

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390216

研究課題名(和文)系球体腎炎に対するFSP1を中心とした新規治療戦略

研究課題名(英文)Novel strategy for the treatment of active nephritis using secreted FSP1

## 研究代表者

岩野 正之(Iwano, Masayuki)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：20275324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：分泌型FSP1のメサンギウム細胞に対する作用をin vitroとin vivoで検討した。分泌型FSP1は、NF- $\kappa$ B活性化抑制を介してメサンギウム細胞のTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1発現を有意に抑制した。また、分泌型FSP1はMCでのリン酸化Akt発現を誘導した。さらに、遺伝子改変マウスの検討から、FSP1はin vivoにおいてもTLR4阻害作用を有することが示唆された。分泌型FSP1は新規TLR4阻害因子としてポドサイトーメサンギウム細胞連関に関与し、系球体疾患への治療応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：FSP1-positive podocytes were observed in active glomerular damage. In this study, we investigated whether secreted FSP1 from podocytes has some biological effects on mesangial cells in vitro and in vivo. We generated recombinant FSP1 (rFSP1) by the standard method. rFSP1 inhibited LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL-6, and MCP-1 production and mRNA expression in cultured mesangial cells. LPS injection induced glomerular TNF- $\alpha$  mRNA expression in vivo and this induction was significantly inhibited by the peritoneal injection of rFSP1. Next, we generated transgenic mice (FSP1.TG) in which podocyte-specific overexpressions of FSP1 were observed. LPS-induced glomerular TNF- $\alpha$  expression in FSP1.TG mice was significantly suppressed as compared with control wild mice. These results suggest that secreted FSP1 has renoprotective effects and plays a role in podocyte-mesangial crosstalk.

研究分野：腎臓内科

キーワード：FSP1 ポドサイト TLR4 治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

Fibroblast specific protein 1 (FSP1)は線維芽細胞特異的に発現する分子であり、線維芽細胞の形態維持や運動能に関与している。われわれは、腎間質線維化の進展に尿細管上皮細胞の FSP1 陽性線維芽細胞への形質変異(EMT)が重要な役割を果たすことを明らかにした (Iwano M, et al. J Clin Invest 2002, Iwano M, et al. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004, Iwano M, et al. Mol Ther 2001)。さらに、われわれは IgA 腎症患者の腎生検を用いた組織学的検討から、FSP1 陽性線維芽細胞数が IgA 腎症患者の予後を決定する最も重要な因子であることを明らかにした(Nishitani Y, Iwano M, et al. Kidney Int 2005, Harada K, Iwano M, et al. Nephrol Dial Transplant 2008)。また、hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)を中心とした低酸素応答が EMT と腎間質線維化を誘導することも明らかにした (Higgins DF, Iwano M, et al. J Clin Invest 2007, Kimura K, Iwano M, et al. Am J Physiol-Renal 2008)。これらの検討は間質領域を中心に実施しており、糸球体内の FSP1 発現については検討されていない。最近になり、われわれは糖尿病性腎症を含めた糸球体疾患において、糸球体障害の進展とともにポドサイトでの FSP1 の発現亢進が認められ、分泌型 FSP1 が尿中に検出されることを報告している(Yamaguchi Y, Iwano M, et al. Am J Kidney Dis 2009, Iwano M, et al. J Am Soc Nephrol, 2012)。

ポドサイトで産生された vascular endothelial cell growth factor (VEGF)は、糸球体基底膜内を拡散し、糸球体内皮細胞に発現した受容体(Flk-1)に結合して係蹄構造の維持に重要な役割を果たすと考えられている (N Engl J Med 358:1129-36, 2008)。すなわち、ポドサイトと内皮細胞間には細胞間相互作用の存在が示されているが、ポドサ

イトとメサンギウム細胞間の細胞間相互作用についての報告は極めて少ない。本研究では、ポドサイトで分泌された FSP1 が糸球体基底膜内を拡散し、メサンギウム細胞に対する生物活性を発揮するか否かを検討する。

## 2. 研究の目的

FSP1 は分泌蛋白としての生物活性も有している。ポドサイトから分泌される FSP1 の生物活性を検討する目的で、培養メサンギウム細胞へのリコンビナント FSP1 (rFSP1)添加実験を実施する。さらに生体内での FSP1 の役割を検討する目的で、FSP1 ノックアウトマウス(FSP1.KO)やポドサイト特異的に FSP1 を過剰発現した FSP1 トランスジェニックマウスを用いて実験腎炎を作製し、組織学的検討などを実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) rFSP1 の作製

