

平成23年6月2日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790827  
 研究課題名（和文） 腎臓構成細胞に作用する新規生理活性因子の同定と  
 腎臓修復治療法の開発  
 研究課題名（英文） Research for novel bioactive factors  
 for development of kidney regeneration therapy  
 研究代表者  
 澤井 一智（SAWAI KAZUTOMO）  
 独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・客員研究員  
 研究者番号：80393213

研究成果の概要：人工腎臓（透析）を要する末期腎不全患者は国内で29万人を突破し、その右肩上がりの増加にもかかわらず腎臓病の根本的治療法は存在しない。これは腎臓病の根本的かつ特異的な治療法の欠如に起因する。腎臓特異的な治療法の開発のために、糸球体足細胞やメサンギウム細胞、尿細管細胞などの腎臓構成細胞に対する反応性から、新規「腎傷害因子」、「腎保護因子」の探索を行い候補因子の解析を行い、また腎臓構成細胞から分泌される新規「腎分泌因子」の検索、同定に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学、podocyte、糸球体足細胞、メサンギウム細胞、尿細管細胞、新規因子

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓内科が対処すべき最大の課題のひとつに「末期腎不全へ進行する腎疾患の克服」があるが、現時点ではその根本的な治療法は存在しない。その原因のひとつとして、高度に分化した糸球体、尿細管の構造がどのように維持され、その保護因子、傷害因子が何であるかが十分に解明されていないことが挙げられる。特に不可逆的な糸球体硬化が、腎疾患治

療の大きな問題点のひとつであるが、これは糸球体足細胞 (podocyte) が再生能を持たないことと関連している。

そこで研究代表者は、糸球体構成細胞に作用する因子の解明目的に、修復性糸球体腎炎 (Thy-1 腎炎) の糸球体修復時に発現亢進する podocyte 特異的遺伝子のスクリーニングを行い、CCN1 (Cyr61)、Sema3C、新規セリンプロテアーゼ SL451 を含む 40

個の遺伝子を同定した (*J Am Soc Nephrol*, 2002, abstract)。その中で、血管新生因子 CCN1 に注目し、糸球体修復過程に podocyte が分泌因子を介して関与している可能性を初めて提唱した (*J Am Soc Nephrol* 14:1154, 2003)。更に、ヒト腎症における CCN1 の podocyte における発現低下がメサンギウム拡大に関与している可能性を示し (*Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1363, 2007)、動物モデルとして podocyte 特異的 CCN1 過剰発現マウスを作製し、この糖尿病モデルでの糸球体腫大抑制を含めた腎症改善効果を報告した (第 49 回日本腎臓学会学術集会、2006)。さらに糖尿病性腎症では、アルブミン尿出現以前から podocyte 関連遺伝子発現変化が見られること (*Diabetes* 55:2747, 2006)、またヒト糖尿病性腎症顕性蛋白尿期の podocyte におけるギャップ結合蛋白 connexin43 の局在異常が、腎予後と強い相関を示すことを報告し (*Nephrol Dial Transplant* 21:2472, 2006)、糖尿病性腎症進展における podocyte 機能異常の重要性を示した。

このように、研究代表者は腎症や糸球体修復における糸球体構成細胞、特に podocyte の新しい機能を明らかにし、それらの機能異常が腎症進展に関与することを報告してきたが、その一方で、腎臓構成細胞の機能維持にどのような因子が関与しているかについてはいまだに不明な点が多い。一方、蛋白尿が腎予後規定因子として重要であることは既に確立された事実である。蛋白尿の出現機序として、糸球体基底膜および podocyte スリット膜の破綻が原因との報告が多数なされてきたが、近年、糸球

体から濾過されるアルブミン量が従来想定されていたよりもはるかに多く、蛋白尿の原因が近位尿細管のアルブミン再吸収障害であるとの説が提唱され議論を呼んでいる (*J Am Soc Nephrol* 2009 20:489, 2009)。長年の予想に反して近位尿細管障害が蛋白尿の主因であれば、近位尿細管細胞に作用する因子の同定は画期的な腎疾患治療法の開発につながる可能性が高くなると考えられる。また、従来は長時間を要した新規因子の同定という探索研究において、大量かつ正確なスクリーニングを可能とする各種機器の開発が進んでいる。特にリニアイオントラップ質量分析計 (LTQ-Orbitrap) を筆頭とする質量分析計の進歩は目覚ましく、この最新鋭機器の活用が注目されているが (*BMC Medical Genomics* 1:41, 2008)、腎臓分野にターゲットを絞った研究での応用はまだ報告されていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の3点を目的として研究を行う。

