

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：86202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461613

研究課題名(和文)小児CKD新規治療法開発のための間質線維化での接着分子Hic-5の役割と機能解析

研究課題名(英文)Assessment for the role and function of Hic-5 in renal fibrosis for the development of treatment in pediatric chronic kidney disease

研究代表者

近藤 秀治 (Kondo, Shuji)

独立行政法人国立病院機構四国こどもととなの医療センター(臨床研究部(成育)、臨・小児科・診療部長)

研究者番号：00380080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児慢性腎臓病において、先天性腎尿路奇形/異常、遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患は治療戦略上重要であり、治療法開発には線維化をターゲットとした研究を行う必要がある。線維化でみられる細胞障害、細胞増殖や細胞外基質蓄積に関してHic-5の役割を解明し新たな治療戦略を検討することが目的である。成果として、ヒト及びマウスの腎線維化とHic-5の発現の関連性が示唆された。Hic-5の細胞増殖抑制作用は、急性期の細胞増殖を改善させるが、その一方で、慢性病変においては、糸球体の線維化・硬化を誘導・促進させる分子である可能性が示された。成果の一部をPLoS One (2015,10:e0122773)に報告した。

研究成果の概要(英文)：Congenital anomalies of the kidney and urinary tract, genetic kidney diseases, and cystic kidney diseases are important diseases for the development of the current therapeutic strategy in pediatric chronic kidney diseases. To develop the novel treatment, the research for renal fibrosis is required. The purpose of the study is to assess the role of Hic-5 on cell injury, proliferation, and accumulation of extracellular matrix in renal fibrosis. The results we obtained are the possible relationship between Hic-5 expression and renal fibrosis in kidney diseases in the human beings and mice. In addition, we demonstrated that the growth inhibitory effect of Hic-5 might improve cell proliferation in acute phase, in contrast, induce fibrosis and sclerosis in chronic phase. A part of the results has been reported in the journal, PLoS One (2015, 10:e0122773).

研究分野：小児腎臓病

キーワード：腎尿細管間質 細胞増殖 線維化 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD)は、進行すると血液および腹膜透析療法や腎移植を要し、健康と医療経済に影響を及ぼす重要な疾患である。学校検尿による小児CKDの早期発見と治療法の進歩とともに従来小児末期腎不全の主要原因とされた糸球体疾患の割合は減少し、治療戦略上重要な疾患は、先天性腎尿路奇形/異常 (CAKUT)、遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患へと変遷しつつある。これらの疾患は小児期に透析導入患者の原因疾患の上位を占めていること (Pediatric Nephrol 17:456,2002)、小児の透析導入前の腎不全患者の約9割が非糸球体性疾患である報告から明らかとなっている (Nephrol Dial Transplant 28:2345, 2013)。従って、小児CKDの腎予後を改善させる手段は、CAKUT、遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患の治療法を開発することである。現在原因遺伝子を特定し、その分子の役割を明らかにする研究が精力的に行われている反面、透析医療や腎移植を目前にしている患者は、これらの研究と並行して即戦力となりうる治療法を開発を期待している。

従来我々が進行性糸球体疾患において糸球体硬化への進展抑制を目標として行ったレニンアンジオテンシン系を介する線維化のメカニズム解析とその阻害治療の基礎的研究の成果 (Kondo S; JASN 17:783,2006)は、最近の降圧剤による腎保護を目的とした臨床研究の成果に還元され、即戦力としての腎疾患治療法開発に役立ったと考えている。今回は、CAKUT、遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患、難治性糸球体疾患等、全ての小児CKDが共通して陥る線維化をターゲットにおくことで、即戦力としての成果が得られる基礎的研究を進めることを考えている。

## 2. 研究の目的

現在の小児慢性腎臓病 (CKD)の治療戦略上重要な疾患は、先天性腎尿路奇形/異常 (CAKUT)、遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患である。これらの疾患の治療法の開発には、進行期の共通病理像である線維化をターゲットとした基礎的研究を行い、新規治療法を検討する必要がある。我々は、TGF- $\beta$ が誘導する接着斑蛋白 Hic-5 に関して、糸球体疾患の慢性病変形成への関与に関する研究を行ってきた。しかし Hic-5 を含めた細胞接着分子の役割を十分明らかにできていない。本研究の目的は、線維化でみられる、細胞障害、細胞増殖や細胞外基質蓄積に関して Hic-5 の役割やシグナル伝達機構を解明し、これらの基礎的研究成果をもとに、新たな薬剤開発への治療戦略を創出することである。

## 3. 研究の方法

ヒト及びマウス間質線維化病変 (片側尿管結紮)における Hic-5 の免疫組織化学的検討  
間質線維芽細胞と尿細管細胞の樹立と培養系の確立

接着分子 Hic-5 の細胞 (機能への役割解析 (増殖試験、遊走能試験、細胞接着能試験、ECM 蛋白合成能試験、インテグリン発現解析) 細胞接着斑シグナル伝達解析  
遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患の動物モデルを用いた Hic-5 の役割解析