FSP1 発現ベクターを導入した大腸菌を大量培養し、His Trap カラムおよび GST カラムを用いて rFSP1 を精製した。N 末端アミノ酸配列を解析し、rFSP1 であることを確認した。

### (2) 培養メサンギウム細胞に対する FSP1 の生物活性

培養メサンギウム細胞 (MC) を LPS (5ng/ml)で刺激し、誘導される TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 の蛋白発現量および RNA 発現量を、ELISA キットと real time PCR 法で測定した。rFSP1 (10  $\mu$ M)の添加により、これらのサイトカイン発現量の変動を検討した。

NF- $\kappa$ B の活性化はレポーターアッセイとウェスタンブロット法で、リン酸化 Akt の発現はウェスタンブロット法で検討した。

### (3) ポドサイト特異的 FSP1 過剰発現マウスにおける糸球体内 TNF- $\alpha$ 発現抑制

ポドサイトで FSP1 を過剰発現させたト

ランスジェニックマウスとコントロールマウスに LPS を腹腔内投与後 24 時間で、LCM 法を用いて糸球体を抽出し、TNF- mRNA 発現を検討した。また、血清クレアチニン値と尿アルブミン量を測定した。

#### (4) FSP1 遺伝子欠損によるアドリアマイシン腎症進展抑制効果

FSP1 ノックアウトマウスとコントロールマウスにアドリアマイシンを腹腔内投与後、2 週、4 週、および 6 週で採血と採尿を実施し、BUN と尿アルブミン量を測定した。6 週後に腎臓を摘出し、腎病理を検討した。

#### (5) 腎炎患者尿中単量体 FSP1 の測定

IgA 腎症患者 30 例、微小変化型ネフローゼ症候群患者 22 例、および半月体形成性腎炎患者 14 例の尿中単量体 FSP1 を、われわれが開発した測定キットを用いて測定した。

### 4 . 研究成果

#### (1) 培養細胞を用いた検討

分泌型 FSP1 は、メサンギウム細胞における LPS 誘導サイトカイン (TNF-、IL-6、MCP-1)mRNA 発現および分泌を容量依存的に有意に抑制した(図 1)。さらに FSP1 は、LPS 刺激したメサンギウム細胞における NFkB 活性を有意に抑制した(図 2、図 3)。また、メサンギウム細胞に FSP1 添加後 15 分でリン酸化 AKT の発現が誘導された(図 3)。

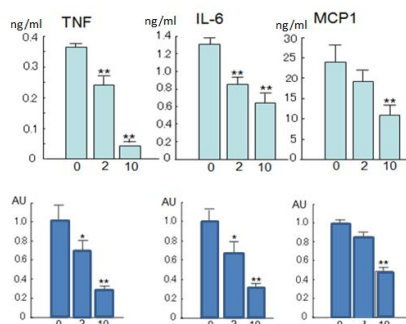


図 1 .FSP1 による LPS 誘導サイトカイン産生抑制

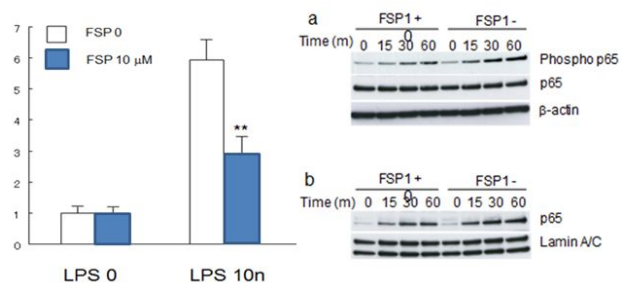


図 2 . FSP1 による NFkB 活性の抑制



図 3 . FSP1 によるリン酸化 AKT 誘導

#### (2) ポドサイト特異的 FSP1 過剰発現マウス (FSP1.TG)を用いた検討

LPS による糸球体内 TNF- mRNA 発現量は、FSP1.TG で Wild と比較し、有意に低下していた(図 4 a)。しかし、クレアチニン値と尿中アルブミン量は 両群間で差がなかった(図 4 b,c)。

