

令和 2 年 9 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16100

研究課題名(和文)系球体線維化の再検討

研究課題名(英文)Revisit of glomerulosclerosis

研究代表者

小泉 賢洋(KOIZUMI, Masahiro)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：30566170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は当初「系球体硬化症ではI型コラーゲンが 1(I)2 2(I) heterotrimerから 1(I)3 homotrimerへと変容する」との仮説を立て検証を行った。質量分析を用いた蛋白レベルでの検討において、この仮説を証明することは出来なかった。しかし、質量分析による網羅的な検討により、硬化系球体においてコラーゲンの主構成アミノ酸であるglycineの産生経路の律速酵素であるPHGDHが著増しており、この経路の亢進が系球体硬化症の発症・進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の仮説を立証することは出来なかったが、質量分析による検討から系球体硬化症の発症機序に関し「硬化系球体ではPHGDH産生が亢進し、この酵素を阻害することにより系球体硬化症が軽減する」という新たな仮説の着想に至った。この仮説に基づいた研究はコラーゲンの主構成アミノ酸glycineの産生経路に着目したユニークなものであり、不可逆的な病態で現時点で有効な治療が確立されていない系球体硬化症の新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined a hypothesis that glomerulosclerosis induced transformation of type 1 collagen from 1(I)2 2(I) heterotrimer to 1(I)3 homotrimer, but were not able to prove this hypothesis in the analysis using mass spectrometry. However, in the comprehensive analysis of the changes in sclerosed glomeruli, the levels of PHGDH, which is a rate-limiting enzyme in glycine biosynthesis pathway, was significantly increased. This amino acid is a major component of collagen. This result indicated that this pathway plays an important role in the pathogenesis and development of glomerulosclerosis.

研究分野：腎臓病学

キーワード：系球体硬化症 細胞外基質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全の病理像である糸球体硬化症と尿細管間質の線維化は、ともにⅠ型コラーゲンの蓄積を特徴とする。Ⅰ型コラーゲンは、 $\alpha 1(\text{I})$ 鎖と $\alpha 2(\text{I})$ 鎖の $\alpha 1(\text{I})_2 \alpha 2(\text{I})$ heterotrimerで、それぞれの鎖は*Col1a1*, *Col1a2* 遺伝子の産物である。例外的に、 $\alpha 1(\text{I})$ 鎖のみから形成される $\alpha 1(\text{I})_3$ homotrimer が胎生および腫瘍組織に存在することが報告されており、この $\alpha 1(\text{I})_3$ homotrimer はコラーゲンの分解酵素である MMP (matrix metalloproteinase) に対して抵抗性を有することが示されている。Phillips 等は、骨形成不全症モデルである *Col1a2* 変異マウスでは、 $\alpha 1(\text{I})_3$ homotrimer が糸球体に蓄積することにより硬化様病変が形成されることを報告している (*Mol Genet and Metab* 104: 373)。

申請者等は、ポドサイト傷害と糸球体硬化症を誘導可能なモデルマウス (NEP25) を開発した。このモデルは、従来のものと比較して、ヒトの病態により近い線維症をもたらすことが出来る。マイクロアレイおよび RT-PCR による解析の結果、意外にも正常糸球体は大量の *Col1a2* mRNA を発現し、傷害糸球体では著減することが判明した。これに対して *Col1a1* mRNA は、傷害後糸球体で増加した。*Col1a2* のプロモーター活性を可視化可能な *Col1a2-EGFP* マウス (*Gastroenterology* 137: 1419) の解析においても、正常糸球体のポドサイトとメサンジウム細胞は EGFP を発現し、Ⅰ型コラーゲンが蓄積していた硬化糸球体では、むしろ EGFP は著減していた。つまり、硬化糸球体ではⅠ型コラーゲン蛋白の蓄積と *Col1a2* mRNA の減少という、一見矛盾する現象が観察された。

2. 研究の目的

1. に記載した予備研究の結果より、申請者等は「糸球体硬化症ではⅠ型コラーゲンが $\alpha 1(\text{I})_2 \alpha 2(\text{I})$ heterotrimer から $\alpha 1(\text{I})_3$ homotrimer へと変容する」という仮説を抱くに至った。本計画では、この仮説の立証を目指した。

3. 研究の方法

糸球体硬化症の進展に伴うⅠ型コラーゲンの組成の変容を明らかにすべく、以下の研究を行う。

- (1) 質量分析計を用いたⅠ型コラーゲン $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 鎖の測定系の構築
定量解析の際に測定対象となる $\alpha 1$, $\alpha 2$ 鎖由来のペプチドの選定
合成ペプチドを用いた定量性の検討
- (2) 正常糸球体と NEP25 マウスの硬化糸球体におけるⅠ型コラーゲン $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 鎖の定量
- (3) 硬化糸球体内のⅠ型コラーゲンの MMP (matrix metalloproteinase) 抵抗性の検討
- (4) 他の糸球体硬化モデルマウスでの検討
- (5) *in situ* hybridization によるヒト腎硬化糸球体における *Col1a1*, *Col1a2* mRNA の評価

4. 研究成果

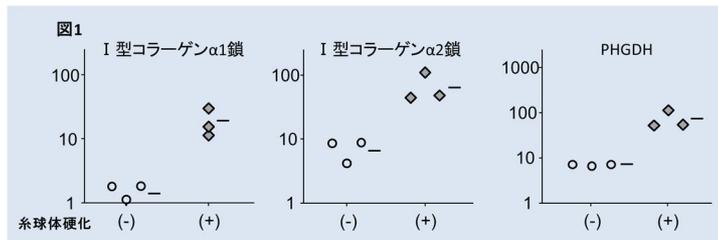
(1) 質量分析による糸球体Ⅰ型コラーゲン $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 鎖の定量

熊本大学薬学部大槻先生、増田先生の協力のもと、糸球体より抽出した蛋白を用いて質量分析を行うことが可能となった。硬化糸球体を用いた質量分析においてⅠ型コラーゲン $\alpha 1, \alpha 2$ 鎖蛋白がいずれも増加しており、当初の仮説を支持する結果は得られなかった。

(2) 糸球体硬化症発症・進展における PHGDH の関与の可能性

(1)の結果より、糸球体硬化におけるコラーゲン蓄積には、転写レベルではなく蛋白合成制御が重要であることが示唆された。その機序の糸口を見つけるべく、質量分析による網羅的な検討を行った。正常マウスと糸球体硬化症マウス (各 $n=3$) よりそれぞれ糸球体を採取した後、質量分析を施行し解析したところ、硬化糸球体では D-3-

phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) が著増していることが判明した (図1)。PHGDH は解糖系



糖系 (解糖系) の中間体である 3-phosphoglycerate から serine が合成される経路における律速酵素である。コラーゲンを構成するアミノ酸の 1/3 は glycine であり、この glycine は主に serine から合成される (図2)。この硬化糸球体ではポドサイトはほぼ死滅しているが、より早期の硬化前の傷害ポドサイトの RNA プロフィール (*Am J Physiol Renal* 2019; 316: F241) をみると、*Phgdh* mRNA は 9.7 倍に、それに続く酵素である *Psat1* mRNA は 15.5 倍に増加していた。最近 Hamanaka らは、培養肺線維芽細胞を TGF- β で刺激すると PHGDH が活性化し、それを介して serine と glycine の生合成が増加し、Ⅰ型コラーゲンの産生が亢進することを示した (*J Biol Chem* 2016; 291: 27239)。さらに、肺線維症モデルマウスの肺組織で PHGDH 発現が亢進し、PHGDH 阻害薬の投与により線維化が軽減したと報告した (*Am J Respir Cell Mol Biol* 2018; 58: 585)。腎メサンジウム細胞は肺線維芽細胞と全

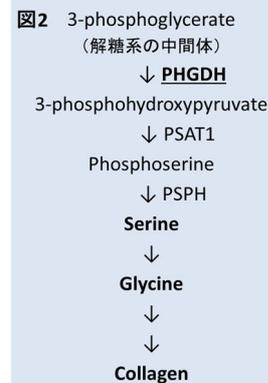


図2 3-phosphoglycerate

(解糖系の中間体)
↓ PHGDH
3-phosphohydroxypyruvate
↓ PSAT1
Phosphoserine
↓ PSPH
Serine
↓
Glycine
↓
Collagen

く異なる細胞ではあるが、硬化系球体におけるコラーゲン産生も、増加した PHGDH に依存している可能性が考えられた。

(3) 今後の研究プラン

以下の3つの仮説を検証すべく、研究を計画する。

硬化系球体のメサンギウム細胞では PHGDH 活性が増加し、それに依存して Ⅰ型コラーゲンが産生される

系球体硬化症における Ⅰ型コラーゲンの蓄積は、PHGDH 阻害により軽減する

尿中 PHGDH は系球体硬化症のバイオマーカーとなりうる

具体的な研究計画は以下の通りとする。

培養メサンギウム細胞における PHGDH の検討：まず硬化系球体で主に Ⅰ型コラーゲン産生しているメサンギウム細胞を *in vitro* で再現するために、培養メサンギウム細胞に TGF- β 刺激を行う。

