

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19463

研究課題名(和文)ネフリン障害性巣状糸球体硬化症マウスモデルにおけるボーマン囊前駆細胞の解析

研究課題名(英文)Anti nephrin antibody induced FSGS model in C57Bl/6 mice and affect parietal epithelial cells

研究代表者

内藤 正吉(Naito, Shokichi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：40365101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が樹立したネフリン抗体誘導性FSGSモデルにおいて、ボーマン囊壁細胞(parietal epithelial cells: PECs)が1)上皮間葉転換を呈する、2)糸球体硬化病変進行に寄与するpERK1/2が発現、3)ごく少数のTransitional cell(TC)が出現、することを確認した。この結果は抗体特異的なポドサイト障害によるFSGSで、少数ではあるがポドサイト前駆細胞と考えられるTCが出現することを初めて証明したものである。さらに、本研究により、ネフリン機能維持及びFSGSの予防および治療効果に重要な役割を持つ分子を確認し、更なる研究を遂行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、慢性腎臓病の原因となるポドサイト障害の新規治療標的と考えられているボーマン囊前駆細胞の存在を、抗体を用いたポドサイト特異的障害モデルで初めて証明したものである。さらに、申請者らが樹立したこのモデルは、多くの遺伝子改変マウスに用いられているC57Bl/6マウスで誘導可能なことが証明できた。さらに、本研究では、ポドサイト障害の新規予防・治療法開発のための標的分子を発見できたため、現在ポドサイト障害の病態解明および新規治療・予防法開発の研究を遂行中である。これにより今後、国民の健康および経済面で重大な問題となっている血液透析患者数減少への途を拓くものとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used our new anti-nephrin antibody induced FSGS model. In this model, podocyte injury affect Bowman's epithelial cells (PECs) phenotype, 1) epithelial-mesenchymal transformation, 2) pERK1 / 2 activation, which progress to the glomerulosclerosis, and 3) a few Transitional cells (TCs) appeared. These results are first finding that antibody-induced podocyte injury affects PECs phenotype and appearance of TCs that are considered as podocyte progenitor cells. Furthermore, this study has identified the molecule that play an important role in the maintenance of nephrin function and the preventive and therapeutic effects of FSGS.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト FSGS ボーマン囊壁細胞 ネフリン

1. 研究開始当初の背景

1) ポドサイトとポーマン嚢壁細胞(PECs)

国民の健康に大きな問題となっている慢性腎不全は糸球体硬化症を特徴する。これまで、ポーマン嚢壁細胞(parietal epithelial cells: PECs)は半月体形成や糸球体硬化病変と関係し、糸球体障害を増悪させると考えられていた。最近、PECs が前駆細胞として働きポドサイトを補充するとする報告が相次ぎ、糸球体障害の進行を抑える新たな治療戦略として注目を集めている。(Nat Rev Nephrol 10; 2014)。しかし、イムノトキシン誘導性トランスジェニック (NEP25) マウスでポドサイトを傷害した際は、PECs 前駆細胞が存在しなかったため(NDT 29; 2014)、ポドサイト障害が PECs 前駆細胞を誘導するのか、またその詳細な機序は何か、未だ不明である。

2) アドリアマイシン腎症の問題点

申請者らは最近、SM22 が半月体形成性腎炎において PECs に及ぼす影響を報告した (Naito, BMC Nephrology 15; 2014)。しかし、SM22 KO マウスは C57BL/6 マウスを用いて作成されたため、代表的なマウスポドサイト障害モデルである Adriamycin 腎症を用いることができず(図1)、ポドサイト障害が PECs 前駆細胞に与える役割を評価できなかった。

図1:従来のFSGSのマウスモデル

分類	モデル	利点	欠点
薬剤性	アドリアマイシン腎症	薬剤のみで誘導できる Balb/cで発症する	多臓器への影響が不明 C57BL/6などの系統では発症しない
抗体	抗糸球体抗体	抗体のロットにより FSGS病変を呈する	ポドサイトのみを傷害するか不明
	抗ポドサイト抗体	ポドサイトのみを障害	抗原が不明である
その他	NEP25 マウス	ポドサイトのみを傷害	トランスジェニックマウスを用いた研究ではかけ合わせが必要

