

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790999

研究課題名(和文) ループス腎炎におけるCaMKIVを介したポドサイトの機能解析

研究課題名(英文) Role of calcium/calmodulin kinase IV on podocyte function in lupus nephritis

研究代表者

一瀬 邦弘 (Ichinose, Kunihiro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60437895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ループス腎炎患者の腎生検組織における蛍光染色ではポドサイトにおけるNephrin発現は低下し、逆にCaMKIV発現は上昇していた。またCaMKIV mRNA発現は正常IgGに比してループス腎炎IgG刺激で有意に増加していた。またmicroarray解析では正常IgGに比してループス腎炎IgG刺激でCaMKIV発現が1.65349倍増強しており、Gene Ontology解析ではCaMKIVを含む細胞の活性化に関連する遺伝子群の発現が変化していた($P < 0.04711$)。ループス腎炎患者におけるCaMKIVを介したpodocyteの機能変化が示唆された。

研究成果の概要(英文)：T cell from patients with systemic lupus erythematosus display increased expression of calcium/calmodulin kinase IV (CaMKIV). CaMKIV expression was found increased in podocytes of Lupus nephritis(LN) kidney biopsy specimens. The levels of nephrin and CaMKIV correlated in an inverse manner. Interestingly, culture of AB8/13 podocytes in the presence of IgG from LN sera led to 1.5-fold increase in the expression of CaMKIV mRNA. Gene array analysis revealed that the expression of genes related to the cell activation including CaMKIV increased significantly ($P < 0.05$) and the regulation of neural precursor cell proliferation decreased significantly ($P < 0.01$) in podocytes treated with IgG from LN patients. Our data demonstrate increased expression of CaMKIV in LN podocytes which may represent the result of exposure to IgG. We suspect that increased CaMKIV expression may contribute to the inability of podocytes to maintain the integrity of glomerular basement membrane in LN patients.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス ループス腎炎 ポドサイト CaMKIV

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)に合併するループス腎炎は免疫学的異常を背景として過剰産生された自己抗体(抗DNA抗体)が免疫複合体を形成し、炎症性病変を引き起こす疾患である。ネフローゼ症候群では蛋白尿が出現する機序として、糸球体基底膜に存在する糸球体上皮細胞(podocyte)の構造的な変化やスリット膜構成蛋白であるnephrinやpodocinなどの発現異常に起因することが報告されているが、ループス腎炎ではその役割については明らかにされていない。ループス腎炎において、抗DNA抗体や炎症性サイトカイン発現が疾患活動性と一致することからpodocyteにも機能変化をもたらす可能性が想定され、ループス腎炎における蛋白尿のメカニズムの解決の糸口になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

たこ足細胞(podocyte)は、糸球体基底膜の外側に位置し高度に分化した細胞である。また、一次突起、足突起(二次突起)、足突起間のスリット膜からなる高次構造を保ちながら、血中からの高分子蛋白を防ぐ、分子篩として機能している。従って、Podocyteの高次構造異常は、病的蛋白尿の原因となり、糸球体糸球壁からの脱落やアポトーシスによる尿中podocyteの増加がネフローゼ症候群を来す腎炎で報告されている。蛋白尿の出現に関わるpodocyte障害の原因として(1)スリット膜複合体の障害、(2)足突起内のアクチン骨格の障害、(3)糸球体基底膜とpodocyte接合部の障害、(4)podocyteの陰性荷電障害の4つが考えられている。Ca/カルモジュリン依存性蛋白キナーゼIV(CaMKIV)は細胞の分化、分泌などの機能に関わる細胞内分子であり、細胞刺激で活性化されることによって細胞質から核内に移行し、転写を制御するキナーゼである。CaMKIVは核内に移行後、CREB(=cAMP response element binding protein)に作用し、cAMPに応答する認識配列(CRE)に結合し、プロモーターを活性化させる。またCaMKIVがAP-1(=activator protein 1)などのその他の転写因子の活性化にも関与することも報告されている(J Exp Med. 1996;184:101-112)。我々は次に掲げる報告から本研究を着想するに至った。

(1)SLEにおいて患者T細胞の核内におけるCaMKIV発現が亢進している(J Clin Invest 115:996-1005.)。

(2)SLEモデルマウスMRL/lpr由来のメサンギウム細胞から産生されるIL-6はCaMKIV依存性でAP-1を介し、レギュレーションされる。

(3)MRL/lprマウスにCaMKIV阻害薬KN-93を投与すると、蛋白尿の軽減とループス腎炎の進展抑制効果がみられた。

(4)びまん性増殖性ループス腎炎患者の糸球

体ではpodocyteのスリット膜構成蛋白であるnephrinの発現が低下している(Lupus 2011;20:781-791)。

(5)CaMKIVと類似点のあるカルシニューリン(Ca/カルモジュリン依存性の脱リン酸化酵素)の阻害薬であるシクロスポリンはpodocyteにおけるアクチン細胞骨格に作用し、蛋白尿の軽減効果を有する(Nat Med 2008;14:931-938)。

以上の点から、ループス腎炎においてもpodocyteにおけるnephrin,podocinなどのスリット膜構成蛋白や細胞形態維持に関与するとされるpodocalyxinの機能変化が想定され、CaMKIVの活性化がその機能変化に寄与している可能性があると考えた。

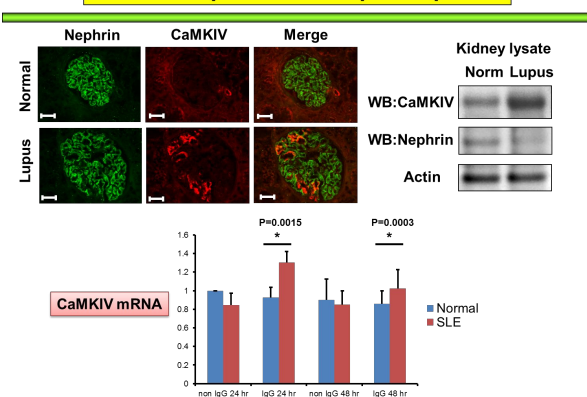
3. 研究の方法

ヒトの腎生検組織やpodocyte cell lineを用いた基礎的検討 SLEの腎生検組織の標本で糸球体内のpodocyte特異的に発現するnephrin染色を行い、CaMKIVとの二重染色でループス腎炎のpodocyteにおけるCaMKIVの発現変化を調べる。Podocyteは高度に分化した細胞であることから増殖しにくく、ヒトのループス腎炎におけるprimary cell培養の確立が困難な細胞である。そこで我々はヒトのpodocyte cell lineをProf. Moin A. Saleem(J Am Soc Nephrol 2002;13:630-638)に供与いただき、SLEの疾患活動性と関連のある抗DNA抗体などで細胞を刺激し、CaMKIVの発現変化および細胞内分布についてを検討する。

4. 研究成果

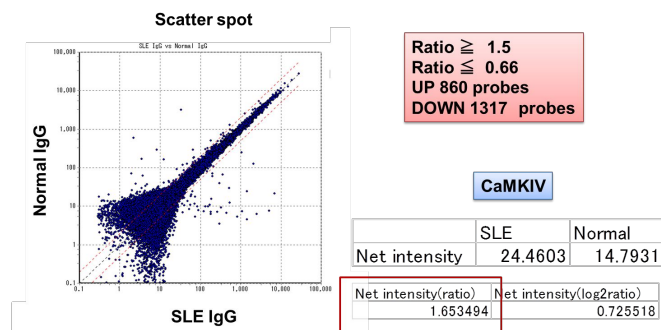
正常コントロールとループス腎炎における腎生検組織におけるNephrinおよびCaMKIV発現を蛍光染色にて検討した。また正常人およびループス腎炎患者の血清からIgGを分離し、IgGをpodocyteとともに24-48時間インキュベートして、podocyteに発現しているCaMKIV mRNA発現変化、microarray解析にてCaMKIVに関連する遺伝子発現解析を行った。その結果、ループス腎炎患者の腎生検組織における蛍光染色ではpodocyteにおけるNephrin発現は低下し、逆にCaMKIV発現は上昇していた。またCaMKIV mRNA発現は正常

CaMKIV expression in lupus nephritis



IgG に比してループス腎炎 IgG 刺激で有意に増加していた。

Gene array analysis



CodeLink™ Human Whole Genome BioArray

また microarray 解析では正常 IgG に比してループス腎炎 IgG 刺激で CaMKIV 発現が 1.65349 倍増強しており、Gene Ontology 解析では CaMKIV を含む細胞の活性化に関連する遺伝子群の発現が変化していた (P<0.04711)。

ループス腎炎患者における CaMKIV を介した podocyte の機能変化が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

ループス腎炎における Calcium/calmodulin dependent kinase protein type IV のポドサイト機能に対する影響(第2報)

一瀬邦弘, 牛草健, 梅田雅孝, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 中村英樹, 折口智樹, 川上純

第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2014 年 4 月 25 日~2014 年 4 月 27 日(東京・グランドプリンス新高輪本館及び国際館パミール)

Role of calcium/calmodulin kinase IV on podocyte function in lupus nephritis

Kunihiro Ichinose, Takeshi Ushigusa, Tomohiro Koga, George C.Tsokos, Atsushi Kawakami

The ACR/ARHP 2013 Annual Meeting 2013 年 10 月 25 日~10 月 30 日(San Diego, CA, USA)

ループス腎炎における Calcium/calmodulin dependent kinase protein type IV のポドサイト機能に対する影響

一瀬邦弘, 牛草健, 川上純

第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~2013 年 5 月 12 日(東京・東京国際フォーラム)

Role of calcium/calmodulin kinase IV on podocyte function in lupus nephritis

Kunihiro Ichinose, Takeshi Ushigusa, Tomohiro Koga, George C.Tsokos, Atsushi Kawakami

Immunology 2013 2013 年 5 月 3 日~5 月 7 日 (Honolulu, HI, USA)

ループス腎炎における Calcium/calmodulin dependent kinase protein type IV のポドサイト機能に対する影響

一瀬邦弘, 牛草健, 梅田雅孝, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 中村英樹, 折口智樹, 川上純

第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2013 年 4 月 18 日~2013 年 4 月 20 日(京都・国立京都国際会館)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 邦弘 (Kunihiro Ichinose)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開
医療科学講座(第一内科)・助教
研究者番号: 60437895

(2) 研究分担者

川上 純 (Astushi Kawakami)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開
医療科学講座(第一内科)・教授
研究者番号: 90325639

中村 英樹(Hideki Nakamura)

長崎大学病院第一内科・講師
研究者番号： 10437832

岩本 直樹(Naoki Iwamoto)
長崎大学病院第一内科・助教
研究者番号： 80437897

(3)連携研究者

古賀 智裕(Tomohiro Koga)
長崎大学病院第一内科・助教
研究者番号： 90537284