

令和元年5月31日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10081

研究課題名(和文) ビタミンAとDの免疫作用を利用した微小変化型ネフローゼ症候群の画期的治療の検討

研究課題名(英文) Potential of vitamin A and vitamin D as the therapeutic drug for minimal change nephrotic syndrome

研究代表者

金子 一成 (KANEKO, Kazunari)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00214453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)の病因として腎系球体上皮細胞(ポドサイト)の細胞骨格関連分子異常が示唆されている。最近、ビタミンAやビタミンDはポドサイトに対する直接作用を有することが報告されている。そこでビタミンAやビタミンDのMCNS治療薬としての可能性を検討した。その結果、ビタミンAとビタミンDはMCNSモデルラットにおいて蛋白尿を減少させた。またMCNS病態モデルポドサイトにおいて発現が増強したCD80などの分子群はビタミンA添加によって発現の低下を認めた。以上よりビタミンAやビタミンDはMCNSにおいてポドサイトに対する直接作用で蛋白尿減少効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の特発性ネフローゼ症候群は血中の蛋白が大量に尿に漏れる疾患でステロイドホルモンが著効する。しかし長期に投与せざるをえないため、小児患者は成長障害など副作用に悩まされる。近年、ビタミンAやビタミンDは腎臓の細胞に有用な作用をもたらすことが報告されている。そこでステロイドホルモン投与量を減らすためにビタミンAやビタミンDの特発性ネフローゼ症候群治療薬としての可能性を探った。その結果、モデル動物(ラット)においてビタミンAやビタミンDは蛋白尿減少効果を発揮した。したがって今後、ステロイドホルモンと併用することでステロイドホルモンの投与量が減らせる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is postulated that the aberrant molecular expressions on podocytes related to the cytoskeleton as an etiology of the minimal change nephrotic syndrome (MCNS) in children. Recent observations revealed that vitamin A and vitamin D have direct actions on podocytes. Taken together, we explored the potential of vitamin A and vitamin D as the therapeutic drug for MCNS. Firstly, we confirmed that vitamin A and vitamin D alleviated the amount of proteinuria in animal model of MCNS induced by puromycin aminonucleoside (PAN) injection. Secondly, the aberrant molecular expressions including CD80 on human cultured podocytes induced by PAN were restored by adding vitamin A into the medium. In conclusion, it is suggested that vitamin A and vitamin D have potential as the therapeutic agents for MCNS as they showed anti-proteinuric effect on MCNS model rats via direct actions on podocytes.

研究分野：小児科学

キーワード：ビタミンA ビタミンD ポドサイト 微小変化型ネフローゼ症候群 PANラット

1. 研究開始当初の背景

特発性ネフローゼ症候群は比較的頻度の高い疾患で、約 80%は微小変化型ネフローゼ症候群(minimal change nephrotic syndrome: MCNS)と呼ばれる特徴的な組織(光学顕微鏡で明らかな異常を認めず、電子顕微鏡ではポドサイトの足突起の融合や平坦化を呈するもの)を示す。ほとんどの MCNS 症例においてステロイドが著効するが、成長障害や感染症、白内障や緑内障などの重篤な副作用を高率に惹起する。MCNS の病因について、近年、Two-hit theory という仮説が支持されている。これは「MCNS には二つの異常、すなわち制御性 T 細胞 (Treg)の機能異常とそれに伴うポドサイトの細胞骨格の制御異常によって発症する」という考え方で、この仮説によれば、MCNS の発症機序は以下の様である：腎糸球体ポドサイトに存在する Toll 様受容体に何らかの抗原(ウイルス RNA やある種の血清蛋白)が結合する(1st hit)、Toll 様受容体からの刺激により細胞内シグナル伝達が活性化し、ポドサイトに共刺激因子・CD80(B7.1)が発現し、同時にシナプトポジンの減少やアクチンなどの細胞骨格分子に異常をきたす、ポドサイトの構造変化の結果として血漿蛋白が糸球体毛細血管内からボウマン嚢(尿中)に漏出する、一方、循環血中では CD80 の発現を抑制すべき Treg の機能が何らかの理由で低下しており(2nd hit)、ポドサイトの CD80 の異常発現状態が維持されるために蛋白尿が持続する。

