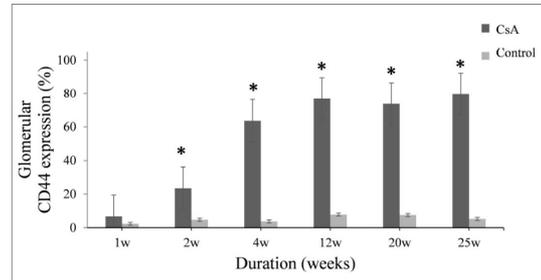
(2) ADR 腎症マウスモデル、CsA 腎症マウスモデルにおいて、ポドサイトマーカーである、podocin、synaptopodin、WT-1 の発現、および電子顕微鏡によるポドサイトの足突起癒合について経時的に評価した。

ADR 腎症マウスモデルでは、ポドサイトの足突起癒合の増加が ADR 投与 7 日後から認められ、ポドサイトマーカー発現の低下が ADR 投与 10 日後から認められた。また、CsA 腎症マウスモデルでは、ポドサイトの足突起癒合の増加が CsA 投与ポドサイトマーカー発現の低下が CsA 投与 1 週後から認められ、CsA 投与 20 週後から認められた。

(3) 活性化 PEC の出現時期を ADR 腎症マウスモデル、CsA 腎症マウスモデルを用いて解析した。

PEC 活性化マーカーである CD44 の発現の増加は、ADR 腎症マウスモデルでは、ADR 投与 10 日後から認められた。また、CsA 腎症マウスモデルでは、CsA 投与 2 週間後から認められた。

図：CsA 腎症モデルマウスの CD44 発現



(4) 以上の結果より、ADR 腎症マウスモデル、CsA 腎症マウスモデルともに、活性化 PEC は硬化病変出現、ポドサイトマーカー発現の低下よりも先行して出現していること、ポドサイトの足突起癒合の増加は活性化 PEC 出現よりもさらに先行していることが示された。

(5) ポドサイトの足突起癒合の増加と、活性化 PEC の出現までの間の尿検体を用いたプロテオーム解析を行い、活性化 PEC 誘導因子の網羅的解析を行った。しかしながら、この段階までの工程に時間を要したため、活性化 PEC 誘導因子の同定には至らなかった。今後は、さらなる活性化 PEC 誘導因子同定を目指した解析を進める。

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 5 件)

Takahashi T, Sato Y, Yamazaki T, Hayashi A, Okamoto T. Nephronophthisis with brown tumor: Old and new problems. *Pediatr Int*. 2017;59(9):1024-1025. 査読有. DOI: 10.1111/ped.13341

Takahashi T, Sato Y, Yamazaki T, Hayashi A, Okamoto T. Vomiting in an infant with congenital nephrotic syndrome: Questions. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(9):1519-1520. 査読有. DOI: 10.1007/s00467-016-3529-8

Takahashi T, Sato Y, Yamazaki T, Hayashi A, Okamoto T. Vomiting in an infant with congenital nephrotic syndrome: Answers. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(9):1521-1523. 査読有. DOI: 10.1007/s00467-016-3532-0

Okamoto T, Sato Y, Yamazaki T, Hayashi A, Takahashi T. Growth hormone therapy for a patient with idiopathic Fanconi syndrome and growth hormone deficiency. *CEN Case Rep*. 2017;6(1):85-87. 査読有. DOI: 10.1007/s13730-017-0249-2

Yamazaki T, Sasaki S, Okamoto T, Sato Y, Hayashi A, Ariga T. Up-regulation of CD74 expression in parital epithelial cells in a mouse model of focal segmental glomerulosclerosis. Nephron. 2016;134(4):238-252. 査読有. DOI: 10.1159/000448221

[学会発表](計2件)

Hayashi A, Okamoto T, Sato Y, Yamazaki T, Takahashi T, Takahashi T, Ariga T. Activated parietal epithelial cells in CsA-induced nephropathy and its association with the podocyte injury. "17th Congress of the International Pediatric Nephrology Association", Sep20-24, 2016, Rafain Palace Hotel and Convention Center (Iguacu, Brazil).

Okamoto T, Sato Y, Yamazaki T, Hayashi A, Takahashi T. A case of idiopathic Fanconi syndrome with growth hormone deficiency. "17th Congress of the International Pediatric Nephrology Association", Sep20-24, 2016, Rafain Palace Hotel and Convention Center (Iguacu, Brazil).

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 孝之 (OKAMOTO, Takayuki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 70636349

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし