

令和元年6月13日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06658

研究課題名(和文)末梢血FACS解析とヒト化マウスによる特発性ネフローゼ症候群液性因子の解明

研究課題名(英文) Investigation of plasma pathogenic factor in Idiopathic nephrotic syndrome using humanized-mouse and flow cytometry analysis of plasma blood cells

研究代表者

宇田川 智宏 (Udagawa, Tomohiro)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：30623392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は特発性ネフローゼ症候群は、高度蛋白尿と低蛋白血症を主体とする3-6歳の小児に好発する原因不明の疾患で、この病因因子を同定し、病態モデルとなる実験系の確立を目的とした。

特発性ネフローゼ症候群患者の血球を用いたFACS解析では、特定の血球細胞の同定には不十分であり、今後検体数の蓄積が必要であった。当初の予定通り培養ポドサイトの細胞骨格蛋白を評価する系を確立し、細胞障害性の薬剤投与では対象群に比べ変化を認めた。またマウス胎児腎の前腎細胞から確立した腎臓オルガノイドを用いてポドサイト障害を検証する実験系を確立した。本研究は特発性ネフローゼ症候群の病因解明への道標になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性ネフローゼ症候群は原因が未解明な疾患である。ステロイド治療で生じる易感染症、低身長など特徴的副作用を回避するため、病因を解明し新たな治療戦略を確立することが、医学的に重要である。本研究では、特発性ネフローゼ症候群患者の末梢血における血球分画をフローサイトメトリー解析により患者特有の血球分布の傾向を見出した。また機能解析に有用な培養系球体上皮細胞や腎臓オルガノイドを用いた実験系を確立した。今後患者検体の蓄積と機能解析を進めることで、当初の目的をさらに明らかにすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this present study, to elucidate both a therapeutic target and a permeability factor of the idiopathic nephrotic syndrome in children, we analyzed comprehensive distributions of peripheral blood cells in patient with that disease. It is necessary to analyze a more large samples to get a meaningful result. We confirmed the alteration of cytoskeletal proteins induced by cytotoxic agent using immortalized podocyte cell line and mouse kidney organoid derived from nephron progenitor cells. This study was thought to become a step of elucidation of pathogenic permeability factor of the idiopathic nephrotic syndrome in children.

研究分野：Pediatric Nephrology

キーワード：Nephrotic syndrome Podocyte フローサイトメトリー ポドサイト 液性因子

1. 研究開始当初の背景

特発性ネフローゼ症候群は、高度蛋白尿を呈し放置すると急性腎障害や末期腎不全となる原因不明の疾患で、その病原因子を解明することは根本的治療を開発するため非常に重要な課題である。40年以上前から特発性ネフローゼ症候群の原因因子としてTリンパ球系細胞が関与する液性因子が存在し、腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の足突起癒合を引き起こすと推察されているが、その詳細は現在まで不明である。近年、CD20（Bリンパ球）抗体分子標的薬が難治性ネフローゼ症候群の再発抑制に有効であることが報告された。また患者のCD34+細胞を含む末梢血移植でNOGマウスが蛋白尿を呈するとの報告があり、特発性ネフローゼ症候群の発症に免疫系の関与が強く考えられる。

ネフローゼ症候群は高度な糸球体性蛋白尿と低蛋白血症を呈する疾患で、ポドサイトの足突起が癒合する形態学的な変化を特徴とする。ステロイド治療により多くは寛解するが、再発を繰り返しステロイドの長期投与が白内障、骨粗鬆症、成長障害などの不可逆的な副作用を引き起こす点も問題となっている。積極的な治療によっても一部は末期腎不全に至り腎代替療法を必要とし、腎移植後に原疾患が再発する症例もある（Mekahli D, et al. *Pediatric Nephrology*. 2009）。根本的治療のため特発性ネフローゼ症候群の病原因子の解明は、小児腎疾患診療における非常に重要な課題の一つである。

これまでのいくつかの報告から、特発性ネフローゼ症候群の発症メカニズムにはTリンパ球のみならずBリンパ球を含む免疫系の関与が示唆されている。特発性ネフローゼ症候群患者の末梢血球プロファイルを解析し、加えて未知なる液性因子とそれを産生する細胞を同定し、腎臓における液性因子のターゲットを解明し、新たな治療を開発することが必要とかがえられた。本研究は、免疫学的な視点を加えた特発性ネフローゼ症候群患者の詳細な血球分析と、液性因子産生細胞や液性因子のターゲット、そして液性因子を解明し、新たな治療開発を目指すものである。

本研究の成果は特発性ネフローゼ症候群特有のFACSパターン構築は初発時の病型分類や治療効果予測を可能にする。また液性因子の解明により新たな治療開発に加え、疾患発症のきっかけ-感染や遺伝、環境が考えられる-に関する研究につながる可能性を考え、以下の研究を計画し、実施した。

2. 研究の目的

本研究は、特発性ネフローゼ症候群患者の末梢血の表面抗原パターンを解析し、疾患発症に強くかかわる血球細胞分画を同定する。さらに注目した血球細胞がIn vivoのマウスモデルにおいて蛋白尿の発現に関わるか、ポドサイト障害をもたらす液性因子産生を行うかスクリーニングする系を確立する。液性因子の産生細胞、液性因子、ポドサイト上の液性因子のターゲット分子を解明し新たな根本的治療法の開発への橋渡しを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 特発性ネフローゼ症候群患者血球での詳細な表面抗原分析：特発性ネフローゼ症候群患者末梢血を用いたリンパ球、単球、樹状細胞の10カラーを用いた詳細な表面抗原分析により、疾患特異的な発現パターンを構築する。

2) 特発性ネフローゼ症候群原因液性因子の探索

①NOGマウスを用いた液性因子のスクリーニング：再発性特発性ネフローゼ症候群患者から採取したCD34+細胞を含む末梢血を移植したNOGマウスにおいて、ネフローゼ症候群様症状を観察する。

②培養ポドサイト変化を指標とした液性因子産生細胞のスクリーニング：Boyden Chamber法でのポドサイトの細胞骨格変化を指標とした液性因子産生細胞のスクリーニング構築系を作製し、患者末梢血球で評価する。

③質量分析による液性因子産生細胞と液性因子の同定：②の結果を基にポドサイト細胞骨格の変化がある培養上清を用いて質量分析を行い、液性因子あるいはその候補を同定する。

4. 研究成果

(1) 特発性ネフローゼ症候群患者血球での詳細な表面抗原分析

数人の小児特発性ネフローゼ症候群患者から同意を得て、血球を採取した。T、あるいはBリンパ球、ナイーブT/B細胞、メモリーT/B細胞や樹状細胞(DC)、単球の発現状況を解析した。表面抗原CD45RO発現の有無からみたT細胞のpopulationが患者特異的な変化が生じている可能性がある。しかしながら、発現研究開始後1年度、研究代表者が異動になってしまったこともあり、倫理委員会の承認など、新たな患者獲得など検体収集の準備期間が必要となってしまったこともあり、研究の進展が当初の予定通り進まなかった。患者特徴的プロファイルの同定には、さらなる検体数の集積が必要である。

(2) 特発性ネフローゼ症候群原因液性因子の探索

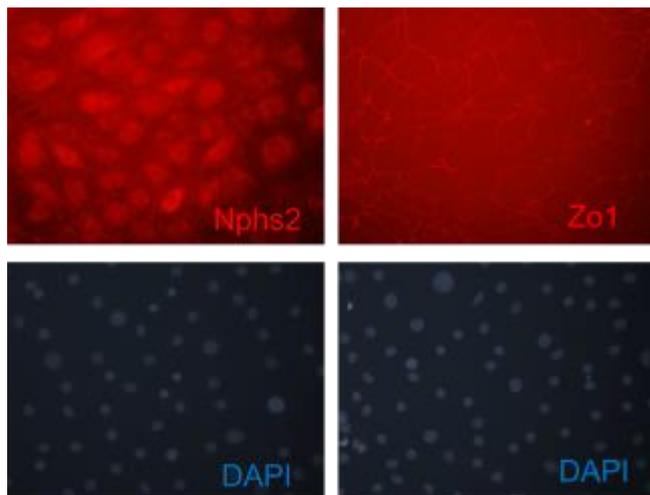
①NOGマウスを用いた液性因子のスクリーニング

NOG マウスは CD34 陽性細胞移植による免疫系をヒトと同様に再構成したマウスである。計画段階において、NOG マウスを提供している会社との打合わせは行い、患者検体必要量等の調べはついていたが、動物実験センターにおけるヒト検体使用に際して、HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HBV, HCV, Mycoplasma が条件とされ、すべての患者検体について、上記項目の検査を行うことが予算内では、採取量も検査費用も膨大となり、実験計画の見直しが必要となった。

②培養ポドサイト変化を指標とした液性因子産生細胞のスクリーニング

購入した不死化培養ポドサイトは温度感受性があり、培養条件が 5%CO₂ 下、33°Cで増殖、37°Cで分化する。培養皿のサイズによるが 70%Confluent な状態まで増殖させたのち、10-14 日間分化させたところ、ポドサイト特異的な Nphs2 (以下図 1) の発現や、細胞間接着因子の Zo1 発現を認めた。またこの培養細胞を分化後、細胞障害性物質 (LPS) を投与した群では、非投与群に比べ、F-actin の構造変化や、Nphs2 の発現が低下した。同様の現象が患者血清を投与した場合にもみられる傾向はあり、今後検体数増などにより確証を得る必要があると考えている。

