

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09709

研究課題名（和文）糖脂質GM3のネフリン・リン酸化制御機構を利用した巣状糸球体硬化症の治療法の確立

研究課題名（英文）new therapeutic of podocytopathy using cell membrane stabilization on podocytes via glycosphingolipid GM3

研究代表者

川島 永子（Kawashima, Nagako）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90342774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、i) 足細胞障害初期はGM3の減少を伴う、ii) バルプロ酸を介したGM3の発現増強は、蛋白尿、糸球体硬化病変の出現に予防的・治療的效果をもつ、iii) F-アクチン線維束崩壊の阻止、ネフリン・リン酸化の機能正常化に有効である、iv) ネフリンとGM3は互いに協調して挙動していること等を見出した。

これらの結果は、スリット膜を構成するネフリンが、ネフリンの膜貫通領域の周囲に存在する糖脂質によって制御され、結果として足細胞の健全化・正常なスリット膜の機能維持に寄与している可能性を示唆している。同時に、蛋白尿治療の標的として足細胞に発現する糖脂質GM3も候補となり得る可能性を高めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、足細胞および腎の正常な機能維持における糖脂質の重要性を初めて明らかにした。また、画期的な新薬が開発されていない重度の蛋白尿を伴うネフローゼ症候群の治療において、現在用いられている免疫抑制剤よりも格段に副作用の少ない新規医薬品開発に向け、重要な分子基礎知見を提供した点でも学術的意義が高い。また、この知見は、発症機序が共通している 巣状糸球体硬化病変の腎移植後の再発予防や、ネフリン減少が起因する多くの腎疾患（糖尿病性腎症など）に対する新たな足細胞保護治療法開発への道を拓く。これにより、慢性腎不全患者数と新規透析患者数が減少し、社会的・経済的にも波及効果が非常に高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that i) the early stage of podocyte injury is accompanied by a decrease in glycosphingolipid GM3, ii) enhancement of GM3 expression via valproic acid has preventive and therapeutic effects on an appearance of proteinuria and glomerulosclerotic lesions, iii) it is effective in preventing F-actin bundle assembly collapse and normalizing nephrin phosphorylation function, iv) nephrin and GM3 behave with each other in cooperatively. This suggests that nephrin, which constitutes the slit membrane, may be regulated by glycolipids around the transmembrane region of nephrin, resulting in the maintenance of healthy podocytes and normal slit membrane functions. Indeed, the study suggested the possibility that GM3, a glycosphingolipid expressed in podocytes, may also be a potential target for proteinuria therapy.

研究分野：腎臓学

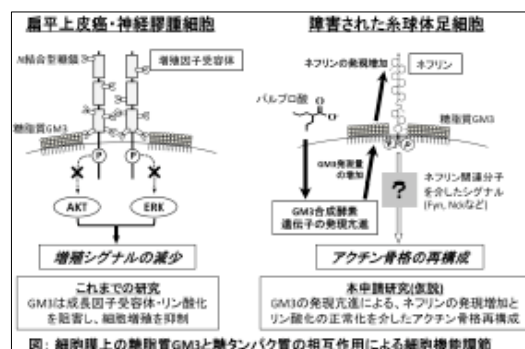
キーワード：糖脂質 GM3 足細胞 蛋白尿 糸球体 ネフリン

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は増殖・再性能を持たない足細胞の障害を特徴とする。よって、足細胞障害の保護が治療の基本となる。ネフリンは、創薬標的の50%以上を占める膜蛋白質である。実際、「ネフリンのリン酸化を介した障害足細胞アクチン骨格の維持および制御」が足細胞障害保護の治療標的として提案されている(*Nature*, **440**:2006)。しかし、ネフリンのみを障害したモデル動物が存在しないため、足細胞障害におけるネフリン・リン酸化の役割は依然として不明であり、ネフローゼ症候群に対する画期的な新薬開発は非常に遅れている。

現在汎用されているモデル動物は、ヒト巣状糸球体硬化症(FSGS)の原因とされる液性因子による足細胞障害機序が明確でない問題があった。そこで、申請者の研究室では、最適動物モデルの構築に取り組んできたが、近年、抗ネフリン抗体を投与した種々の腎障害モデル動物(微小変化型ネフローゼ症候群モデルやFSGSモデル等)を確立したところである(*北里医学*, **46**:2016、*Kitasato Med J*, **45**:2015)。特にマウスモデルは、i) 抗原蛋白質(ネフリン)が明確な抗体を用い、ii) 遺伝子改変動物に多用されるC57 BL/6マウスで、FSGSを再現できる点が最大の強みである。さらに抗体投与量依存的に、腎障害の程度も調節可能である。

ところで、抗癌薬として常用されるバルプロ酸は、近年、iPS細胞作製時の必須化合物としても利用されているが、その作用機序は不明な点が多い(*Nature Biotech*, **26**:2008)。申請者は、バルプロ酸が扁平上皮癌および神経膠腫細胞における糖脂質GM3の発現を亢進し、EGF受容体のリン酸化を制御し、細胞増殖を調節できる事を発見した(*JBC*, **291**:2016)。これらの知見を、足細胞のアクチン骨格を制御すると考えられているネフリンのリン酸化にも応用できるのではないかと考えた(右図)。



2. 研究の目的

糖脂質は、シグナル分子である膜蛋白質の[足場]に集積することで、膜蛋白質の機能を制御する。しかし、足細胞障害時における糖脂質の機能について、明確な報告はなされていない。本年申請者らは、独自に作製したネフリン抗体誘導性巣状糸球体硬化症(FSGS)モデル動物を用いて、糖脂質GM3が糸球体を正常に保つ機能を持つ可能性を見出した。また、バルプロ酸は糖脂質GM3の発現を亢進し、EGF受容体のリン酸化を抑制して細胞増殖を制御する事も報告した。そこで本研究では、「糖脂質GM3を用いてFSGSにおいて障害を受けた足細胞を正常化し、腎症の進行を抑制する」という視点から、バルプロ酸を糖脂質GM3の発現亢進のモデル化合物として用い、FSGSモデルに対する治療効果の検証、および創薬探索へ新たな基礎知見の提供を目指す。

3. 研究の方法

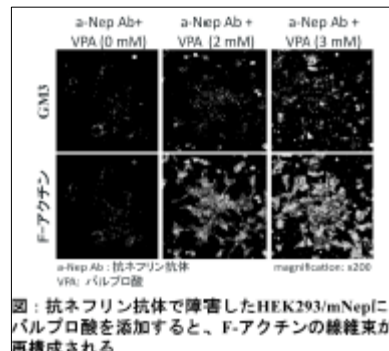
本研究は、開発したばかりの抗ネフリン抗体誘導障害モデル細胞やFSGSモデル動物を用い、モデル化合物としてバルプロ酸の持つ糖脂質GM3発現亢進作用が、足細胞障害の治療標的としてのネフリンの発現・リン酸化・アクチン骨格再構成に与える効果を検証する。本申請研究では、以下の手順で実験・検討を行う。

1. 障害ネフリン・リン酸化とアクチン骨格構成関連タンパク質(Fyn)との相互作用
2. 添加糖脂質GM3を用いた抗ネフリン抗体による細胞障害の改善効果
3. バルプロ酸を用いた抗ネフリン抗体による細胞障害の改善効果
4. FSGSモデル動物における、バルプロ酸によるGM3発現量亢進による治療効果

本研究は、抗ネフリン抗体誘導モデルを用い、糖脂質GM3を発現亢進させることで、足細胞障

害の治療効果の検証を目的とする。既に予備検討で、以下を確認している。 i) 抗体によるネフリン障害と共に発現が減少する F-アクチンは、糖脂質 GM3 (または GM3 合成酵素遺伝子を発現誘導するバルプロ酸(*JBC*, 291:2016)) の添加によって、再構成される(右上図)。

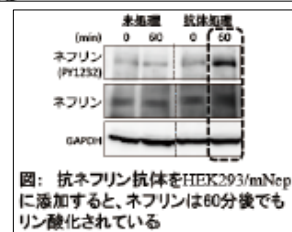
ii) ネフリンの PY1232 部位は、抗体によるネフリン障害 60 分後でもリン酸化が維持されている(右下図)。後期かつ長期のリン酸化は、ネフリンのシグナル異常によりアクチン骨格構成に変化を及ぼしている可能性がある。



図：抗ネフリン抗体で障害したHEK293/mNepに、バルプロ酸を添加すると、F-アクチンの線維束が再構成される

4. 研究成果

申請者らは、抗ネフリン抗体誘導性巣状糸球体硬化症 (FSGS) モデルマウスの糸球体における、ネフリンの発現量減少や F-actin 崩壊と糖脂質 GM3 の発現量減少との相関関係に着目したことをきっかけに、*vivo* 試験で、予めバルプロ酸を投与して内因的に糖脂質 GM3 の発現を増強させておくことで、抗体誘導性 FSGS における蛋白尿・硬化病変等の減少が阻止されるという予防効果について明らかにした。さらに、抗体誘導性 FSGS を惹起させた後にバルプロ酸を飲水投与しても、蛋白尿・硬化病変等が減少するという治療効果についても明らかにした。*in vitro* 実験では、バルプロ酸を介した GM3 の発現増強は、ネフリン障害からの回避や F-actin の維持に有効であることを示した。



図：抗ネフリン抗体をHEK293/mNepに添加すると、ネフリンは60分後でもリン酸化されている

特に重要な点は、i) 足細胞障害初期は GM3 の減少も伴うこと、ii) GM3 の発現増強により、ネフリン障害を回避できるため、正常ネフリン・リン酸化が維持され、F-actin が崩壊しないこと、iii) VPA を用いた GM3 の発現増強により、抗体誘導性 FSGS モデルマウスの蛋白尿・硬化病変・ポドサイトの減少を明確に抑制できること、である。これは、抗ネフリン抗体結合によるネフリンで構成されるスリット膜の構造変化が、ネフリン膜貫通領域の周囲に局在する糖脂質によって阻止され、結果として生体での正常なスリット膜機能の維持に寄与している可能性を示唆している。同時に、蛋白尿治療のための標的として足細胞に発現する糖脂質 GM3 も候補となり得る可能性も高まっている。

さらに、ネフリンへの抗体結合が何故 FSGS を惹起するのか、その真の原因を追求する必要がある。そこで、抗体結合直前後のネフリンや GM3 分子の発現量・位置・局在等、両分子の詳細な動的変化を捉えるため、量子ドットを用いた 1 分子イメージング法を用いた解析も試みた。なお、本研究成果については、産業財産権の取得も完了した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kamata F, Naito S, Kawashima N and Takeuchi Y.	4. 巻 52(1)
2. 論文標題 The relationship between podocytopathy and periglomerular fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The kitasato medical journal	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Suzuki M, Nagane M, Kato K, Yamauchi A, Shimizu T, Yamashita H, Aihara N, Kamiie J, Kawashima N, Naito S and Yamashita T.	4. 巻 569
2. 論文標題 Endothelial ganglioside GM3 regulates angiogenesis in solid tumors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 10-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.063.	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 Shimizu T., Nagane M., Suzuki M., Yamauchi A., Kato K., Kawashima N., Nemoto Y., Maruo T., Kawakami Y. and Yamashita T.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Tumor hypoxia regulates ganglioside GM3 synthase, which contributes to oxidative stress resistance in malignant melanoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BBA-General Subjects	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2020.129723. 2020.	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 川島永子	4. 巻 36
2. 論文標題 糖脂質GM3がもつネフリン障害治療効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 公益財団法人鈴木謙三記念医科学応用研究財団「医科学応用研究財団報告書」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Takeuchi K., Naito S., Kawashima N., Ishigaki N., Sano T., Kamata K. and Takeuchi Y.	4. 巻 138
2. 論文標題 New focal segmental glomerulosclerosis model using a C57BL/6 mouse strain induced with anti-nephrin antibody	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nephron Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000479935.	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22件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 内藤正吉、川島永子、石井大輔、藤田哲夫、岩村正嗣、竹内康雄
2. 発表標題 糖脂質GM3特異的発現上昇による足細胞保護効果
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口和花、川島永子、山下匡、内藤正吉
2. 発表標題 新規慢性腎臓病モデル動物の解析
3. 学会等名 平成21年度麻布大学獣医学部卒業研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口和花、川島永子、山下匡、内藤正吉
2. 発表標題 新規慢性腎臓病モデル動物の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島永子、石垣直子、仲山賢一、内藤正吉
2. 発表標題 糖脂質による抗体誘導性巣状糸球体硬化症(FSGS)予防・治療効果の検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤正吉、石垣直子、仲山賢一、川島永子
2. 発表標題 バルプロ酸の抗ネフリン抗体誘導性FSGSの予防・治療効果
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口和花、川島永子、山下匡、内藤正吉
2. 発表標題 糖脂質GM3のポドサイト保護効果
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島永子、仲山賢一、石垣直子、内藤正吉
2. 発表標題 バルプロ酸による抗ネフリン抗体誘導性FSGSの予防・治療効果
3. 学会等名 第4回ポドサイト研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口和花、川島永子、山下匡、内藤正吉
2. 発表標題 糖脂質GM3の腎保護効果の検討
3. 学会等名 第4回ポドサイト研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口和花、川島永子、山下匡、内藤正吉
2. 発表標題 糖脂質GM3の腎保護効果の検討
3. 学会等名 第4回ポドサイト研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島永子、仲山賢一、石垣直子、内藤正吉
2. 発表標題 バルブロ酸による抗ネフリン抗体誘導性FSGSの予防・治療効果
3. 学会等名 第4回ポドサイト研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口和花、川島永子、石垣直子、永根大幹、山下匡、内藤正吉
2. 発表標題 腎臓における酸性糖脂質GM3の重要性
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会フリーラジカルスクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島永子、内藤正吉
2. 発表標題 TNF- 誘導性糖鎖修飾不全ネフリン増加による小胞体ストレスマーカーの発現亢進
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤正吉、川島永子、佐野隆、竹内康雄
2. 発表標題 糖脂質GM3による抗体誘導性障害糸球体ポドサイトのネフリン正常化効果の検討
3. 学会等名 第2回ポドサイト研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤正吉、川島永子、佐野隆、竹内康雄
2. 発表標題 糖脂質GM3はネフリン抗体による細胞障害を正常化する
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島永子、竹内康雄、内藤正吉
2. 発表標題 糖脂質を利用した慢性腎臓病に対する新規創薬シーズの提案
3. 学会等名 Bio tech2018/第17回バイオ・ライフサイエンス研究展(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水琢音、永根大幹、村田拓馬、川島永子、圓尾拓也、吉岡千恵、山下 匡
2. 発表標題 腫瘍内低酸素領域におけるガングリオンドGM3合成酵素と治療抵抗性への関与
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑水流淳、大町紘平、嘉村美里、横田翼、寺本啓祐、小嶋遥、Mary Ann Suico、首藤剛、川島永子、内藤正吉、甲斐広文
2. 発表標題 抗ネフリン抗体を用いた新規糸球体硬化モデルの確率に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島永子、内藤正吉
2. 発表標題 ネフローゼ症候群に対する新規治療薬の探索
3. 学会等名 第7回低・中分子創薬推進プラットフォーム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤正吉、竹内和博、川島永子、竹内康雄
2. 発表標題 ネフリン抗体誘導性FSGSマウスにおけるポーマン嚢壁細胞の増殖能の検討
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島永子、辻大輔、伊藤孝司、仲山賢一
2. 発表標題 Sandhoff病モデルマウス由来アストロサイトの異常増殖の分子機序の解明-糖脂質はシグナル分子なのか？
3. 学会等名 日仏生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内藤正吉、川島永子、竹内康雄
2. 発表標題 ネフリンとポドサイトパッチ
3. 学会等名 相模原ポドサイトセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島永子、内藤正吉、中村和生、竹内康雄、仲山賢一
2. 発表標題 糖脂質を利用した抗体誘導性障害系球体ポドサイトのネフリン正常化効果の検討
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 川島永子、仲山賢一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 公益社団法人日本生化学会	5. 総ページ数 5
3. 書名 日本生化学会邦文誌「生化学」みにれびゅう スフィンゴ糖脂質による細胞膜分子の制御機構の普遍性	

1. 著者名 川島永子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 公益社団法人日本生化学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 日本生化学会邦文誌「生化学」ことば「バルプロ酸」	

1. 著者名 内藤正吉、川島永子、竹内康雄	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 「検査と技術」ポドサイト障害によるCKD研究の最前線	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糸球体腎炎の予防又は治療剤	発明者 川島永子、内藤正吉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/39434	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 糸球体腎炎の予防又は治療剤	発明者 川島永子、内藤正吉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7055429号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
研究分担者	仲山 賢一 (Nakayama Ken-ichi) (40357679)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域/つくば本部・研究部門付 (82626)	
研究分担者	内藤 正吉 (Naito Shokichi) (40365101)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	高野 勇太 (Takano Yuta) (60580115)	北海道大学・電子科学研究所・准教授 (10101)	

	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
連 携 研 究 者	板倉 誠 (Itakura Makoto) (30398581)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関