

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249047

研究課題名(和文)系球体硬化症の新展開

研究課題名(英文) Novel Approach for Treatment of Glomeruloclerosis

研究代表者

市川 家國 (ICHIKAWA, Iekuni)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：80317768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓病は国民健康上重要な問題である。腎炎や糖尿病等様々な原因で、腎臓のタコ足細胞とよばれる細胞が傷害されると、腎臓全体は働かなくなる。一部のタコ足細胞が傷害されると、近隣のタコ足細胞も二次的に傷害されてしまう。我々は、一部のタコ足細胞に傷害を与える事ができるマウスのモデルを作製して、どのように傷害が広がってゆくのかを解析して、いくつかの鍵を握ると思われる分子を同定した。これらの分子の働きを薬で抑える事ができれば、腎臓病の進行を止める事ができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Kidney diseases are major national health problems. Various causes including nephritis and diabetes leads to injury in “podocytes” in the kidney, which leads to loss of the whole kidney function. Damage in a subpopulation of podocytes secondarily propagates injury to the neighboring podocytes. In this project, we have established a mouse model in which injury to a fraction of the podocyte population can be induced, analyzed how the podocyte injury spreads and identified several key molecules potentially involved in the propagation of injury. It is expected that drugs targeting these molecules would forestall the progression of kidney diseases.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ポドサイト傷害 慢性腎不全 系球体硬化症 タンパク尿

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎疾患はわが国の戦略研究の対象とされている重要な研究対象である。近年、マウスは遺伝子操作を通じて多くの疾患の原因解明に最も有用な動物種となったが、慢性腎疾患はその恩恵を受けられなかった。他種に有効なあらゆる慢性腎疾患導入刺激に対し、例外的に抵抗性を有するためである。申請者等は、イムノトキシン(LMB2)の投与によりポドサイト特異的傷害を誘導可能なマウス(NEP25)や、HIV-1 腎症マウスを作製することによって慢性腎疾患のマウスモデルを作る事に成功してきた。申請者等は更に、一部のポドサイトだけが NEP25 に由来するキメラマウスを作製し、一部のポドサイトに起きた傷害が、当初は正常であった他のポドサイトに極めて初期から二次的に波及し始める現象を発見した。この現象は、慢性腎疾患が持つ「進行性」という特徴をよく説明するが、その機序は未解決の問題である。

ポドサイトは、生後に増殖や再生することがなく、一度失われると補填されることはない。この点から、ポドサイト傷害の究極の治療法は、ポドサイトの数を増やす事である。申請者等は以前生体においてポドサイトを細胞周期に再入させることのできるマウスを開発した。ポドサイトの数を増やすということが治療手段となりうるのかという点に興味をもたれた。

## 2. 研究の目的

研究開始前の目的は以下の3点であった。

- (1) ポドサイト間の傷害伝搬の機序を解明すること
- (2) ポドサイト数を増やす事による腎臓病治療の可能性を検証すること
- (3) 糸球体濾過圧がポドサイト傷害に与える影響を調べる事

## 3. 研究の方法

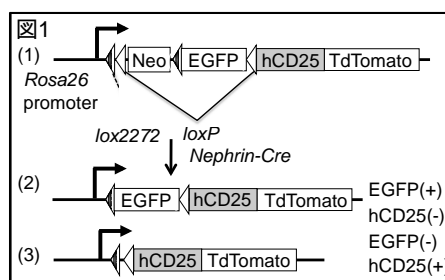
- (1) 一部のポドサイトがモザイク状に HIV-1 の *vpr* 遺伝子を発現するマウスを解析し、ポドサイト傷害の拡大を検証する。*Vpr* マウスをオートファジーに必須の *Atg5* をポドサイト

特異的に欠損するマウスと交配し、ポドサイト傷害の拡大におけるオートファジーの役割を検証する。

- (2) *Bcl2* ノックアウトマウスは、先天的にネフロン数が少なく、人の同様の病態である CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract) のモデルである。CAKUT 同様、成長にともない糸球体硬化症を続発する。我々の開発した *SV40T/rtTA* マウスは、ポドサイトを細胞周期に再入させることができる。両者を交配し、ポドサイトの数を増やすことにより、*Bcl2* ノックアウトマウスの糸球体硬化症を防止可能かどうか検証する。
- (3) *in vitro* の灌流系を用いて、糸球体濾過圧がポドサイト傷害におよぼす影響を検証する。

## 4. 研究成果

上記研究開始時の目的のうち、濾過圧の影響をみる実験は、*in vitro* の実験系が安定せず、困難を極めた。またポドサイト間の傷害伝搬の機序を解明のための実験方法として、*vpr* transgenic mouse を用いることに問題があることが判明した。そこで、当初の計画を修正し、ポドサイト間の傷害伝搬の機序の問題に集中し、そのための新たなモデルマウスの開発から開始することにした。

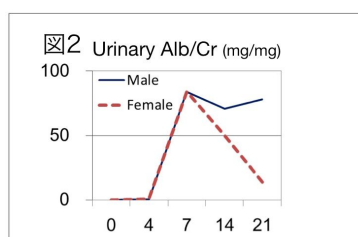


- (1) 一部のポドサイトに傷害を誘導可能なマウスモデルの開発

図1(1)のように ROSA26 プロモーターの下流に、変異 loxP、EGFP、hCD25 を挿入された transgene をもつマウスを、ES 細胞における相同組換えを利用して作製した。このマウスをポドサイトで Cre recombinase を発現するマウスと交配した。両方のトランスジーン

をもつマウス（以下モザイクマウス）では、期待どおり、ランダムに変異 loxP 間または loxP 間のいずれか一方の組換えがおこった（図 1(2)(3)）。系球体細胞を解離させた後、FACS で解析した結果、約 50% のポドサイトは EGFP を発現し、約 40% のポドサイトは、hCD25 と tdTomato を発現し、のこり約 10% はいずれも発現していないことがわかった。また、同一系球体に、EGFP 発現ポドサイトと tdTomato 発現ポドサイトが混在していた。次に、モザイクマウスを片腎摘の後、hCD25 特異的イムノトキシン（LMB2）を投与した。hCD25 と tdTomato を発現するポドサイトは当然ながら傷害されたが、hCD25 をもたない EGFP 発現ポドサイトも二次的に傷害された。以前、申請者等は、キメラマウスを用いてこの二次的ポドサイト傷害の存在を実証したが、新規作製したモザイクマウスモデルもこの現象を再現可能であり、またキメラマウスと異なり、モザイクマウスは交配により数を増やすことが可能であるという特性があり、その後の研究に極めて有用であった。

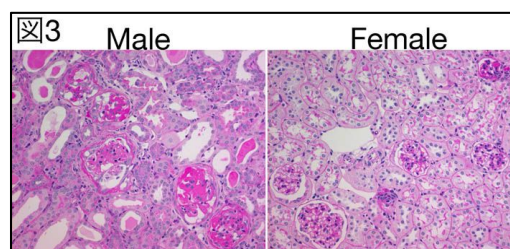
(2) 二次的ポドサイト傷害の性差  
興味深い事に、モザイクマウスの雄は LMB2 投与後 3 週でほぼ 100% の系球体が全節性系球体硬化を示し死亡したのに対し、6 月齢未満の雌は 2 週目以降蛋白尿が減少し、軽微な巣状分節性硬化を示すのみで長期生存した（図 2,3）。LMB2 投与前の hCD25 発現ポドサイトの率に雌雄差はなく、また全ポドサイトに hCD25 を発現する NEP25 マウスでは、腎傷害に性差はなかった。したがって、一次的



傷害には性差がないものの、二次的傷害に明確な性差があり、若い雌は 7 日目以降二次的ポドサイト傷害を収束させる特性を持っていると推測された。

ヒトの慢性腎臓病の有病率には性差がないにもかかわらず、血液透析療法などが必要になる末期腎不全は、男性が女性の 2 倍程度

多い。つまり、ヒトの腎臓の傷害の進行は男性の方が速く、この性差に二次的ポドサイト傷害の性差が関与する可能性が考えられた。もう一つの大きな意味は、二次的ポドサイト傷害の制御により、腎臓病の悪化スピードを軽減するだけでなく、最終的に腎不全を防止できる可能性がでてきたことである。