(1) 培養 podocyte、メサンギウム、近位尿細管細胞に対する反応性から、患者血漿や尿中に存在する 新規「腎傷害因子」を同定する。

(2) ラットやブタの臓器抽出液、正常血漿や尿成分の培養 podocyte、メサンギウム、近位尿細管細胞への反応性から、形態・機能維持に必要な内因性の 新規「腎保護因子」を同定する。

(3) 培養 podocyte、メサンギウム、近位尿細管細胞などの腎臓構成細胞の培養上清を最新鋭の質量分析計 Orbitrap を用いて解析し、新規「腎分泌因子」を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛋白尿発現に関わる新規「腎傷害因子」の探索

##### ① 腎臓移植後の巣状糸球体硬化症 (FSGS)再発患者血漿、および LDL アフェレーシスカラム吸着因子を用いた FSGS 因子の同定

腎臓移植後 FSGS 再発患者血漿 (J Am Soc Nephrol 16:629, 2005)、FSGS 患者の LDL アフェレーシス療法の際に LDL アフェレーシスカラム (デキストラン硫酸) に吸着した因子を 5%NaCl 溶液で溶出、透析、脱塩後、SepPak カラムにて分画後、SP、CM イオン交換樹脂にて分離し、TSKgelG2000SWXL カラムを用いて分子量別に分画した。それぞれの画分に対する培養細胞 (podocyte、メサングウム、近位尿細管細胞) の反応を、細胞内カルシウム変化は FLIPR で、細胞内 cAMP 変化は Fusion-Alpha で、actin や microtubules といった細胞骨格、nephrin、podocin、CD2AP などといったスリット膜関連因子の発現量や局在の変化、近位細管細胞での FITC 標識アルブミン吸収促進/抑制活性は INCELL analyzer でそれぞれ検討し、活性因子を含む分画を同定した。その分画をさらに CM イオン交換 HPLC や symmetry C18、diphenyl、chemcosorb ODS などの逆相 HPLC による分画化を繰り返して純化後、プロテインシークエンサーや質量分析計にて構造決定した。

#### (2) 腎臓構成細胞機能維持に関わる新規「腎保護因子」の探索

##### ① 動物組織抽出液を用いた腎保護因子の同定

ラット、ブタの内臓脂肪、大脳、小脳、視床下部、脊髄、脳幹、肺、心房、心室、肝臓、脾臓、小腸、十二指腸、腎臓、精巣、胎盤などの組織を煮沸後、1M 酢酸でホモジェナイズした抽出液をアセトン沈殿し、上清を SepPak カラムで分画後、凍結乾燥した。これを SP イオン交換樹脂にて分離後、さらにそれぞれの画分を Sephadex-G50 ゲル濾過にて分画した。次に上記と同じくそれぞれの画分に対する培養細胞の反応性を指標に、活性因子を含む画分を同定、精製を繰り返し新規生理活性因子を単離・同定した。

##### ② 正常血漿、尿中の腎保護因子の同定

正常血漿・尿を上記と同様に培養細胞の反応性を指標に精製し、新規生理活性因子の単離・同定を行なった。尿中には、血漿と異なり、PGE2 などの小分子物質が多量に存在するため、より大きな分子量の因子に照準を絞った探索の際には、最初に SP カラムで小分子物質を除去した後に同様の精製を行った。

##### ③ PAN 腎症の蛋白尿惹起因子の探索

足細胞由来因子の尿細管細胞への作用を検討する目的で、培養足細胞の培養上清に puromycin aminonucleoside (PAN) を添加し 24 時間後に回収、SepPak C18 カラムに吸着させた後、sulphopropyl (SP) 強イオン交換樹脂への吸着性から SPI, SPII, SPIII の 3 分画に分離し、それぞれの画分をゲル濾過 HPLC にて分子量により 50 画分に分離し、培養近位尿細管細胞の細胞内シグナル変化を指標に活性因子を含む画分の探索を行なった。

##### (3) 新規「腎分泌因子」のリニアイオントランプ質量分析計による探索

培養細胞の培養液を血清・フェノールレッド無添加の培養液に置換後、探索標的に

より適宜 PMA 1 $\mu$ M、carbachol 0.5 $\mu$ M、forskolin 0.5 $\mu$ M など刺激し、細胞内構造蛋白の断片の混入を防ぐため細胞が剥離しないよう観察しながら、8~12 時間培養を続け上清を回収した。InertSep RP-1 にて回収し、TSKgelG2000SWXL にてペプチド分画を細分化して分取し凍結乾燥し、還元アルキル化反応後、3M EMpore にて脱塩した。これらのフラクションごとに Oribtrap を用いて含有ペプチド断片を解析し、MASCOT を用いて同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 巣状糸球体硬化症に関わる新規「腎傷害因子」の探索

巣状糸球体硬化症再発患者血漿ならびに LDL-A 吸着因子をイオン交換、逆相 HPLC により数百の分画に分離し、それぞれの画分に対する培養足細胞、メサンギウム細胞、尿細管細胞に対する反応性を細胞内カルシウム・cAMP 変化で検討し、活性因子を含む分画を同定、純化後、プロテインシーケンサーや質量分析機を用いて構造決定を行なった。培養足細胞に関しては、細胞内カルシウム変化を来す主成分はブラジキニンおよびヒドロキシプロリルブラジキニンであることが判明した。

##### (2) 糸球体細胞、尿細管細胞の機能維持に関わる新規「腎保護因子」の探索

ラットおよびブタの組織を煮沸後、抽出液をアセトン沈殿し、その上清を分離し、凍結乾燥し、SP sepharose カラム、ゲル濾過にて分画し、それぞれの画分に対する培養足細胞、メサンギウム細胞、尿細管細胞の反応性を指標に、活性因子を含む画分を同定し、HPLC を用いて新規

生理活性因子の単離・同定を行なった。活性因子としては、既知のものとしてリジンバゾプレッシン、アルギニンバゾプレッシン、EGF、プロスタグランジン E2 などが同定され、引き続き解析を続けている。

##### (3) PAN 腎症の蛋白尿惹起因子の検索

ネフローゼ症候群の動物モデルである puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症における PAN の作用点は糸球体足細胞と考えられているが、足細胞の障害だけでは説明出来ない点も多い。そこで、足細胞由来因子の尿細管細胞への作用を検討する目的で以下の実験を行なった。まず、培養足細胞の培養上清に PAN を添加し 2 4 時間後に回収、SepPak C18 カラムに吸着させた後、sulphopropyl (SP) 強イオン交換樹脂への吸着性から SPI, SPII, SPIII の 3 分画に分離し、それぞれの画分をゲル濾過 HPLC にて分子量により 5 0 画分に分離を行なった。培養近位尿細管細胞の細胞内シグナル変化を指標に活性因子を含む画分の検索を行なったところ、SPIII 分画の分子量 200~1000 Da と推定される画分に強い細胞内 cAMP 上昇活性を認めた。この画分をさらに carboxymethyl (CM) 弱イオン交換 HPLC の pH6. 4 および pH4. 8 下、Symmetry C18、Diphenyl、Chemcosorb C18 の各逆相 HPLC カラムでの分離を経て、最終的に培養上清 20 リットルから 0. 4mg の活性因子 X を単離精製することが出来た。この因子 X は、未分化状態の足細胞ではごく少量しか生成されないことから、因子 X の生成には足細胞特異的な機能の必要性が示唆された。さらに因子 X は、LLC-PK1 細胞および Opossum kidney 細胞のアルブミンの細胞内取込みを抑制することを確認した。このことは、足細胞由来の因子 X が、尿細管に作用し蛋

白尿を惹起する可能性を示している。この因子 X は質量分析器で分子量 586.3 Da と判明したが、解析結果より非ペプチド性の因子であると推定され、現在、さらに試料量を増やして NMR 解析を行なっている。

#### (4) 新規「腎分泌因子」のリニアイオン トラップ質量分析計による探索

足細胞、メサンギウム細胞の培養上清を精製し、Oribtrap を用いて含有ペプチド断片を解析し、MASCOT を用いて同定した結果、EF1 alpha-1, Cyr61, adrenomedullin 2, CSF-1, calsyntenin, osteopontin, calumenin, Serpin H1, VEGF-A, DAG, SPARC-related modular calcium binding protein 1 など、腎臓構成細胞からの分泌が知られていたもの、知られていなかった既知の因子、生理活性の知られていなかった新規因子の同定に成功し、現在それら腎臓における生理的、病理的機能を解析している。

#### 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 2 件)

- (1) Hidetoshi Tsuda, Kenichi Yamahara, Shin Ishikane, Kentaro Otani, Atsuhiko Nakamura Kazutomo Sawai, Naotsugu Ichimaru, Masaharu Sada, Akihiko Taguchi, Hiroshi Hosoda, Masahiro Tsuji, Hiroshi Kawachi, Masaru Horio, Yoshitaka Isaka, Kenji Kangawa, Shiro Takahara, and Tomoaki Ikeda. Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal*

*Physiol* 299: F1004–F1013, 2010. 査読有

- (2) Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, Sata M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29: 1516-1512, 2009. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

澤井 一智 (SAWAI KAZUTOMO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・客員研究員

研究者番号：80393213

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし