

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09697

研究課題名(和文)ポドサイトに発現するナトリウム利尿ペプチドの下流創薬標的の慢性腎臓病における意義

研究課題名(英文) Role of downstream molecules of natriuretic peptides on podocytes in chronic kidney disease

研究代表者

横井 秀基 (YOKOI, HIDEKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90378779

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)：糸球体でナトリウム利尿ペプチド受容体欠損時に増加するMatrix metalloproteinase-10 (MMP-10)に着目した。MMP-10はヒト腎生検標本の糸球体内の増殖性病変で増加した。ALDO負荷(アルドステロン投与、片腎摘、高食塩)した全身性GC-A KOとMMP-10 KOマウスのダブルKOマウスは糸球体障害、アルブミン尿、ポドサイトの足突起消失が軽快していた。この変化は、ポドサイト特異的GC-A KOマウスとMMP-10 KOマウスのダブルKOマウスでも認められた。MMP-10抑制は腎障害を軽減する標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎障害の程度とMMP-10発現が相関しうるデータは腎疾患においてMMP-10がマーカーとなりうる可能性を示唆している。今後血中や尿中MMP-10が疾患活動性マーカーになりうるか検討が必要である。また、MMP-10抑制が腎疾患を軽減させる可能性は今後の創薬標的となりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：I focused on matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) which is increased in glomeruli by deletion of natriuretic peptide receptor. MMP-10 was increased at the proliferative lesions in the renal biopsy specimen. ALDO, which means aldosterone infusion, nephrectomy and high salt diet, stimulated systemic GC-A and MMP-10 double knockout (KO) mice exhibited less glomerular injury and albuminuria. In addition, podocyte-specific GC-A KO and MMP-10 KO double KO mice also showed similar results.

In conclusion, inhibition of MMP-10 could be a potential target against renal injury.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ポドサイト ナトリウム利尿ペプチド アルドステロン 抗糸球体基底膜腎炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは独立した腎障害促進因子として注目を集めており、アルドステロン/ミネラルコルチコイド系の抑制は蛋白尿抑制効果を持つ(Navaneethan et al. Clin J Am Soc Nephrol 4:542, 2009)が、腎不全患者においては高カリウム血症を惹起する副作用を伴い、エプレレノンを始めとする抗ミネラルコルチコイド薬の使用には制限がある。研究代表者らはこれまで腎不全、腎炎および糖尿病性腎症モデルを用い、ナトリウム利尿ペプチド/ guanylyl cyclase receptor-A (GC-A) 受容体シグナルが腎保護的に作用することを報告してきた。ナトリウム利尿ペプチドは、腎臓において集合管のみならずポドサイトにも発現している。ナトリウム利尿ペプチドが angiotensin II に対して拮抗作用を持つことはよく検討されているが、アルドステロンの下流の経路に対して抑制的に作用するかについては検討が十分なされていない。そこで、アルドステロンによる腎障害におけるナトリウム利尿ペプチドの意義の検討をおこなうために、全身性 GC-A 欠損マウスに片腎摘を行い、6% 高食塩食負荷とアルドステロンを投与(以下 ALDO 負荷)し、腎障害の程度を検討したところ、高度アルブミン尿および糸球体障害を呈した(図1: Ogawa, Yokoi *et al.* J Am Soc Nephrol 23:1198, 2012)。このマウスはメサンギウム基質の増加・巣状分節性糸球体硬化と、ネフリン・ポドシン発現の低下、糸球体基底膜厚の肥厚などが認められ、高度の蛋白尿を伴う腎障害を呈することを示した。このモデルではポドサイト傷害が増強しており、申請者は GC-A シグナルがポドサイトにおいてアルドステロンを含む腎障害に対して拮抗的に作用している機序が存在することが示唆されるが、その詳細な機序は不明であった。

研究代表者らはポドサイトにおける GC-A の意義を検討するために、ポドサイト特異的 GC-A cKO マウス (pod GC-A cKO) を作製し、同様に ALDO 負荷を行うと尿中アルブミン排泄が 13 倍に増加し、メサンギウム基質の増加、ポドサイト障害が認められた(図2: Kato, Yokoi, et al. Sci Rep 7:46624, 2017)。全身性の GC-A KO マウスならびにポドサイト特異的 GC-A cKO マウスの解析からポドサイトにおける p38MAPK の亢進が病態進展に重要である可能性を見出し、p38MAPK 阻害薬 FR167653 を用い、これら動物モデルへの投与ならびに培養ポドサイトに阻害薬を添加し機能的意義を検討している。

しかしながら、興味深いことに ALDO 負荷野生型マウスと ALDO 負荷全身性 GC-A KO マウスの糸球体 mRNA 発現を比較しても、*Tgfb1* や *Cybb* といった線維化や酸化ストレスに関する mRNA 発現は変化を認めなかった。そのため、ALDO 負荷野生型マウスと ALDO 負荷全身性 GC-A KO マウスの糸球体内遺伝子発現の変化を網羅的に解析し matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) を含む複数の因子が大きく変化することを見出した。

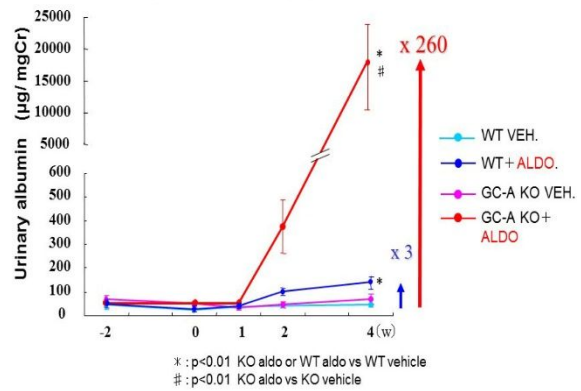


図1 尿中アルブミン排泄量の経過。GC-AKO マウスに ALDO 負荷を行うと WT VEH 負荷と比べ約 260 倍のアルブミン尿が認められる。WT、野生型; ALDO、片腎摘 + 6%高食塩 + アルドステロン負荷; VEH、片腎摘 + 6%高食塩 + vehicle 負荷 (Ogawa, JASN 2012)。

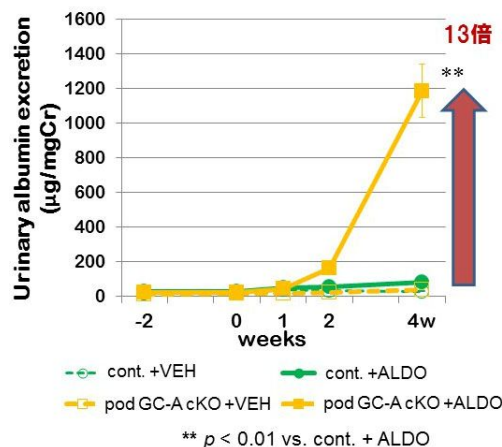


図2:ポドサイト特異的 GC-A cKO マウスのアルブミン尿。ALDO 負荷により尿中アルブミン排泄が VEH 負荷コントロールマウスに比して 13 倍増加している (Kato et al. Sci Rep 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MMP-10 の腎障害時における発現・機能を解析し新規慢性腎臓病治療薬標的の可能性について探索する。具体的には、MMP-10 ノックアウトマウスと全身性 GC-A KO マウスもしくはポドサイト特異的 GC-A KO マウスとのダブルノックアウトマウスを作製し、前述の ALDO 負荷を行い、尿蛋白、糸球体の組織学的変化、ポドサイト障害を検討する。さらに GC-A KO マウス以外での腎障害における MMP-10 の意義を検討するため、抗糸球体基底膜 (GBM) 腎炎を MMP-10 KO マウスに惹起し、表現型の変化を検討する。ヒト腎生検サンプルを用いて、MMP-10 発現を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎生検サンプルにおける MMP-10 発現の解析

ヒト腎疾患における MMP-10 の発現変化を検討するために、ヒト腎生検標本の MMP-10 免疫染色を行った。Minor glomerular abnormality、IgA 腎症、糖尿病性腎症、ANCA 関連血管炎、ループス腎炎における腎の MMP-10 発現を検討した。

(2) ALDO 負荷全身性もしくはポドサイト特異的 GC-A KO/MMP-10 KO マウスのダブルノックアウトマウスの機能的解析

ALDO 負荷 GC-A KO マウスで著明に増加する糸球体 MMP-10 の意義を検討するために、全身性 GC-A KO マウスと MMP-10 KO マウスを掛け合わせ、ダブルノックアウトマウスを作製する。オスマウス片腎摘を施行し、2週間後にアルドステロン溶解液を含んだ浸透圧ミニポンプを皮下に埋め込み、6%高食塩食も追加した。コントロール群、MMP-10 KO 群、GC-A KO 群、MMP10;GC-A ダブル KO 群を作製し、各群にアルドステロンを投与した。アルドステロン投与4週後の尿アルブミンの変化、血圧、糸球体を含む組織変化、ポドサイトの形態やネフリン、ポドシン発現変化、糸球体内の細胞外基質産生や炎症に関連する遺伝子発現を解析し、MMP-10 の機能的意義を検討した。また、ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A conditional KO (cKO) マウスと MMP-10 のダブルノックアウトマウスを作製し、ポドサイトにおける GC-A と全身の MMP-10 の意義を明らかにした。

(3) 抗糸球体基底膜腎炎における MMP-10 の役割

一般的な腎炎モデルとして MMP-10 ノックアウトマウスに抗 GBM 腎炎を惹起し、尿蛋白、糸球体の組織学変化、ポドサイトの変化、糸球体の mRNA 発現を day14 まで解析し、MMP-10 抑制の意義について検討を行った。

(4) 培養細胞における MMP-10 の意義

MMP-10 のポドサイトにおける意義を検討するために、培養ヒトポドサイト (Saleem et al. J Am Soc Nephrol 2002) に TGF- β や TNF- α を添加し、MMP-10 の発現を解析し、MMP-10 siRNA で MMP-10 を抑制することで増殖因子、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質や炎症に関連する蛋白の発現変化を real-time RT-PCR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト腎生検サンプルにおける MMP-10 発現の解析

パラフィン包埋腎生検標本を用いて少数例の MMP-10 免疫染色を行った。Minor glomerular abnormalities 群は糸球体の染色は弱く、あまり発現を認めなかった。IgA 腎症においては細胞増殖が強い部分に一致して MMP-10 発現増加を認めた。ループス腎炎と ANCA 関連血管炎については、細胞性半月体を認める症例では半月体部分に一致して MMP-10 発現増加を認めた。

(2) ALDO 負荷全身性もしくはポドサイト特異的 GC-A KO/MMP-10 KO マウスのダブルノックアウトマウスの機能的解析

ALDO 負荷を全身性 GC-A KO マウスと MMP-10 KO マウスのダブルノックアウトマウスに行い、解析を行った。収縮期血圧はコントロール群と MMP-10 群で 120 mmHg 程度であり、GC-A KO 群とダブル KO 群では 160 mmHg 程度であり両群に差を認めなかった。尿中アルブミン排泄は GC-A KO 群は 25,000 μ g/mgCr 程度と高度であり、ダブル KO 群では 80%の減少が認められた。組織学的変化として、GC-A KO 群では全節性硬化やメサンギウム拡大が認められるが、ダブル KO 群ではこれらの変化が減少していた。WT1 染色でポドサイト数を検討すると GC-A KO 群で低下がみられるが、ダブル KO 群では WT1 陽性細胞数が維持されていた。電子顕微鏡検査では、ダブル KO 群では footprocess が良く維持されていた。これらの結果から MMP-10 欠損は腎障害軽減を示すことが明らかとなった。

次に ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A cKO マウスと MMP-10 KO マウスのダブルノックアウトマウスの解析を行った。血圧は 4 群で差を認めなかったが、尿中アルブミン排泄はポドサイト特異的 GC-A cKO マウスでは 1,600 μ g/mgCr 程度であったものが、ダブル KO マウスでは 700 μ g/mgCr 程度と有意な低下を認めた。また、組織学的にもダブル KO ではメサンギウム拡大と footprocess effacement が改善していた。

(3) 抗糸球体基底膜腎炎における MMP-10 の役割

野生型マウスに抗糸球体基底膜腎炎を惹起したところ高度の蛋白尿と糸球体硬化・半月体形成を認めた。一方、抗糸球体基底膜腎炎を惹起した MMP-10 ノックアウトマウスでは、尿蛋白は半分程度に減少し、半月体形成率も半分程度に減少した。

(4) 培養細胞における MMP-10 の意義

培養ヒトポドサイトに TNF- α や TGF- β を加えると、MMP-10 発現が上昇した。培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に GC-A siRNA を導入し GC-A をノックダウンすると MMP-10 発現が上昇した。また HUVEC に TGF- β 刺激を行うと MMP-10 発現が増加した。

さらに、MMP-10 の蛋白分解作用に着目し、リコンビナント nephrin と活性型 MMP-10 を in vitro で 37 度 16 時間反応させると、nephrin 蛋白の分解が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Toda Naohiro, Mukoyama Masashi, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 38
2. 論文標題 CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-018-0070-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura Hiroaki, Nakano Daisuke, Sawanobori Yoshiharu, Asaga Takehiko, Yokoi Hideki, Yanagita Motoko, Mukoyama Masashi, Tokudome Takeshi, Kangawa Kenji, Shirakami Gotaro, Nishiyama Akira	4. 巻 129
2. 論文標題 Guanylyl Cyclase A in Both Renal Proximal Tubular and Vascular Endothelial Cells Protects the Kidney against Acute Injury in Rodent Experimental Endotoxemia Models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 296 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000002214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toda Naohiro, Mori Kiyoshi, Kasahara Masato, Koga Kenichi, Ishii Akira, Mori Keita P, Osaki Keisuke, Mukoyama Masashi, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 33
2. 論文標題 Deletion of connective tissue growth factor ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 943 ~ 953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfx317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hishikawa Akihito, Hayashi Kaori, Abe Takaya, Kaneko Mari, Yokoi Hideki, Azegami Tatsuhiko, Nakamura Mari, Yoshimoto Norifumi, Kanda Takeshi, Sakamaki Yusuke, Itoh Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Decreased KAT5 Expression Impairs DNA Repair and Induces Altered DNA Methylation in Kidney Podocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1318 ~ 1332.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Akira, Katsuura Goro, Imamaki Hirotaka, Kimura Hiroyuki, Mori Keita P., Kuwabara Takashige, Kasahara Masato, Yokoi Hideki, Ohinata Kousaku, Kawanishi Tomoko, Tsuchida Junichi, Nakamoto Yuji, Nakao Kazuwa, Yanagita Motoko, Mukoyama Masashi, Mori Kiyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Obesity-promoting and anti-thermogenic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15825-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yukiko, Mori Kiyoshi, Kasahara Masato, Osaki Keisuke, Ishii Akira, Mori Keita P., Toda Naohiro, Ohno Shoko, Kuwabara Takashige, Tokudome Takeshi, Kishimoto Ichiro, Saleem Moin A., Matsusaka Taiji, Nakao Kazuwa, Mukoyama Masashi, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toda Naohiro, Mori Kiyoshi, Kasahara Masato, Ishii Akira, Koga Kenichi, Ohno Shoko, Mori Keita P., Kato Yukiko, Osaki Keisuke, Kuwabara Takashige, Kojima Katsutoshi, Taura Daisuke, Sone Masakatsu, Matsusaka Taiji, Nakao Kazuwa, Mukoyama Masashi, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 Crucial Role of Mesangial Cell-derived Connective Tissue Growth Factor in a Mouse Model of Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 42114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep42114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinashi Hiroshi, Toda Naohiro, Sun Ting, Nguyen Tri Q., Suzuki Yasuhiro, Katsuno Takayuki, Yokoi Hideki, Aten Jan, Mizuno Masashi, Maruyama Shoichi, Yanagita Motoko, Goldschmeding Roel, Ito Yasuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Connective tissue growth factor is correlated with peritoneal lymphangiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48699-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fuseya Sayaka, Suzuki Riku, Okada Risa, Hagiwara Kozue, Sato Takashi, Narimatsu Hisashi, Yokoi Hideki, Kasahara Masato, Usui Toshiaki, Morito Naoki, Yamagata Kunihiro, Kudo Takashi, Takahashi Satoru	4. 巻 523
2. 論文標題 Mice lacking core 1-derived O-glycan in podocytes develop transient proteinuria, resulting in focal segmental glomerulosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata Yusuke, Kuwabara Takashige, Mori Kiyoshi, Kan Youngna, Sato Yuki, Umemoto Shuro, Fujimoto Daisuke, Kanki Tomoko, Nishiguchi Yoshihiko, Yokoi Hideki, Kakizoe Yutaka, Izumi Yuichiro, Yanagita Motoko, Mukoyama Masashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Ablation of Myeloid Cell MRP8 Ameliorates Nephrotoxic Serum-induced Glomerulonephritis by Affecting Macrophage Characterization through Intraglomerular Crosstalk	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59970-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 横井秀基、大崎啓介、加藤有希子、向山政志、柳田素子
2. 発表標題 アルドステロン誘発高血圧腎障害モデルにおけるナトリウム利尿ペプチド系の拮抗作用機序
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 横井秀基、大崎啓介、加藤有希子、向山政志、柳田素子
2. 発表標題 RAA系抑制因子としてのナトリウム利尿ペプチド系の意義とアルドステロン誘発ポドサイト傷害におけるクロストーク
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 大崎啓介、加藤有希子、戸田尚宏、石井輝 森 潔、松阪泰二、向山政志、柳田素子、横井秀基
2. 発表標題 MMP-10欠損によるアルドステロン投与GC-A ノックアウトマウスの腎病変の改善
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Osaki K, Kato Y, Toda N, Ishi A, Mori K P, Ohno S, Mori K, Kasahara M, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H
2. 発表標題 Deletion of matrix metalloproteinase-10 ameliorates aldosterone-induced glomerular injury in guanylyl cyclase-A knockout mice
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Osaki K, Kato Y, Toda N, Ishii A, Keita P. Mori K P, Ohno S, Mori K, Moin A. Saleem, Matsusaka T, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H.
2. 発表標題 Upregulation of Matrix Metalloproteinase-10 in Glomerular Cells and Macrophages by Inflammation
3. 学会等名 American Society of Nephrology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yokoi H, Osaki K, Kato Y, Toda N, Ishi A, Mori K P, Kosaki K, Kasahara M, Mukoyama M, Yanagita M.
2. 発表標題 Matrix metalloproteinase-10 is a key molecule in aldosterone-induced glomerular injury in systemic guanylyl cyclase-A knockout mice
3. 学会等名 World Congress of Nephrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科 腎臓内科学
<https://www.kidney-kyoto-u.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----