(3) 傷害ポドサイトの mRNA 発現解析  
雄モザイクマウスの系球体細胞を解離させ、FACS で td-Tomato+ および EGFP+ 細胞をそれぞれ分離回収し、RNA を抽出した。これらの RNA を Agilent 社 8x60K アレイにより解析し、正常、一次および二次的傷害ポドサイトの RNA 発現プロファイルを得た。正常および一次傷害ポドサイトに関しては、Ribotag マウスと NEP25 マウスを用いる別方法でも、RNA 発現プロファイルを得た。これらの解析の結果、ポドサイト傷害後に顕著で大規模な RNA 発現変化が認められたが、tdTomato 陽性ポドサイトで産生され、EGFP 陽性 podocyte にその受容体が豊富に存在し、かつリガンドまたは受容体のいずれかが LMB2 投与後に増加しているような分子を

しぼりこむと、表 1 の分子の組が得られた。これらは、ポドサイトの細胞間傷害伝搬に関与する可能性があり、腎臓病治療薬の有効な標的候補になると期待された。

リガンド	受容体
<b>Tgfb2/3</b>	Tgfb1/2
<b>Angptl4/7</b>	ltgav/b5
<b>S100a6</b>	RAGE
ATP	<b>P2X7</b>
<b>Sema7a</b>	ltga1, av, b1
<b>Thbs4</b>	ltg?/Ca2a2d1
<b>Epha8</b>	Efna2, 3, 5

(太字が増加を示した)

(4) 実験的 CAKUT の治療の試み  
我々の開発したドキシサイクリンの投与によりポドサイトを細胞周期に再入させることができるが、成長後の SV40T/rtTA マウスにドキシサイクリンを投与しても、ポドサ

イトの増加は軽度にとどまった。一方 *SV40T/rtTA* マウスの胎児期にドキシサイクリンを投与すると、WT1 染色で同定されたポドサイトの数は顕著に増加した。しかしながら、糸球体面積は変わらず、過剰のポドサイトがボーマン腔や尿細管腔に脱落していた。次に、ネフロン数の少ない *Bcl2* KO マウスと交配させ、*Bcl2* KO/*SV40T/rtTA* マウスの胎児期にドキシサイクリンを投与した。ポドサイト数は、*SV40T/rtTA* と同程度に増加したが、糸球体は大きくならなかった。この事は、糸球体のサイズとポドサイト数は無関係に調節されている事を示唆している。また、*Bcl2* KO マウスにおいても、糸球体から脱落したポドサイトが認められた。このことから、ポドサイトの数を増やしても、糸球体から脱落し、治療手段とはならない事が示唆された。

(5) 硬化糸球体における I 型 Collagen の変容

I 型 Collagen は、 $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  鎖から構成され、それぞれ *Colla1*, *Colla2* 遺伝子にコードされている。従来は正常糸球体にはお I 型 Collagen はほとんど存在しないといわれてきた。上記のポドサイトの遺伝子プロフィール解析の結果、正常ポドサイトは *Colla2* mRNA を多量に発現し、傷害後に著減する事を見出した。また、*Colla1* mRNA は傷害後に増加した。ポリクローナル抗体で染色される I 型 Collagen は、ポドサイト傷害後糸球体硬化症の進展とともに増加した。*Colla2* の変異マウスは、 $\alpha 1$  鎖のみから構成される異常 Collagen が糸球体に沈着して、硬化様病変を示す事から、硬化糸球体においても同様の異常な Collagen I の蓄積が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

Motojima M, Ogiwara S, Matsusaka T, Kim SY, Sagawa N, Abe K, Ohtsuka M. Conditional knockout of *Foxc2* gene in kidney: efficient generation of conditional alleles of single-exon gene by double-selection system. *Mamm Genome*. 2016 Feb;27(1-2):62-9. doi: 10.1007/s00335-015-9610-y. 査読あり

Okabe M, Miyazaki Y, Niimura F, Pastan I, Nishiyama A, Yokoo T, Ichikawa I,

Matsusaka T. Unilateral ureteral obstruction attenuates intrarenal angiotensin II generation induced by podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Apr;308(8):F932-7. doi: 10.1152/ajprenal.00444.2014. 査読あり