- TGF- β 添加による PHGDH 活性の変化：正常マウスより磁気ビーズを用いて系球体を採取し、既報 (*J Am Soc Nephrol* 2019; 30: 1641) の通り、メサンギウム細胞を RPMI640 培地にて培養する。PDGFR- α 染色にてメサンギウム細胞であることを確認する。TGF- β (1 ng/ml) を添加し、48 時間後細胞を回収する。PHGDH 蛋白量は PHGDH 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた Western Blot 法で定量し、その特異性は質量分析で確認する。PHGDH 活性は、市販キット (BioVision) を用いて測定する。Ⅰ型コラーゲン量については、質量分析により定量する。TGF- β 刺激により、PHGDH 蛋白量が増加、活性が亢進し、Ⅰ型コラーゲンが増加するか否か検討する。
- RNA 干渉による PHGDH 遺伝子抑制の効果：TGF- β 添加後の培養メサンギウム細胞に PHGDH 遺伝子に対する siRNA をトランスフェクションし、Ⅰ型コラーゲンの産生亢進が抑制されるか否か、質量分析を用いて検討する。
- PHGDH 阻害薬 (NCT-503) による効果：同様に TGF- β 添加後の培養メサンギウム細胞に NCT-503 を添加 (濃度 10-50 μ M) し、Ⅰ型コラーゲンの産生亢進が抑制されるか否か検討する。

PHGDH 阻害薬 (NCT-503) の効果の検討：*in vivo* の実験では、当研究室で開発したポドサイト傷害モデル (NEP25) マウスを用いる。NEP25 マウスはポドサイトに human (h) CD25 を発現し、hCD25 を標的とする immunotoxin (LMB2) 0.625 ng/g を2回投与すると、21日目にびまん性全節性の系球体硬化症を呈する。系球体における PHGDH 発現のタイムコースを見るために、LMB2 投与前、および投与後 5, 10, 15, 21 日に系球体を採取し PHGDH 活性を測定する (各 n=3)。PHGDH 活性が増加した時点より実験終了まで NCT-503 (40 mg/kg) を腹腔内投与し、21日目に採材し vehicle 投与の control 群と比較する (各 n=5)。腎のほか、定常状態で PHGDH 遺伝子が多く発現している脳や皮下脂肪組織、肝臓を用いて、NCT-503 による PHGDH 活性の阻害の有無を確認する。一部のマウスからは磁気ビーズを用いて系球体を採取し、Western Blot 法により PHGDH 蛋白量の定量を、質量分析により PHGDH 抗体の特異性と Ⅰ型コラーゲンの定量を行う。*in vitro* での効果や入手の容易さによっては、CBR-5884 や BI-4924 の使用も考慮する。

PHGDH 遺伝子ノックアウト (KO) による系球体硬化症への影響：PHGDH 完全欠損が系球体硬化症に及ぼす影響を解析する。PHGDH を先天的に完全欠損すると小頭症等の中枢神経障害を呈する。そこで本研究では ROSA26 Cre-ERT2 マウスと PHGDH-*fl*ox マウスを交配させ、タモキシフェン投与により全身性に PHGDH 遺伝子を KO させる。この KO マウスと NEP25 マウスを交配し、PHGDH 遺伝子の KO により系球体硬化症が軽減するか否か検討する。

尿中 PHGDH 測定系の確立とバイオマーカーの可能性に関する検討：まず PHGDH の標品に尿を添加して、尿中に PHGDH 阻害物質が存在するか否か、存在する場合はその除去方法を検討する。次に NEP25 マウスに様々な用量の LMB2 を投与して、経時的に尿を採取し、PHGDH 活性とアルブミン量を測定する。必要によっては適切な方法で尿を濃縮して測定する。尿中 PHGDH 活性/アルブミン濃度比と、組織学的所見 (系球体硬化および間質線維化) や PHGDH の免疫染色性との相関性を検討し、尿中 PHGDH 活性/アルブミン濃度比が組織変化を予測できるバイオマーカーとなりうるか検討する。有望であれば、ヒト尿検体を用いて検討する。申請者等の所属する施設での腎生検時に併せて採取している尿検体を使用する。活性測定キットによる測定のほか、腎組織における系球体硬化の程度と比較し、系球体硬化症発症の予知可能なバイオマーカーとなりうるか否か検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masahiro Koizumi	4. 巻 74
2. 論文標題 Podocyte Injury Augments Intrarenal Angiotensin II Generation and Sodium Retention in a Megalin-Dependent Manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 509-517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12352.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小泉賢洋
2. 発表標題 腎内Angiotensin IIのポドサイト傷害時の病態形成における役割
3. 学会等名 高血圧関連疾患モデル学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Koizumi
2. 発表標題 Podocyte injury enhances intrarenal Angiotensin II generation and sodium retention dependently on megalin
3. 学会等名 Gordon Research Seminar（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小泉賢洋
2. 発表標題 ポドサイト傷害後にmegalin依存性に増加した腎内Angiotensin IIは浮腫形成に寄与する
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小泉賢洋
2. 発表標題 腎内Angiotensin IIのポドサイト傷害時の病態形成における役割
3. 学会等名 日本高血圧学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahiro Koizumi
2. 発表標題 Podocyte injury enhances intrarenal Angiotensin II generation and sodium retention dependently on megalin
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松阪 泰二 (MATSUSAKA Taiji)		