ところでビタミンは、生物の生存・生育に必要な微量の栄養素のうち、炭水化物・蛋白質・脂質以外の有機化合物の総称で、ヒトでは 13 種が確認されている。この中でビタミン A とビタミン D は、これまで認識されていたビタミンとしての機能以外に、免疫調節作用を始めとする様々な機能を有することが明らかとなり注目を集めている。すなわちビタミン A の誘導体であるレチノイン酸は、以前よりその抗腫瘍効果が注目され、急性前骨髄球性白血病の治療にも用いられているし、ビタミン D も腸管でのカルシウム吸収や骨の石灰化といった既知の作用以外に、Treg やヘルパー T 細胞の分化調節作用、サイトカイン分泌調節作用や B 細胞の機能抑制作用が報告されている。さらに最近の報告ではポドサイトにはビタミン A とビタミン D の受容体が存在することも確認されている。

以上のことから、副作用の少ないビタミン A やビタミン D によって MCNS の病因と考えられている Treg の異常やポドサイトの構造異常を是正できれば、本症の治療薬になりうるのではないか、という着想に到った。

2. 研究の目的

副作用の少ないビタミン A やビタミン D によって MCNS の病因を是正できるか否かをモデル動物で検討し、ステロイドによらない MCNS の治療法を探求する。

3. 研究の方法

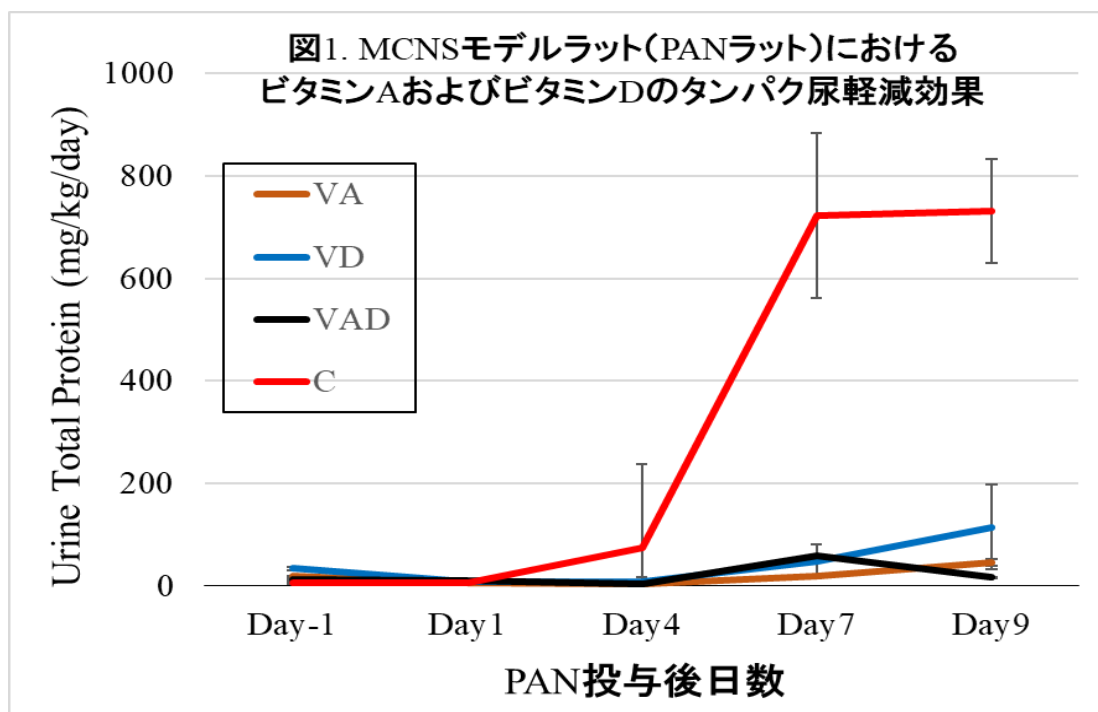
(1) MCNSモデルラットにおけるビタミンA (Vitamin A: VA)と ビタミンD (Vitamin D: VD)の抗蛋白尿効果の検討：ウイスター系ラットにピューロマイシンアミノヌクレオシド (Puromycin aminonucleoside: PAN) 50mg/kgを静注して作成したMCNSのモデルラット (PANラット)に、VAとしてトランス型レチノイン酸 (ATRA)を、またVDとして1 α -25(OH)2D₃ (カルシトリオール)を9日間投与して尿タンパク量の経時変化を観察した。なおATRAは2.5mg/kgの用量で1日1回、連日皮下注射、カルシトリオールは0.4 μ g/kgを連日、腹腔内投与した。さらにVAとVDの抗蛋白尿効果における相加作用の有無を確認するため両者を併用して尿タンパク量の経時変化を観察した。

(2)VAとVDのポドサイトに対する直接作用の検討：VAとVDの抗タンパク尿効果のメカニズムを探るため、ヒト腎臓由来ポドサイトを用いた実験を行った。まずポドサイトに対してPAN(50 µg/ml)を投与することによってMCNSの病因分子として報告されているCD80のポドサイトでの発現量が変化するか否かを蛋白質定量法(Western blotting法)によって検討した。次にPAN投与の24時間前にポドサイトに対しての培養液にVA(10 µM)を添加することでCD80の発現が変化するか否かを検討した。

(3) VAのポドサイトにおけるCD80発現抑制作用のメカニズム解明：(2)の検討でVAのポドサイトにおけるCD80発現抑制作用が確認された場合には、その細胞内シグナル伝達を明らかにするために、ポドサイトにPAN(50 µg/ml)を投与してCD80を過剰発現させた際のレチノイン酸受容体(RAR)とポドサイト関連分子(P-cadherin, Nephrin, Synaptopodin, Talin, -actin4)の発現量をWestern blottingで評価した。

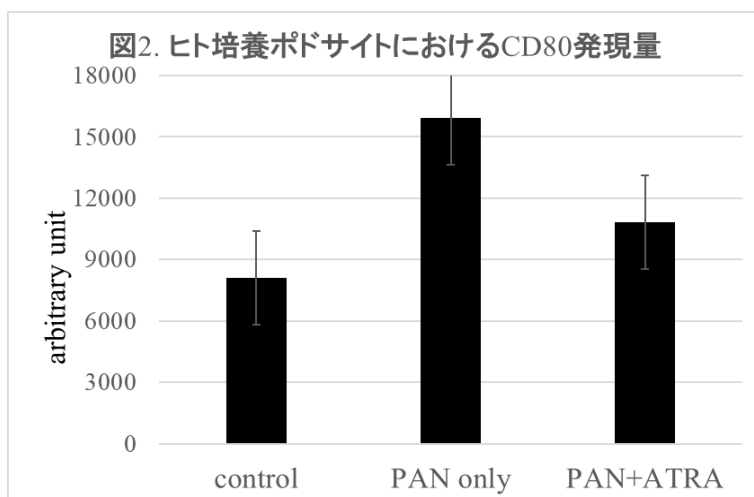
4. 研究成果

(1) MCNS モデルラットにおける VA と VD の抗蛋白尿効果：下記の図 1 に示したように、PAN を投与した MCNS モデルラット (control 群 : C 群) においては、尿タンパク量は徐々に増加し、PAN 投与後 9 日目にピークとなった。一方、PAN ラットに対して ATRA2.5mg/kg を連日 (9 日間) 皮下注した群 (VA 群) やカルシトリオール 0.4 µg/kg を連日腹腔内投与した群 (VD 群) においては、C 群に比較して PAN 投与後 4 日目、7 日目、および 9 日目に有意に尿蛋白量が低下していた (P<0.05. VA: ビタミン A 投与群; VD: ビタミン D 投与群; VAD: ビタミン A とビタミン D を併用投与した群; C: PAN のみを投与した対照群)。なおビタミン A とビタミン D を併用投与した場合の抗蛋白尿効果における相加作用については有意な差は認められなかった。また VA 群に比較して VD 群において死亡率が高かったため以降の検討は主に VA で行うこととした。



(2) 次にポドサイトに対するVAの直接作用を明らかにするために、ヒト腎臓由来ポドサイトを用いた実験を行った。まずポドサイトの培養液にPAN(50 µg/ml)を添加することにより、MCNSの病因分子として報告されている共刺激因子CD80が過剰発現することを蛋白質定量法(Western blotting法)によって明らかにした(図2, PAN only)。次に同じポド

サイト培養液にビタミン A 誘導体である ATRA(10 μ M)を PAN 添加 24 時間前に添加すると、CD80 の過剰発現が抑えられた (図 2, PAN+ATRA)。これらの結果からビタミン A の抗タンパク尿効果はポドサイトに対する直接作用である可能性が考えられた。(図 2. Control: PBS のみ添加; PAN only: PAN50 μ g/ml のみ添加; PAN+ATRA: PAN50 μ g/ml に加えて ATRA10 μ M を添加; 縦軸の単位は arbitrary unit)



(3) VAのポドサイトにおけるCD80発現抑制作用のメカニズムを解明するために、ポドサイトにPANを添加してCD80を過剰発現させた際のレチノイン酸受容体(RAR)とポドサイトの各種構造分子の発現量の変化を評価した。具体的にはPAN(50 μ g/ml)添加24時間前にATRA(10 μ M)をヒトポドサイトの培養液に添加し、ポドサイトにおけるCD2AP, ZO-1, P-cadherin, Nephrin, Synaptopodin, Talin, α -actinin4の発現量を蛋白質定量法(Western blotting法)で測定し、PAN(50 μ g/ml)のみを添加したヒトポドサイトにおける発現量と比較した。その結果、ビタミンAによるCD80発現抑制と同様の蛋白発現量の変化を示したのは、RARとP-cadherinであった。したがってRARとP-cadherinがビタミンAのPANラットにおける抗蛋白尿効果に参与していることが示唆された。

(4)まとめ：以上より、MCNSのモデルラットであるPANラットにおいてビタミンA 誘導体であるトランス型レチノイン酸や活性型ビタミンDのカルシトリオールは蛋白尿減少効果を有していること、そしてその作用はポドサイトの構造分子に対する直接作用である可能性が高いことが明らかとなった。今後はMCNSにおけるトランス型レチノイン酸や活性型ビタミンDの臨床応用に向けて至適投与量の検討が必要であると思われる。

<引用文献>

Shimada M, et al: Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder? *Pediatr Nephrol.* 2011;26:645-9.

Mora JR, et al. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:685-98.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

投稿予定

〔学会発表〕(計4件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Yuko Akagawa, Shoji Tsuji, Shohei Akagawa, Sohsaku Yamanouchi, Takahisa Kimata, Kazunari Kaneko: All-Trans Retinoic Acid Directly Acts on Podocytes by Regulating CD80 Expression. Kidney Week 2018 (Annual Meeting of the American Society of Nephrology), San Diego, U.S.A., 2018.10 (国際学会)

Shoji Tsuji, Yuko Akagawa, Takahisa Kimata, Sohsaku Yamanouchi, Shohei Akagawa, Kazunari Kaneko: Urinary CD80 as a novel biomarker of podocyte injury. Kidney Week 2018 (Annual Meeting of the American Society of Nephrology), San Diego, U.S.A., 2018.10 (国際学会)

辻章志、赤川友布子、木全貴久、山内壮作、赤川翔平、北尾哲也、大沼竹紫、金子一成：特発性ネフローゼ症候群における尿中CD80の意義。第53回日本小児腎臓病学会学術集会、福島2018.6.

Shoji Tsuji, Jiro Kino, Chikushi Suruda, Takahisa Kimata, Sohsaku Yamanouchi, Kazunari Kaneko: Study of a breakthrough therapy utilizing alternative actions of vitamins A and D in a murine model of minimal change nephrotic syndrome. Kidney Week 2017 (Annual Meeting of the American Society of Nephrology), New Orleans, U.S.A., 2017.11 (国際学会)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：木野 仁郎

ローマ字氏名：(KINO, jiro)

研究協力者氏名：赤川 友布子

ローマ字氏名：(AKAGAWA, yuko)

研究協力者氏名：辻 章志

ローマ字氏名：(TSUJI, shoji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果

に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。