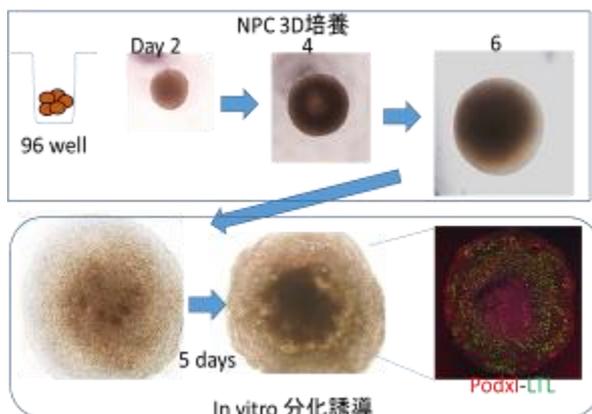
<図 1>



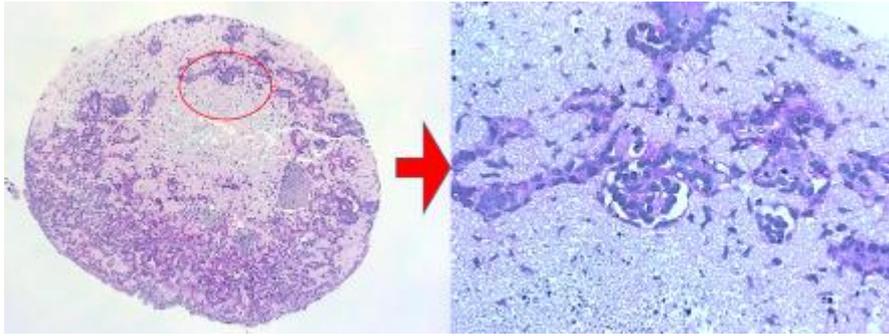
③マウス腎オルガノイドによる液性因子がポドサイト細胞に及ぼす影響の検討

当初の予定通り、動物実験計画が進まないことが判明したことから、マウスの前腎細胞由来の腎オルガノイドを構築し、患者検体のスクリーニングモデル系が構築できないか実験計画を変更した。Araoka らの報告 (Li Z, Araoka T et al. *Cell Stem Cell*. 2016. 516-529) を参考に胎児マウスから前腎細胞を取り出し、Laminine コーティングされた Dish 上に撒くと、前腎細胞のみが凝集し浮遊する。この細胞のみを集め、96well の丸底皿で培養すると、増殖する。1mm 大まで成長したのち、Transwell 上に移し、増殖因子を除いて培養すると図 2、3 のように、糸球体構造 (Podocalyxin : Podxl) と尿管構造 (LTL : Lotus Tetragonolobus lectin) を形成することを確認した。さらに腎オルガノイドにポドサイト障害物質を投与すると、ポドサイト特異的な蛋白発現の消失を認めた (図 3)。

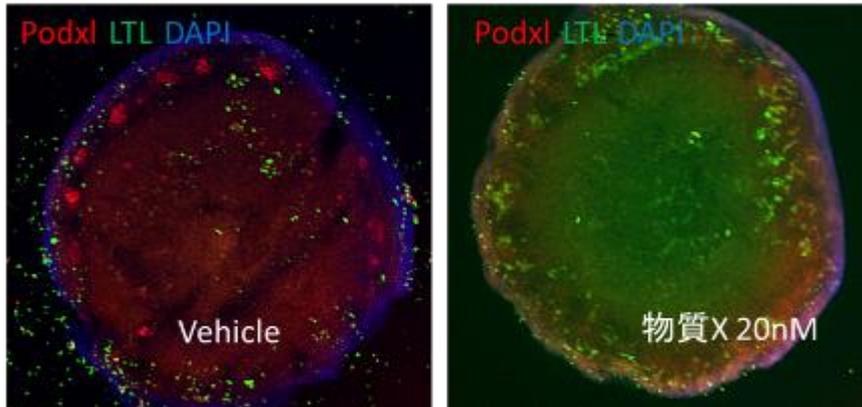
<図 2>



<図 3>



<図 4>



研究結果のまとめ

特発性ネフローゼ症候群患者の血球を用いた FACS 解析では、特定の血球細胞の存在同定には検体数が不十分であり、今後検体数の蓄積が必要であった。NOG マウスへの患者血清投与によるスクリーニングは実験計画の見直しが必要となり十分な進展はさせることが困難となった。上記が予定通り進まない場合に関しては、当初の予定通り培養ポドサイトの細胞骨格蛋白を評価する系を確立し、細胞障害性の薬剤投与では対象群に比べ変化を認めた。またマウス胎児腎の前腎細胞から確立した腎臓オルガノイドを用いてポドサイト障害を検証する実験系を確立した。本研究は特発性ネフローゼ症候群の病因解明への道標になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Nozu K, Nakanishi K, Abe Y, Udagawa T, Okada S, Okamoto T, Kaito H, Kanemoto K, Kobayashi A, Tanaka E, Tanaka K, Hama T, Fujimaru R, Miwa S, Yamamura T, Yamamura N, Horinouchi T, Minamikawa S, Nagata M, Iijima K. A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. *Clinical and experimental nephrology*. Aug, 2018. 査読あり
2. Udagawa T, Harita Y, Miura K, Mitsui J, Ode KL, Morishita S, Urae S, Kanda S, Kajiho Y, Tsurumi H, Ueda HR, Tsuji S, Saito A, Oka A. Amnionless-mediated glycosylation is crucial for cell surface targeting of cubilin in renal and intestinal cells. *Scientific reports* 8(1) 2351. Feb, 2018 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Udagawa T, Miura K, Urae S, Kanda S, Saito A, Harita Y. Intracellular trafficking of cubilin is crucial for renal and intestinal endocytosis. ISN frontier meeting. Feb, 23. 2018. Tokyo. Japan

〔図書〕(計 1 件)

1. 伊藤秀一 編・著, 宇田川智宏 分担執筆 (第 7 章) 新 子どもの腎炎・ネフローゼ症候群. 東京医学社. 2018 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

特になし

○取得状況（計 0 件）

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。