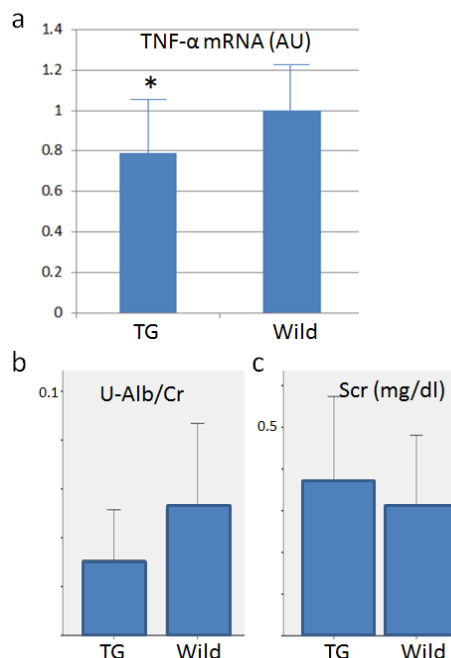


図 4 . FSP1.TG における LPS 腎炎の誘導

(3)FSP1 ノックアウトマウス(FSP1.KO)を用いた検討

FSP1.KOとWildマウスにアドリアマイシン腎症を発生させた。FSP1.KOでは、糸球体病変も間質病変も有意に改善していた(図5a)。BUNと尿中アルブミンも有意に改善していた(図5b,c)。

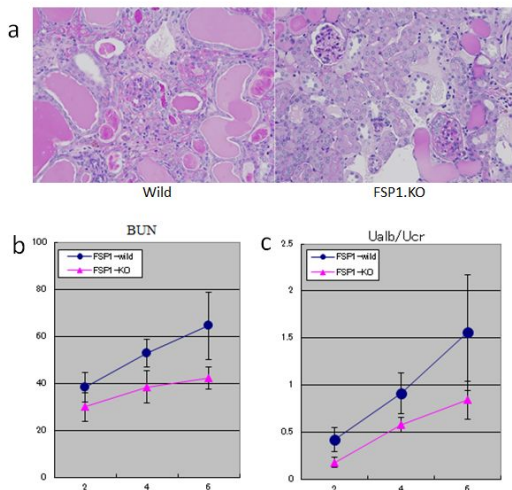


図5 .FSP1.KOにおけるアドリアマイシン腎症の誘導

#### (4)腎炎患者尿中単量体 FSP1 の測定

今回、われわれは単量体 FSP1 のみを測定する ELISA 測定系を開発し、腎炎患者の尿中単量体 FSP1 を測定した。半月体形成性腎炎患者では、IgA 腎症患者と微小変化型腎炎患者と比較して、有意に高い尿中単量体 FSP1 が検出された(図6)。

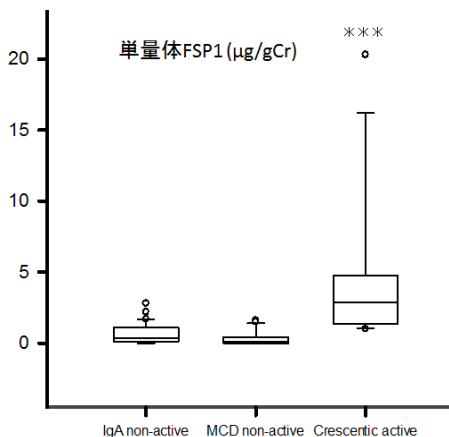


図6 .尿中単量体 FSP1

#### 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 11 件)

Kasuno K, Shirakawa K, Yoshida H, Mori K, Kimura H, Takahashi N, Nobukawa Y, Shigemi K, Tanabe S, Yamada N, Koshiji T, Nogaki F, Kusano H, Ono T, Uno K, Nakamura H, Yodoi J, Muso E, Iwano M. Renal redox dysregulation in AKI: application for oxidative stress marker of AKI. Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Dec 15;307(12):F1342-51. doi: 10.1152/ajprenal.00381.2013. 査読有り.

Kimura H, Mikami D, Kamiyama K, Sugimoto H, Kasuno K, Takahashi N, Yoshida H, Iwano M. Telmisartan, a possible PPAR- agonist, reduces TNF- -stimulated VEGF-C production by inhibiting the p38MAPK/HSP27 pathway in human proximal renal tubular cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov 14;454(2):320-7 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.077. 査読有り.