Miyazaki Y, Shimizu A, Pastan I, Taguchi K, Naganuma E, Suzuki T, Hosoya T, Yokoo T, Saito A, Miyata T, Yamamoto M, Matsusaka T. *Keap1* inhibition attenuates glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Apr;29(4):783-91. doi:10.1093/ndt/gfu002. 査読あり

Miyazaki Y, Shimizu A, Ichikawa I, Hosoya T, Pastan I, Matsusaka T. Mice are unable to endogenously regenerate podocytes during the repair of immunotoxin-induced glomerular injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 May;29(5):1005-12. doi: 10.1093/ndt/gft413.

Matsusaka T, Niimura F, Pastan I, Shintani A, Nishiyama A, Ichikawa I. Podocyte injury enhances filtration of liver-derived angiotensinogen and renal angiotensin II generation. *Kidney Int*. 2014 May;85(5):1068-77. doi: 10.1038/ki.2013.453. 査読あり

Komaki F, Miyazaki Y, Niimura F, Matsusaka T, Ichikawa I, Motojima M. *Foxc1* gene null mutation causes ectopic budding and kidney hypoplasia but not dysplasia. *Cells Tissues Organs*. 2013;198(1):22-7. doi: 10.1159/000351291. 査読あり

Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, Pastan I, Saito A, Kobori H, Nishiyama A, Ichikawa I. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Jul;23(7):1181-9. doi: 10.1681/ASN.2011121159. 査読あり

Shimizu A, Zhong J, Miyazaki Y, Hosoya T, Ichikawa I, Matsusaka T. ARB protects podocytes from HIV-1 nephropathy independently of podocyte AT1. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Aug;27(8):3169-75. doi: 10.1093/ndt/gfs033. 査読あり

Matsusaka T, Sandgren E, Shintani A, Kon V, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Podocyte injury damages other podocytes. J Am Soc Nephrol. 2011 Jul;22(7):1275-85. doi: 10.1681/ASN.2010090963. 査読あり

[学会発表] (計 42 件)

Okabe M, Miyazaki Y, Yokoo T, Fukagawa M, Matsusaka T. Comprehensive Polysome Analysis in Injured Podocytes. ASN Kidney Week. Nov. 5, 2015. San Diego, USA.

Okabe M, Motojima M, Miyazaki Y, Yokoo T, Fukagawa M, Ichikawa I, Matsusaka T. A new mosaic model of segmental podocyte ablation. ASN Kidney Week. Nov. 14, 2014. Philadelphia, USA.

Koizumi M, Fukagawa M, Matsusaka T. Glomerular fibrosis revisited: podocyte injury shuts down Col1a2 mRNA, leading to abnormal collagen accumulation. ASN Kidney Week. Nov. 7-9, 2013. Atlanta, USA.

Matsusaka T, Niimura F, Fukagawa M, Nishiyama A, Ichikawa I. Liver-, but Not Kidney- Specific Angiotensinogen Gene Knockout Abrogates the Enhancement of Renal Angiotensin II Synthesis that Follows Podocyte Injury in Progressive Glomerulosclerosis. ASN Kidney Week. Nov. 1-4, 2012. San Diego, USA.

Ichikawa I, Niimura F, Nishiyama A, Matsusaka T. Filtered Angiotensinogen, Not Renal Renin, Determines the Renal Angiotensin II Synthesis when Podocytes Lose Their Molecular Barrier Function. ASN Kidney Week. Nov. 1-4, 2012. San Diego, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件) ○取得状況(計 0 件)

〔その他〕無

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

市川 家國 (ICHIKAWA Iekuni)  
東海大学・医学部・客員教授  
研究者番号：80317768

(2) 研究分担者

松阪 泰二 (MATSUSAKA Taiji)  
東海大学・医学部・内科・准教授  
研究者番号：50317749

本島 英 (MOTOJIMA Masaru)  
東海大学・医学部・薬理学・講師  
研究者番号：80468636

(4) 連携研究者: 無し

(5) 研究協力者

Ira Pastan, Professor, Laboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland