様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　６ 月 ２６ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ１６１８８

研究課題名（和文）腎糸球体でのナトリウム利尿ペプチド受容体とp38 MAPKの関連性

研究課題名（英文）Association of p38 MAPK with natriuretic peptide receptors in renal glomeruli

研究代表者
山田　博之（Yamada, Hiroyuki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：７０７１３６５０

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）：本研究では、腎糸球体ポドサイトにおけるナトリウム利尿ペプチド(Guanylyl cyclase-A; GC-A)およびp38 MAPKの２つの働きに着目した。ポドサイト特異的GC-A & p38 MAPKダブルノックアウトマウスでは、ポドサイト障害、糸球体係蹄内血栓を認めた。
　次に、p38 MAPKノックアウト培養ポドサイトに対して、GC-Aの発現を低下させると、炎症性サイトカインの発現が増え、共培養したヒト臍帯静脈内皮細胞でもTGF-β、FNの発現量の増加を認めた。
　以上より、ポドサイトのp38 MAPKとGC-Aでの欠失によりポドサイトおよび血管内皮細胞に障害を及ぼすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回の研究により、p38 MAPKが糸球体のポドサイトと血管の血管内皮細胞のそれぞれとの関連性において非常に重要なタンパク質であることが明らかになった。また、これまでヒト培養ポドサイトにおいてゲノム編集技術の応用が成功した例は少なく、本技術がポドサイトに応用可能であることがわかり、今後の研究の発展性を大きく広げた。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the functions of natriuretic peptide (Guanylyl cyclase-A; GC-A) and p38 MAPK in glomerular podocytes. Podocyte-specific GC-A & p38 MAPK double knockout mice showed podocyte damage and thrombi in the glomerular coxae.
　Next, when GC-A expression was decreased in p38 MAPK knockout cultured podocytes, the expression of inflammatory cytokines elevated. Moreover, it also increased the expression of TGF-β and FN in co-cultured human umbilical vein endothelial cells.
　These results suggest that deletion at p38 MAPK and GC-A in podocytes causes damage in podocytes and vascular endothelial cells.

研究分野：腎臓

キーワード：ポドサイト　ナトリウム利尿ペプチド　p38 MAPK　ANP

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室ではこれまで、アルドステロン、片腎摘、高食塩（以下 U-ALDO）負荷を行うと腎ポドサイトが障害され、ナトリウム利尿ペプチド/受容体(Guanylyl cyclase-A; GC-A)系が拮抗的に作用することを示してきた。U-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A ノックアウトマウスは尿中アルブミン排泄が亢進し、糸球体メサンギウム拡大、ポドサイト足突起消失が認められ、ポドサイトにおいては p38 MAPK のリン酸化亢進が認められる(Kato, Yokoi et al. Sci Rep 7:46624, 2017)。この報告において、p38 MAPK のリン酸化が重要であると考え、U-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A ノックアウトマウスに p38 MAPK 阻害薬である FR167653 を投与したところ、アルブミン尿の減少、メサンギウム拡大の抑制、ポドサイト障害軽減が認められた。しかしながらこの研究では、p38MAPK の阻害効果がポドサイトの p38 MAPK の抑制によるものか、全身の p38 MAPK 抑制によるものかは明らかではなかった。

そのため、ポドサイト特異的に p38 MAPK を抑制する必要があると考え、p38αMAPK floxed マウスをスペイン Nebreda 先生、ドイツ Pasparakis 先生との共同研究で導入し、ポドサイト特異的 GC-A＆p38 MAPK ダブルノックアウト（以下 pod-dKO）マウスを作出し、同様の U-ALDO 負荷を行った。その結果、ポドサイト特異的 GC-A＆p38 MAPK ダブルノックアウトマウスではアルドステロン投与後 2 週頃に死亡するマウスが多く実験の継続・解析が困難であった。そのため、負荷を軽くする目的で片腎摘を行わずにアルドステロン負荷、高食塩負荷を行う B-ALDO 負荷に変更し実験を行ったところ、ポドサイト特異的 GC-A＆p38 MAPK ダブルノックアウトマウスは高度のアルブミン尿とポドサイト障害、腎機能悪化と糸球体係蹄内血栓を認めた。当初は、ポドサイト特異的 GC-A ノックアウトマウスにポドサイト特異的な p38 MAPK 阻害は腎障害の改善を示すのではないかと想定していたが、全く逆の結果であった。

この時点で以下の 2 点の「問い」が生じた。

１）B-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A＆p38 MAPK ダブルノックアウトマウスにおいて p38 MAPK 阻害薬で改善したのは、**ポドサイトの p38 MAPK を抑制したためか、それとも別の細胞の p38 MAPK を抑制**したためか？

２）糸球体内血栓が生じているのは糸球体内皮細胞障害が生じているからと考えられるが、**ポドサイトと内皮細胞をつなぐ液性因子**は存在するか？

このうち２）に関しての検討は B-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A&p38 MAPK ダブルノックアウトマウスと B-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A ノックアウトマウスの糸球体から単離した RNA で Gene Array を行い、Pathway 解析により発現が亢進した遺伝子の中から凝固線溶系に関係する遺伝子を抽出しており、その中でⅧ因子、ⅩⅢ因子、PAI-１が亢進しており着目して解析をすすめている。