Nakatani K, Asai O, Sakan H, Yoshimoto S, Terada M, Nose M, Iwano M, Konishi N. Association between E-selectin expression and histopathological modification of glomerular lesions by non-nephritogenic IgM antibodies in experimental lupus nephritis. Mod Rheumatol. 2014 Sep;24(5):808-15. doi: 10.1002/iid3.6. 査読有り.

Moriya T, Suzuki Y, Inomata S, Iwano M, Kanauchi M, Haneda M. Renal histological heterogeneity and functional progress in normoalbuminuric and microalbuminuric Japanese patients with type 2 diabetes. BMJ Open Diabetes Res Care. 2014 Aug 8;2(1):e000029. doi: 10.1136/bmjdr-2014-000029. 査読有り.

Mikami D, Kimura H, Kamiyama K, Torii K,

Kasuno K, Takahashi N, Yoshida H, Iwano M. Telmisartan activates endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- and may have anti-fibrotic effects in human mesangial cells. *Hypertens Res*. 2014 May;37(5):422-31. doi: 10.1038/hr. 2013.157. 査読有り.

Ikeda S, Yamamoto H, Masuda M, Takei Y, Nakahashi O, Kozai M, Tanaka S, Nakao M, Taketani Y, Segawa H, Iwano M, Miyamoto K, Takeda E. Downregulation of renal type IIa sodium-dependent phosphate cotransporter during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Apr;306(7):F744-50. doi: 10.1152/ajprenal.00474.2013 査読有り.

Nakahashi O, Yamamoto H, Tanaka S, Kozai M, Takei Y, Masuda M, Kaneko I, Taketani Y, Iwano M, Miyamoto K, Takeda E. Short-term dietary phosphate restriction up-regulates ileal fibroblast growth factor 15 gene expression in mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2014 Mar;54(2):102-8. doi: 10.3164/jcfn.13-109. 査読有り.

Matsui M, Takeda Y, Uemura S, Matsumoto T, Seno A, Onoue K, Tsushima H, Morimoto K, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Samejima K, Kawata H, Kawakami R, Nakatani K, Iwano M, Saito Y. Suppressed soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014 Feb;85(2):393-403. doi: 10.1038/ki.2013.339. 査読有り.

Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y, Konishi N, Saito Y. Reduced renal -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PLoS One*. 2014 Jan

23;9(1):e86301. doi: 10.1371/journal.pone.0086301. eCollection 2014. 査読有り.

Harada K, Akai Y, Sumida K, Yoshikawa M, Takahashi H, Yamaguchi Y, Kubo A, Iwano M, Saito Y. Significance of renal biopsy in patients with presumed diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest*. 2013;4:88-93. doi: 10.1111/j.2040-1124.2012.00233.x 査読有り.

Hida Y, Hisada K, Shimada A, Yamashita M, Kimura H, Yoshida H, Iwasaki H, Iwano M. Rapid detection of the Mycobacterium tuberculosis complex by use of quenching probe PCR (geneCube). *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3604-8. doi: 10.1128/JCM.01654-12. 査読有り.

#### 〔学会発表〕(計 3 件)

糟野健司、岩野正之．新規尿中バイオマーカー．第 58 回日本腎臓学会学術総会 平成 27 年 6 月 5 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)

横井靖二、岩野正之、他．新規 TLR4 阻害因子・分泌型 FSP1 を介したポドサイトームサンギウム細胞連関．第 57 回日本腎臓学会学術総会 平成 26 年 7 月 6 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

森本勝彦、岩野正之、他．結節病変を有した糖尿病性腎症例における腎予後と臨床および病理組織学的指標との関連性．第 55 回日本腎臓学会学術総会 平成 24 年 6 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

#### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：腎炎の予防または治療剤

発明者：岩野正之

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-094919

出願年月日：平成 24 年 11 月 9 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.u-fukui.ac.jp/cont\\_about/outline/traffic.html](http://www.u-fukui.ac.jp/cont_about/outline/traffic.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

岩野 正之 (IWANO, Masayuki)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：20275324

### (2)研究分担者

木村 秀樹 (KIMURA, Hideki)

福井大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20283187

岡田 浩一 (OKADA, Hirokazu)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60233342

中谷 公彦 (NAKATANI, Kimihiko)

奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80398445