3) 抗ネフリン抗体障害性巣状糸球体硬化症モデルマウスの樹立

2)であげた問題を解決するため、申請者らは遺伝子免疫法を用いたネフローゼ症候群モデル動物の開発を行ってきた(NDT 21; 2006, CEN 215; 2011、等)。これらの技術を応用し、正常 C57BL/6 マウスを用いた抗ネフリン抗体障害性巣状糸球体

硬化症モデルマウスを樹立した。そこで、本研究では、ポドサイト傷害が PECs に与える影響を評価し、ポドサイト障害で PECs 前駆細胞が誘導されることを示すことで、新たな治療戦略の研究への道を拓くことを目的とする。

2. 研究の目的

本申請研究では、マウスネフリン抗体によるポドサイト障害が腎病変および PECs 前駆細胞に与える影響を検討する。

- 1) ポドサイト障害の結果起こるポドサイト数の変化および糸球体硬化病変を解析
- 2) ポドサイト障害が PECs の細胞増殖や上皮間葉移行に与える影響を解析
- 3) ポドサイト障害の結果、PECs 前駆細胞が誘導されることを解析。

3. 研究の方法

本申請研究ではネフリン障害性巣状分節状硬化症モデルマウスの病態誘導を確認した後、免疫組織染色を用いた評価を行う。

遺伝子免疫法を用いて作成した抗マウスネフリン抗体を作製

マウスネフリン遺伝子/pAP3neo、および pAP3neo プラスミド DNA を、遺伝子銃法を用いてウサギに免疫する。免疫 10 週目に全血採血し、得られた血清を硫酸ナトリウム沈殿することで、抗マウスネフリン抗体を得る。

抗ネフリン抗体障害性 FSGS モデルマウスの誘導

で得た抗体 4mg を C57BL/6 マウスに静注する。免疫前、免疫 7、14 週後に血清・尿検体を

採取。

糸球体硬化病変の評価と上皮細胞数の変化

PAS 染色による糸球体硬化病変の評価、およびポドサイトマーカー(WT1)染色による糸球体上皮細胞数を計測

PECs 細胞数の変化

PAX2(PECs マーカー)染色による PECs 細胞数およびの計測

PECs 前駆細胞としての Transitional cell (ポドサイトマーカー(シナプトポジン)と PECs マーカー(PAX2)の両方を発現する細胞)の確認

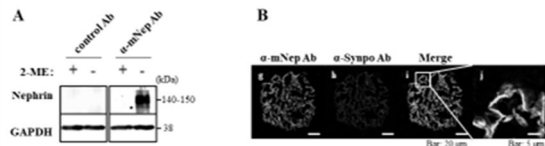
ポドサイト障害が PECs に与える影響として、細胞増殖(Ki67 染色)・上皮間葉移行(SMA 染色)・pERK 発現の程度を評価

4. 研究成果

1) 遺伝子免疫法を用いて作成した抗マウスネフリン抗体を作製

マウスネフリン遺伝子/pAP3neo を金粒子に付着させ、遺伝子銃法を用いてウサギに免疫して得たウサギ抗ネフリンポリクローナル抗体(α-mNep Ab)を得た。作成した α-mNep Ab は、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色、細胞染色に使用可能であった(右図)。

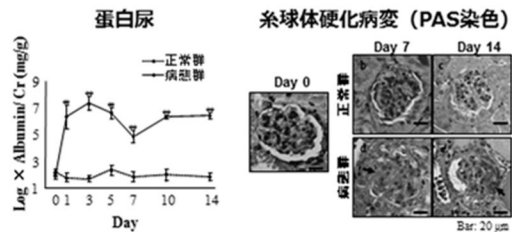
作成した抗ネフリン抗体(α-mNep Ab)は、糸球体ポドサイト上に発現するシナプトポジン(Synpo)と共発現するネフリンを認識した。



2) 抗ネフリン抗体障害性 FSGS モデルマウスの誘導

4.-1) で作成した α-mNep Ab を C57Bl/6 マウスに尾静脈注射により投与したところ、投与1週間後から蛋白尿および糸球体硬化病変が誘導された(右図)。

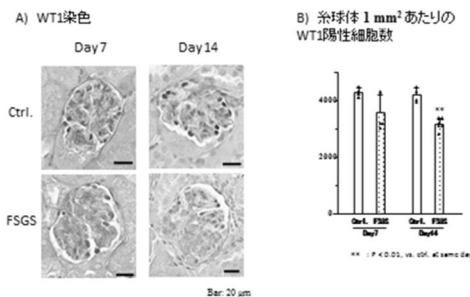
抗ネフリン抗体障害性FSGSモデルで、蛋白尿および糸球体硬化病変を確認した



3) 糸球体上皮細胞数の変化

4.-2) で誘導された抗ネフリン抗体障害性 FSGS モデルマウスでは、ポドサイトマーカーである WT1 陽性細胞数が減少した(右図)。

抗ネフリン抗体により糸球体ポドサイト数は減少。



4.-1-3) で検討した結果は、*Nephron Exp. Nephrol.* 2018; 138, 71-87. で報告した。

4) PECs 細胞数の変化

4.-2) で誘導された抗ネフリン抗体障害性 FSGS モデルマウスでは、PECs マーカーである PAX2 陽性細胞数が増加した(次頁右図)。

5) PECs 前駆細胞としての Transitional cell の確認

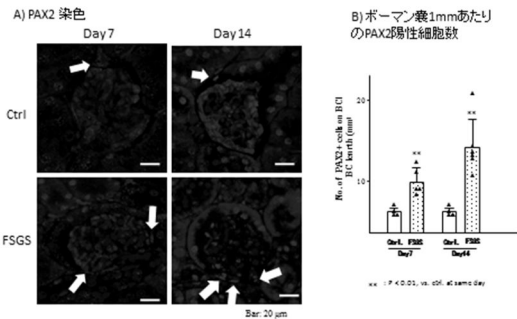
抗ネフリン抗体 FSGS モデルでは、ごく少数ではあるが、ポドサイトマーカーと PECs マーカーの両方を発現する Transitional cell の誘導を確認した。

6) ポドサイト障害が PECs に与える影響として、細胞増殖(Ki67 染色)・上皮間葉移行 (SMA 染色)・pERK 発現の程度を評価

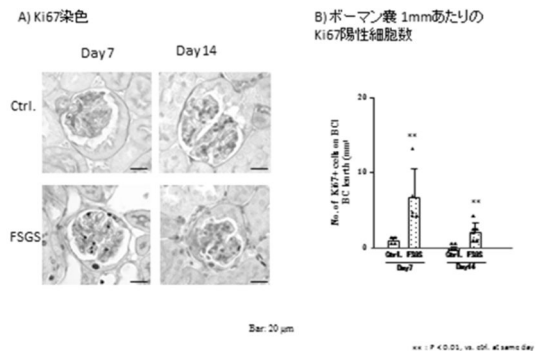
抗ネフリン抗体 FSGS モデルでは、ボーマン嚢上に存在する PECs の細胞増殖が亢進しており (右図) PECs における SMA・pERK の発現亢進も認められた。

さらに、本研究結果を基に抗ネフリン抗体障害性 FSGS モデルの *in vivo* および *in vitro* の解析をすすめ、ポドサイト細胞膜上に発現する分子 GM3 がポドサイト障害による慢性腎疾患の新たな予防・治療標的となりうることを確認し、特許を取得した(特許第 7055429 号)。この研究内容については、現在論文投稿中である。

抗ネフリン抗体障害性 FSGS マウスでは、ボーマン嚢壁細胞数が増加



抗ネフリン抗体によりボーマン嚢壁細胞は増殖。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Hashimoto K, Sano T, Honma Y, Ida M, Tominaga H, Sawada A, Abe T, Takahashi H, Shimada Y, Masaki T, Kamata M, Naito S, Aoyama T, Takeuchi Y, Akiya M, Inukai M, Nakata N. An autopsy case of TAFRO syndrome with membranoproliferative glomerulonephritis-like lesions. 2018. 8, 48-54. 査読有. doi: 10.1007/s13730-018-0363-9.
- 2) Naito S, Tazaki H, Okamoto T, Takeuchi K, Kan S, Takeuchi Y, Kamata K. Comparison of nephrotoxicity between two gadolinium-contrasts, gadodiamide and gadopentetate in patients with mildly diminished renal failure. 2017, 42, 379-384. 査読有. DOI: 10.2131/jts.42.379.
- 3) Takeuchi K, Naito S, Kawashima N, Ishigaki N, Sano T, Kamata K, Takeuchi Y. New anti-nephrin mediated antibody podocyte injury model using a C57BL/6 mouse strain. *Nephron Exp. Nephrol.* 2018: 138, 71-87. 査読有. DOI: 10.1159/000479935.

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 川島 永子、竹内 康雄、内藤 正吉: 糖脂質を利用した慢性腎臓病に対する新規創薬シーズの提案, Bio tech2018/第 17 回パイオ・ライフサイエンス研究展 (国際学会), 2018 年
- 2) 川島 永子、内藤 正吉: ネフローゼ症候群に対する新規治療薬の探索, 第 7 回低・中分子創薬推進プラットフォーム (招待講演), 2018 年

- 3) 内藤 正吉、川島永子、竹内康雄. 糖脂質 GM3 はネフリン抗体による細胞障害を正常化する. 第 61 回日本腎臓学会総会、2018 年
- 4) 桑水流 淳, 大町 紘平, 嘉村 美里, 横田 翼, 寺本 啓祐, 小嶋 遥, Mary Ann Suico, 首藤 剛, 川島 永子, 内藤 正吉, 甲斐 広文. 抗ネフリン抗体を用いた糸球体効果モデルの確立に向けた基礎的検討: 第 35 回日本薬学会九州支部大会、2018 年
- 5) 内藤 正吉、川島 永子、佐野 隆、竹内 康雄. 糖脂質 GM3 による抗体誘導性ネフリン障害の正常化. 第 2 回ポドサイト研究会、2018 年
- 6) 川島 永子、内藤 正吉、中村 和生, 竹内 康雄, 仲山 賢一. 糖脂質を利用した抗体誘導性障害糸球体ポドサイトのネフリン正常化効果の検討. 2017 年度生命科学系合同年次大会、2017 年
- 7) 内藤 正吉、川島 永子、竹内 康雄. ネフリンとポドサイトパッチー. 相模原ポドサイトセミナー (招待講演) 2017 年
- 8) 内藤 正吉、竹内 和博, 川島 永子, 竹内 康雄. ネフリン抗体誘導性 FSGS マウスにおけるポーマン囊壁細胞の増殖能の検討. 日本腎臓学会総会, 2017 年
- 9) ネフリン抗体誘導性糸球体腎炎モデルマウスとその応用: 内藤正吉、川島永子: 熊本大学拠点形成研究 A 主催講演会 (招待講演), 2016 年
- 10) 竹内 和博, 内藤 正吉, 阿部 哲也, 関本 恵子, 高橋 遼, 正木 貴教, 小川 みゆき, 鎌田 真理子, 村野 順也, 青山 東五, 佐野 隆, 竹内 康雄. ネフリン障害型ネフローゼ症候群モデルマウスの作製とその解析. 日本腎臓学会総会, 2016 年
- 11) Kazuhiro Takeuchi, Shokichi Naito, Tetsuya Abe, Keiko Hashimoto, Haruka Takahashi, Takanori Masaki, Miyuki Ogawa, Mariko Kamata, Junya Murano, Togo Aoyama, Takashi Sano, Yasuo Takeuchi. THE ANALYSES OF NEPHROTIC SYNDROME MODEL MICE INDUCED BY ANTI-NEPHRIN ANTIBODY USED BY GENE-IMMUNIZATION. 欧州腎臓学会 (国際学会) 2016 年

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 内藤 正吉、川島 永子、竹内 康雄. FOCUS ポドサイト障害による CKD 研究の最前線. 検査と技術. 2018, 46, 14-17, DOI : 10.11477/mf.1543207033
- 2) 内藤 正吉 竹内 康夫. ネフローゼ症候群の病態解明をめざして. 神奈川医師会報. 2016, 804, 6-9.
- 3) 内藤 正吉, 青山 東五, 川島 永子, 翁 千香子, 竹内 和博, 竹内 恵美子, 鎌田 真理子, 竹内 康雄. ポドサイト障害とネフローゼ症候群. 北里医学, 46, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 糸球体腎炎の予防又は治療剤

発明者: 川島永子、内藤正吉

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: 特願 2018-72747

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

名称：糸球体腎炎の予防又は治療剤

発明者：川島永子、内藤正吉

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：特願 2017-208301

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

名称：糸球体腎炎の予防又は治療剤

発明者：川島永子、内藤正吉

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2018/39434

出願年：2019 年

国内外の別： 外国

〔その他〕

本研究成果の一部は、北里大学医学部 腎臓内科 HP 内（<https://www.khp.kitasato-u.ac.jp/SKA/nephrology/section/#basic>）で報告した。

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名 なし