２．研究の目的

上記の背景ならびに「問い」に対して、**本申請研究の目的**としては、

１）B-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A ノックアウトマウスの p38 MAPK 阻害薬による全身的な p38 MAPK 阻害による腎病変の改善と、ポドサイト特異的な p38 MAPK

欠損による腎病変の増悪について、相反する結果になった分子機序を解明すること、
２）B-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A&p38 MAPK ダブルノックアウトマウスで認められる糸球体内Ⅷ因子、Protein C、PAI-1 遺伝子発現増加が、ポドサイトにおける GC-A と p38 MAPK のノックアウトからどのような機序と細胞連関を通じて生じるかを解明すること、
を目的とする。

３．研究の方法
１）B-ALDO 負荷ポドサイト特異的 GC-A&p38 MAPK ノックアウトマウスへの p38 MAPK 阻害薬投与
２）CRISPR/Cas9 による培養 p38MAPK または GC-A ヒトノックアウトポドサイトの作製
３)p38 MAPK または GC-A ノックアウトポドサイトを用いたポドサイトー内皮細胞、ポドサイトーメサンギウム細胞連関の解析
４）標的細胞特異的 p38MAPK ノックアウトマウスの作出

４．研究成果
本研究では、腎糸球体ポドサイトにおけるナトリウム利尿ペプチド(Guanylyl cyclase-A; GC-A)および p38 MAPK の２つの働きに着目した。ポドサイト特異的 GC-A & p38 MAPK ダブルノックアウトマウスでは、ポドサイト障害、糸球体係蹄内血栓を認めた。
　次に、p38 MAPK ノックアウト培養ポドサイトに対して、GC-A の発現を低下させると、炎症性サイトカインの発現が増え、共培養したヒト臍帯静脈内皮細胞でも TGF-β、FN の発現量の増加を認めた。
　以上より、ポドサイトの p38 MAPK と GC-A での欠失によりポドサイトおよび血管内皮細胞に障害を及ぼすと考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6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　0件）

１．著者名 山田 博之、横井 秀基	４．巻 58
２．論文標題 特集 腎疾患-エキスパートへの質問で学ぶ診療のキホンと最新情報 利尿薬やその他の新薬の有効性と注意すべき副作用 心不全やAKIにANP(心房性ナトリウム利尿ペプチド)を投与すべきか否か? またその効果はあるのか? について教えてください	５．発行年 2021年
３．雑誌名 medicina	６．最初と最後の頁 1636～1640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1402227821	査読の有無 無
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 山田博之	４．巻 91
２．論文標題 【腎疾患治療薬update】(第5章)期待される薬剤 急性腎障害の予防 低用量カルペリチド(心房性ナトリウム利尿ペプチド:ANP)	５．発行年 2021年
３．雑誌名 腎と透析	６．最初と最後の頁 765-768
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 Naoki Kitajima, Hiroyuki Yamada, Takuma Minami, Shigeru Ohtsuru	４．巻 50
２．論文標題 Optimal Evidence Grading of Simultaneous Use of Hypertonic Saline and Furosemide for Fluid Overload.	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Critical Care Medicine	６．最初と最後の頁 405-406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/CCM.0000000000005419	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 Masashi Fukuta, Kotaro Suzuk , Shotaro Kojima, Yoko Yab , Kazumasa Suzuki, Kazuma Iida, Hiroyuki Yamada, Shinichi Makino, Arifumi Iwata, Shigeru Tanaka, Taro Iwamoto, Akira Suto, Daiki Nakagom , Hidefumi Wakashin, Yuko Maezawa, Yoshiro Maezawa, Minoru Takemoto, Katsuhiko Asanuma, Hiroshi Nakajima	4．巻 8
2．論文標題 Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) expressed in podocytes attenuates glomerulonephritis and suppresses autoantibody production in an imiquimod-induced lupus model	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Lupus Science & Medicine	6．最初と最後の頁 e000426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/lupus-2020-000426	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 Hoang Linh, Yasunori Iwata, Yusuke Nakade, Megumi Oshima,Shiori Yoneda-Nakagawa, Hisayuki Ogura, Koichi Sato, Taichiro Minami, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama,Yuta Yamamura, Taro Miyakawa, Akinori Hara, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Norihiko Sakai, Hiroyuki Yamada, Katsuhiko Asanuma, Kouji Matsushima, Takashi Wada	4．巻 9
2．論文標題 Intestinal Bacterial Translocation Contributes to Diabetic Kidney Disease.	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6．最初と最後の頁 ASN 202160843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2021060843	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 Hiroyuki Yamada , Motoko Yanagita	4．巻 5
2．論文標題 Global Perspectives in Acute Kidney Injury: Japan	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Kidney360	6．最初と最後の頁 KID.0007892021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34067/KID.0007892021	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 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　2件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 杉岡 清香
2．発表標題 ポドサイトにおけるp38MAPKの欠失はポドサイト特異的GC-Aノックアウトマウスの腎障害を増悪させる
3．学会等名 日本腎臓学会
4．発表年 2021年

１．発表者名 山田博之
２．発表標題 未踏の頂き AKIへの挑戦 ICUにおけるケアバンドル
３．学会等名 日本腎臓学会（招待講演）
４．発表年 2021年

１．発表者名 山田博之
２．発表標題 Membrane-Associated Guanylate Kinase Inverted 2は、腎糸球体ポドサイトのスリット膜構造維持に必須である
３．学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔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

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