## 4. 研究成果

「3. 研究の方法」で示した、5つの項目について、成果と成績を報告する。

ヒト及びマウス間質線維化病変 (片側尿管結紮)における Hic-5 の免疫組織化学的検討  
間質線維化病変形成モデルを作成し、組織病変を検討するために、12週齢の野生型 (Hic-5+/+; C57BL6) および Hic-5 遺伝子欠損 (Hic-5-/-) マウスの左側尿管を結紮し、尿細管間質線維化病変形成モデルを作成した。この病変の作成により、先天性腎尿路奇形/異常 (CAKUT)、遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患の進行期の共通病理像である尿細管間質の線維化を解析することが可能となった。このモデルマウスに関して、尿管結紮後 0, 3, 7, 14 日で左側腎と対象の右腎を採取した。このモデルマウスでは、腎盂の拡大が主要病変であるものの、間質の線維化は、0, 3, 7, 14 日と経過とともに線維化の進行が促進されていた。線維化の進行とともに、間質型の細胞外基質の発現の増加が認められた。また、Hic-5 の発現に関して、間質の線維化領域に認められた。

間質線維芽細胞と尿細管細胞の樹立と培養系の確立

間質の線維芽細胞と尿細管細胞の樹立に関して研究を推進した。研究期間中、マウスからの細胞の樹立は困難であった。これは、線維芽細胞や尿細管細胞の不死化とクローニ化を行うことで、細胞が本来所有する特異的機能の維持等が困難であることが判明したからである。しかし、これらの細胞樹立の研究の推進によって、間質線維芽細胞や尿細管細胞の表現系解析、機能解析に関する技術や知識が蓄積し、今後の研究を推進するために重要な基礎力・応用力を獲得できた。そのため、今回の以降の研究に関しては、我々が確立しているメサンギウム細胞を用いて Hic-5 が線維化形成に関わる研究を行う方針とした。

接着分子 Hic-5 の細胞

慢性腎臓病 (CKD)における細胞増殖から線維化 (硬化) への進展に関わる Hic-5 の役割を明らかにするために、Hic-5 遺伝子欠損 (Hic-5-/-) マウスを用いて動物実験及び培養細胞実験を行った。得られた結果は以下の通りである。

1) 8週齢雄の Hic-5+/+ 及び Hic-5-/- マウスにハブ毒を投与し増殖性糸球体腎炎を作成したところ、腎炎惹起7日目で Hic-5+/+ 腎炎マウスは糸球体細胞増殖と細胞外基質の増加を示した。Hic-5-/- 腎炎マウスは Hic-5+/+ 腎炎マウスと比較して、糸球体細胞数、細胞

外基質のさらなる増加を認めた。

2) 糸球体内のアポトーシス細胞数、増殖因子(PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1)の糸球体内での発現、及びPDGF受容体とTGF- $\beta$ 1受容体の糸球体発現は、Hic-5+/+マウスとHic-5-/-マウスの間で有意な変化は無かった。また、Hic-5+/+及びHic-5-/-マウスのメサンギウム細胞を樹立して、これらのパラメーターを検討したが変化はみられなかった。

3) Hic-5+/+及びHic-5-/-マウスのメサンギウム細胞をPDGF-BBやTGF- $\beta$ 1で刺激するとHic-5+/+細胞の細胞増殖に比してHic-5-/-細胞はより強く細胞増殖した。

4) PDGF-BBやTGF- $\beta$ 1による増殖因子刺激下でHic-5-/-細胞はHic-5+/+細胞に比して、サイクリンD1の発現増強やp21蛋白発現抑制を示したことから、Hic-5は細胞周期関連蛋白の発現を変化させて細胞増殖を抑制していると考えられた。

以上の結果は、Hic-5の発現自体がアポトーシスや増殖因子発現とは関係無く、増殖性糸球体腎炎の細胞増殖を制御することを示唆していると考えられた。本研究成果は、Hic-5の細胞増殖抑制作用は、急性期の細胞増殖に関しては改善を示す一方で、慢性病変形成においては、細胞増殖を抑制することで線維化病変である糸球体硬化をHic-5が誘導促進する分子である可能性を示した。

細胞接着斑シグナル伝達解析

上記細胞機能解析においては細胞増殖への影響はみられたものの、遊走能試験、細胞接着能試験、ECM蛋白合成能試験、インテグリン発現解析においてはHic-5の影響はみられなかった。細胞増殖へのHic-5の作用に関しては細胞周期関連蛋白への発現変化に繋がっていたことから、シグナル解析は、MAPキナーゼなど増殖シグナル分子などが関与する可能性が示唆された。これらの成果は、現在さらに解析中である。

遺伝性腎疾患、嚢胞性腎疾患の動物モデルを用いたHic-5の役割解析

これらのモデルも作成中であり、の間質線維化病変形成への解析の結果とシグナル解析を関連づけて、さらに発展させて行く方針である。

以上、本研究費をもとに、Hic-5の線維化や糸球体硬化に果たす役割解明やその成果を基とした治療法開発に繋がる可能性がある知見が得られつつあり、今後の成果の発信に向けさらに解析を進めて行く方針である。

以上の成果の一部を、PLoS One (2015, 10:e0122773)に報告した。

## 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 14 件)

Yuzawa Y, Yamamoto R, Takahashi K, Katafuchi R, Tomita M, Fujigaki Y,

Kitamura H, Goto M, Yasuda T, Sato M, Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Yasuda Y, Komatsu H, Takahara M, Harabuchi Y, Kimura K, Matsuo S: Evidence-based clinical practice guidelines for IgA nephropathy 2014. Clin Exp Nephrol. 査読有, 2016, 20, 511-535. DOI:10.1007/s10157-015-1223-y

Nagai T, Urushihara M, Kinoshita Y, Jamba A, Kondo S, Kagami S: Differential regulation of angiotensin II-induced extracellular signal regulated kinase-1/2 and -5 in progressive glomerulonephritis. Nephrology (Carlton). 査読有, 2016, 21, 950-958. DOI: 10.1111/nep.12685

Hirano M, Satake W, Ihara K, Tsuge I, Kondo S, Saida K, Betsui H, Okubo K, Sakamoto H, Ueno S, Ikuno Y, Ishihara R, Iwahashi H, Ohishi M, Mano T, Yamashita T, Suzuki Y, Nakamura Y, Kusunoki S, Toda T: The first nationwide survey and genetic analyses of Bardet-Biedl Syndrome in Japan. PLoS One. 査読有, 2015, 10:e0136317. DOI:10.1371/journal.pone.0136317

Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A, Kagami S: Hydrogen peroxide-inducible clone-5 regulates mesangial cell proliferation in proliferative glomerulonephritis in mice. PLoS One. 査読有, 2015, 10:e0122773. DOI:10.1371/journal.pone.0122773

Urushihara M, Nagai T, Kinoshita Y, Nishiyama S, Suga K, Ozaki N, Jamba A, Kondo S, Kobori H, Kagami S: Changes in urinary angiotensinogen posttreatment in pediatric IgA nephropathy patients. Pediatr Nephrol. 査読有, 2015, 30:975-982. DOI:10.1007/s00467-014-3028-8

Inoue N, Watanabe H, Okamura K, Kondo S, Kagami S: Are the equations for the creatinine-based estimated glomerular filtration rate applicable to the evaluation of renal function in Japanese children and adult patients receiving chemotherapy? Clin Exp Nephrol. 査読有, 2015, 19:298-308. DOI: 10.1007/s10157-014-0976-z

Kaku Y, Ohtsuka Y, Komatsu Y, Ohta T, Nagai T, Kaito H, Kondo S, Ikezumi Y, Tanaka S, Matsumoto S, Sako M, Tsuruga K, Nakanishi K, Kamei K, Saito H, Fujinaga S, Hamasaki Y, Chikamoto H, Ishikura K, Iijima K. Clinical practice guideline for pediatric idiopathic nephrotic syndrome 2013: general therapy. Clin Exp Nephrol. 査読有, 2015,

19:34-53.D0I:10.1007/s10157-014-1031-9

Ishikura K, Matsumoto S, Sako M, Tsuruga K, Nakanishi K, Kamei K, Saito H, Fujinaga S, Hamasaki Y, Chikamoto H, Ohtsuka Y, Komatsu Y, Ohta T, Nagai T, Kaito H, Kondo S, Ikezumi Y, Tanaka S, Kaku Y, Iijima K. Clinical practice guideline for pediatric idiopathic nephrotic syndrome 2013: medical therapy. Clin Exp Nephrol. 査読有, 2015, 19:6-33.D0I:10.1007/s10157-014-1030-x

益岡壮太、近藤秀治、岡田隆文、横山明人、岩井艶子、岩井朝幸、横田一郎：鼻出血を契機にループスアンチコアグラント・低プロトロンビン血症と診断したSLE 日本小児科学会雑誌, 査読有, 2016, 120, 1502-1507.

近藤秀治：学校検尿と小児の慢性腎臓病(CKD) 四国こどもとおとなの医療センター医学雑誌, 査読有, 2016, 3, 9-17.  
江口啓意、近藤秀治：RF 陽性多関節型若年性特発性関節炎の女児例～若年性特発性関節炎初期診療の手引き 2015 に基づく治療の再考 四国こどもとおとなの医療センター医学雑誌, 査読有, 2016, 3, 57-60.

藤岡啓介, 清水真樹, 伊藤敏恭, 竹廣敏史, 市原朋子, 藤井笑子, 坂口善市, 木下ゆき子, 漆原真樹, 近藤秀治, 香美祥二, 幸山洋子:補体の沈着を認めなかったPLA2R陽性特発性膜性腎症の1例 日本小児腎臓病学会雑誌, 査読有, 2016, 29, 33-38.

近藤秀治, 木下ゆき子, 香美祥二:【小児疾患診療のための病態生理 2 改訂第5版】腎・泌尿器疾患 膜性増殖性糸球体腎炎 小児内科, 査読無, 2015, 47, 507-510.

松尾清一, 木村賢治, (近藤秀治, 香美祥二, 含)他, 厚労省科研「進行性腎障害に関する調査研究」エビデンスに基づくIgA腎症診療ガイドライン作成分科会エビデンスに基づくIgA腎症診療ガイドライン 2014 日本腎臓学会雑誌, 査読有, 57, 5-137.

[学会発表](計 10 件)

シンポジウム<国際学会>

Kondo S: <SYMPOSIUM “Pediatrics”> Pediatric chronic kidney disease in Japan. -The current standards and future challenges- The 9th Kure International Medical Forum (K-INT). 2016年7月21日-24日, Kure, Japan.

一般演題<国際学会>

Urushihara M, Nagai T, Kondo S, Ikeda Y, Tamaki T, Kagami S: (Pro)renin receptor-mediated ERK1/2 and wnt signaling pathway in crescent

glomerulonephritis. The American Society of Nephrology Kidney week 2016. 2016年11月15日-20日, Chicago, IL, USA.  
Kondo S: Annual urinary screening at school children and pediatric chronic kidney disease in Japan. The 17th Annual Pediatric Meeting of National Child Health 2016. 2016年6月22日-24日, Bangkok, Thailand.

Kondo S, Eguchi H, Yokoyama A, Kirino T, Iwai T, Yokoi H, Ishimaru M, Mizutani T, Nakamura M, Iwai A: A case of juvenile systemic lupus erythematosus (SLE)-myositis overlap syndrome with macrophage activation syndrome (MAS). Asian Medical Conference on Child health in Kagawa 2015. 2015年7月31日-8月2日, Zentsuji, Japan.

Kondo S, Jamba A, Nagai T, Kinoshita Y, Urushihara M, Kagami S: Hic-5 controls mesangial cell proliferation in proliferative glomerulonephritis in mice. 7th Europaediatrics. 2015年5月13-16日, Florence, Italy.

Nagai T, Furumoto T, Jamba A, Kinoshita Y, Urushihara M, Kondo S, Kagami S: The case of a 6-year-old boy with systemic lupus erythematosus complicated by membranous lupus nephritis and finger toe necrosis. XII Asian Congress of Pediatric Nephrology. 2014年12月4日-6日, New Delhi, India.

Urushihara M, Kondo S, Kobori H, Tamaki T, Kagami S: Urinary angiotensinogen as a specific biomarker of intrarenal renin-angiotensin system status associated with glomerular injury in pediatric IgA nephropathy patients. Kidney Week 2014. 2014年11月11日-16日, Philadelphia, PA, USA.

Jamba A, Kondo S, Nagai T, Urushihara M, Tamaki T, Kagami S: Hic-5 regulates mesangial cell proliferation via altered and coordinated expression of cell cycle-related protein. Kidney Week 2014. 2014年11月11日-16日, Philadelphia, PA, USA.

Jamba A, Kondo S, Urushihara M, Nagai T, Kim-Kaneyama J, Miyazaki A, Kagami S: The Role of Hic-5 on Mesangial Cell Proliferation in Proliferative Glomerulonephritis in Mice. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. 2014年5月14日-17日, Tokyo, JAPAN.

[図書](計 3 件)

近藤秀治、漆原真樹他：南江堂、シンプル小児科学 香美祥二編, 第13章 腎泌尿器・生殖器疾患 2016(初版). 358(257-283)

近藤秀治：パリュメディカル，徳島大学病院の最新治療がわかる本，徳島大学病院編著，2015(初版)．208(118-119)

近藤秀治：医学書院，今日の小児治療指針 第16版，腎・泌尿器疾患 急性糸球体腎炎，2015(第16版)．1006(612-613)

〔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

- 国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター

<http://shikoku-med.jp>

- 徳島大学医学部小児科

<http://www.tokudai-pediatrics.net/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 秀治 (KONDO, Shuji)  
独立行政法人国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター 臨床研究部(成育) 臨床研究部長、小児科・診療部長  
研究者番号：00380080

### (2) 研究分担者

香美 祥二 (KAGAMI, Shoji)  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：00224337

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：