

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2006 ～ 2009  
 課題番号：18209030  
 研究課題名（和文） ポドサイトの傷害機序  
 研究課題名（英文） Mechanism of podocyte injury  
 研究代表者  
 松阪 泰二（MATSUSAKA TAIJI）  
 東海大学・医学部・准教授  
 研究者番号：50317749

## 研究成果の概要（和文）：

糖尿病や腎炎等の原因により、腎臓が働かなくなると、生涯にわたる透析療法や腎移植が必要となり、また心臓病や脳卒中を起こしやすくなる。この時、たこ足細胞（ポドサイト）と呼ばれる特殊な細胞が失われる。我々は、たこ足細胞は生後に増える事はないが、強制的に増やしてやると、かえって腎臓が傷害されてしまい、また一部のたこ足細胞が傷害されると、自動的に他の細胞も傷害されてしまう事を見出した。これらの現象が、腎臓病を治療抵抗性に行っている要因と考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

When the kidney does not function due to diabetes or nephritis, patients need to have lifelong dialysis or renal replacement therapy. Also, they have increased risk for heart and vascular diseases. In this situation, a specialized type of kidney cells, named podocytes, are lost. We tried to increase the number of podocytes which do not normally proliferate after birth, but podocyte proliferation caused kidney injury. We also found that injury in a fraction of podocytes causes injury in other initially intact podocytes, thus forming a vicious cycle toward total loss of podocytes.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2007年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：腎臓病学、内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体硬化症、ポドサイト、蛋白尿、キメラマウス、SV40、HIV-1、トランスジェニックマウス、慢性腎不全

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全は、日本国民の大きな健康上の問題であり、その根本的治療法・予防法の開発が望まれる。これら慢性腎不全患者の腎臓は、元の原因に関わらず、共通して糸球体硬化症という病理組織学的形状を示し、それはポドサイトと呼ばれる腎臓の細胞が傷害される事が原因である。したがって、腎臓病の治療と予防には、どのようにしてポドサイトが傷害されるのか、傷害ポドサイトからどのように病変が波及するののかの理解が不可欠である。

## 2. 研究の目的

- (1) ポドサイト傷害の自動進行性拡大の証明とその機序の解明。我々は、以前にイムノトキシンによりポドサイトを特異的に傷害する事のできるマウス (NEP25) を開発し、その観察から、「一部のポドサイトが傷害されると、他の本来傷害を受けなかったポドサイトも二次的に傷害され、悪循環的にポドサイト傷害が進行する。」という仮説を抱くに至った。この検証が、本計画の最大の目的である。
- (2) ポドサイトの増殖と傷害の関係を解明する。我々はポドサイト特異的に SV40 T 抗原を発現誘導可能なトランスジェニックマウスを開発した。SV40T を発現させると、本来増殖しないポドサイトは増殖したが、糸球体硬化が出現した。細胞周期に再入したポドサイトが傷害される機序を明らかにするのが、本計画の第2の目的である。
- (3) HIV-1 遺伝子による podocyte 傷害の機序を解明する。HIV-1 関連腎症は、HIV-1 感染者の一部に発症する腎疾患で、原因が明確な数少ない外因性のポドサイト疾患である。以前に我々は、9つの HIV-1 遺伝子のうち、vpr と nef の相乗作用により podocyte が傷害される事を明らかにした。その分子機序の解明が、当初計画の第3の目的である。

## 3. 研究の方法

- (1) ポドサイト傷害の自動進行性拡大
  - ① 一部のポドサイトだけが傷害されるようなマウスモデルを作成した。そのために、イムノトキシン (LMB2) の受容体 hCD25 をポドサイト特異的に発現する NEP25 マウスと、hCD25

を発現しないマウスから、初期胚を採取し、凝集キメラマウスを作成した。2種のポドサイトを区別するために、後者の源として全身に耐熱性アルカリホスファターゼ酵素 (ALP) を強く発現するトランスジェニックマウスを用いた。

- ② 予備実験にて、ALP は容易にパラフィン・電顕切片で染色可能であり、上記キメラマウスでは、ALP (+) ポドサイトが hCD25 (-) で、ALP (-) ポドサイトが hCD25 (+) であり、また傷害をおこしたポドサイトでも ALP は退色しない事を確認した。

- ③ 得られた 15 匹のキメラマウスを、全例腎生検をして、LMB2 投与前に hCD25 (+) ポドサイトの割合を評価した。

- ④ キメラマウスに LMB2 を投与し、4、9、42 日後に解析した。基本的には、パラフィン連続切片を、ALP と nephrin 染色等を行い、hCD25 (+) および (-) のポドサイトの形質を評価した。

### (2) ポドサイトの増殖と傷害の関係

我々の開発したドキシサイクリン (DOX) の投与により SV40T をポドサイト特異的に誘導する事が可能なトランスジェニックマウスを用いて、様々な DOX 投与のタイミングでポドサイトを詳細に解析した。細胞周期にあるポドサイトは、Ki67, Aurora B, bromodeoxyuridine の取り込みで同定し、また電顕に有糸分裂像を検出した。

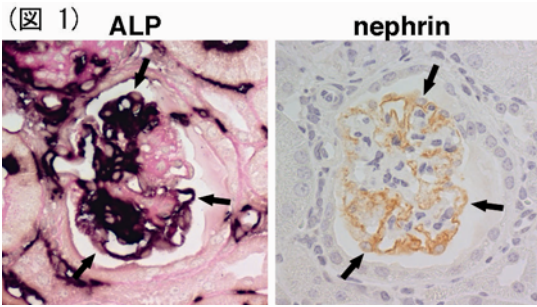
### (3) HIV-1 遺伝子による podocyte 傷害の機序

- ① HIV-1 関連腎症の2つの主要な原因遺伝子である vpr と nef を培養ポドサイトに導入して、細胞骨格と形態の変化を調べる
- ② 大腸菌で組換え vpr タンパク質を作成し、会合するポドサイトタンパク質を同定する。

## 4. 研究成果

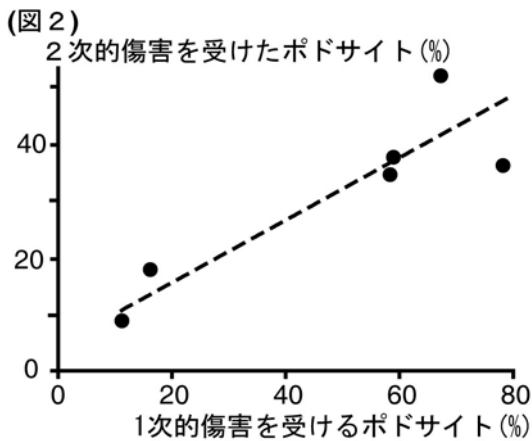
### (1) ポドサイト傷害の自動進行性拡大

- ① LMB2 投与4日後において、予想通りほぼすべての hCD25 (+) (ALP (-)) のポドサイトは、著しく傷害されていた。注目すべきことに、一部の hCD25 (-) (ALP (+)) のポドサイトにおいても nephrin の発現が減弱していた (図 1)。この細胞は、LMB2 の受容体を持たず、LMB2 の直接作用を受けない。したがって、一部のポドサイトが傷害を受けると、他のポドサイトも二次的に傷害を受ける事が証明された。



(図 1) キメラマウスは ALP+ と ALP- の細胞を含む。ALP+ 細胞はイムノトキシン受容体を持たないが、隣接切片の nephrin 染色は減弱し (矢印)、二次的の傷害を示した。

② 上記現象は、LMB2 投与前の hCD25 の陽性率が高いマウス程、高頻度に認められた。すなわち、一次的に傷害されるポドサイトが多い程、二次的に傷害を起こすポドサイトが多い事がわかった (図 2)。



③ 9 日目の解析では、hCD25(+) ポドサイトはほとんど失われていた。4 日目と同様、hCD25(-) ポドサイトが傷害され、nephrin、podocin、synaptopodin、VEGF が発現低下しているのが観察された。また電顕でも ALP(+) (したがって hCD25(-)) ポドサイトの著しい傷害を認めた。この現象は、癒着のある糸球体の方が高頻度であったが、LMB2 投与前の hCD25(-) ポドサイトの面積と、癒着のない糸球体でも観察された。LMB2 後の生き残った podocyte の面積を比較すると、後者の方が明らかに小さく、hCD25(-) ポドサイトが消失した事が示唆された。

④ hCD25 の陽性率が低いキメラマウスに、LMB2 を投与して、42 日後に解析した。hCD25(+) ポドサイトは、LMB2 投与後にすべて消失した。一部の糸球体は硬化に陥った。LMB2 投与後の硬化糸球体の割合は、LMB2 前に hCD25(+) ポドサイトを含む糸球体の率よ

り明らかに低かった。すなわち、少数のポドサイトが傷害され失われても、一部の糸球体は完全に回復したと考えられた。

以上のように、一部のポドサイトの傷害により、二次的に他のポドサイトの傷害をもたらし、上記二次的傷害は、一次的傷害の度合いにより、その程度と可逆性が決定される事が示された。

⑤ 上記で明らかにされたポドサイトの傷害の伝搬の基底には、傷害によりさらに傷害を助長するような因子が誘導されるのではないかと予想された。その候補としては TGFβ、ケモカイン、Wnt 等が考えられる。分子機序解明の手掛かりとして、ポドサイト傷害を誘導前後の NEP25 の糸球体を採取し、RNA array を行った。その結果、ポドサイト傷害 1 日目に、142 の増加する遺伝子と、429 の減少する遺伝子を見いだした。減少した遺伝子には、多くのポドサイト特異的遺伝子が含まれていた。変動を見いだした遺伝子の多くは、糸球体での発現状況が未知のものであった。この中に、ポドサイト傷害の伝搬を担う分子があると予想しているが、その検索と同定は次の研究計画に引き継がれる。

⑥ HIV-1 vpr トランスジェニックマウスのトランスジーンは、X 染色体上にあり、雌マウスでは lyonization により約半数のポドサイトで、トランスジーンが発現していなかった。しかしながら、雌マウスの中には、広汎な全節性硬化をきたしたものが存在した。この事は、約半数のポドサイトが異常であるだけで、全節性の硬化になる可能性が示唆された。

## (2) ポドサイトの増殖と傷害の関係

DOX 投与 7 日以内では、BrdU でラベルされた増殖ポドサイトは電顕で正常であった。従って、細胞周期の再入と脱分化は不可分ではない事が示された。しかし、有糸分裂像を示すポドサイトでは著しい傷害を示した。また BrdU(+) ポドサイトには特異的に血漿蛋白質の蓄積が認められた。2 週以上の DOX 投与により、SV40T/rtTA マウスは糸球体硬化症を示した。以上の事から、ポドサイトは、細胞周期への再入だけでは傷害されず、分裂期に傷害される事が示され、また血漿蛋白成分の蓄積が傷害を助長する事が示唆された。

またこれらは、Angiotensin II の阻害により軽減した。

関連研究として、collapsing nephropathy モデルの糸球体で増殖する細胞は、ポドサイトではない事を証明した。また、当初ポドサイト増殖に関与すると予想した Bmp4 は糸球体毛細血管の構築に関与する事を示した。

## (3) HIV-1 遺伝子による podocyte 傷害の機序

- ① ドキシサイクリン(DOX)により vpr の発現が誘導されるラットポドサイトを樹立したが、vpr の発現量が少なく、DOX 投与により再現性のあるポドサイトの形態変化を認めなかった。次に、Cre リコンビナーゼを発現するアデノウイルスの感染により、vpr を発現するようなポドサイトの安定細胞株を樹立した。しかし、Cre を発現しない陰性コントロールのアデノウイルスによっても形態変化が起こり、vpr による形態変化を調べる事ができなかった。
- ② 大腸菌で vpr タンパク質を作成すべく多大な努力をしたが、十分な量を得られなかった。

以上のような技術的問題に阻まれ、また他グループの研究状況をかんがみ、この分野で独自性を先行させる事は困難と判断し、他の分野に集中する事にした。

#### 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 11 件)

- ① Matsusaka T, Asano T, Niimura F, Kinomura M, Shimizu A, Shintani A, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Angiotensin Receptor Blocker Protection Against Podocyte-Induced Sclerosis Is Podocyte Angiotensin II Type 1 Receptor-Independent. Hypertension. 55: 967-73, 2010. (査読有)
- ② Motojima M, Matsusaka T, Kon V, Ichikawa I. Fibrinogen That Appears in Bowman's Space of Proteinuric Kidneys in vivo Activates Podocyte Toll-Like Receptors 2 and 4 in vitro. Nephron Exp Nephrol. 114(2): e39-e47, 2009. (査読有)
- ③ Nishiyama A, Matsusaka T, Miyata T. Angiotensin II type 1A receptor deficiency and longevity. Nephrol Dial Transplant. 24: 3280-1, 2009. (査読無)
- ④ Takabatake Y, Sugiyama T, Kohara H, Matsusaka T, Kurihara H, Koni PA, Nagasawa Y, Hamano T, Matsui I, Kawada N, Imai E, Nagasawa T, Rakugi H, Isaka Y. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. J Am Soc Nephrol. 20: 1714-23, 2009. (査読有)
- ⑤ Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S,

Ichikawa I. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. Kidney Int. 74(10):1262-69. 2008. (査読有)

- ⑥ 松阪泰二. 糸球体保護戦略:ポドサイト数を増やすことは可能か? Annual Review 腎臓 2009. 8-13, 2009. (査読無)
- ⑦ Ueda H, Miyazaki Y, Matsusaka T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Ichikawa I. Bmp in podocytes is essential for normal glomerular capillary formation. J Am Soc Nephrol. 19: 685-94, 2008. (査読有)
- ⑧ 松阪泰二. ポドサイト傷害に起因する腎障害. 腎と透析. 64(3):243-7, 2008. (査読無)
- ⑨ Zuo Y, Matsusaka T, Zhong J, Ma J, Ma LJ, Hanna Z, Jolicoeur P, Fogo AB, Ichikawa I. HIV-1 genes vpr and nef synergistically damage podocytes, leading to glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol. 17(10):2832-43, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 松阪泰二. ポドサイト傷害とRAS. FRONT-J研究会. 2009年12月26日. 東京.
- ② Niimura F, Matsusaka T, Nishiyama A, Kobori H, Navar GL, Ichikawa I. Renal Angiotensinogen in Liver and Kidney Angiotensinogen Knockout Mice. The American Society of Nephrology Annual Meeting 2009. Oct 31, 2009. San Diego.
- ③ Matsusaka T, Niimura F, Nishiyama A, Kobori H, Navar GL, Ichikawa I. Mechanism of Intrarenal Ang II Activation by Podocyte Injury. The American Society of Nephrology Annual Meeting 2009. Oct 29, 2009. San Diego.
- ④ 清水昭博、松阪泰二、新村文男、市川家國、西山成. 腎内アンジオテンシン系の活性化機序. 第15回分子腎臓研究会. 2009年9月5日. 京都.
- ⑤ Matsusaka T, Niimura F, Asano T, Fogo AB, Ichikawa I. Angiotensin II receptor (AT1) antagonist protects podocytes through mechanism(s) independent of AT1 on podocytes. The American Society of Nephrology Annual Meeting 2008. (JASN. 19: 12A) Nov 4-9, 2008. Philadelphia.

- ⑥ 松阪泰二、市川家國。ポドサイトの修復と再生の可能性を求めて。第51回日本腎臓学会学術総会。2008年5月30日-6月1日。福岡。
- ⑦ Matsusaka T, Fogo AB, Ichikawa I. Podocyte damage damages podocytes: evidence from a study on chimeric glomeruli. The American Society of Nephrology Annual Meeting 2007. (JASN. 18: 18A) Dec 2-5, 2007. San Francisco.
- ⑧ 松阪泰二。ポドサイト傷害に起因する腎障害。第29回腎臓セミナー。2007年8月25日。東京。
- ⑨ 松阪泰二、市川家國。正常なポドサイト数を増加させる事が可能である。第50回日本腎臓学会学術総会（日腎会誌 49, 238）2007年5月25日-27日。浜松
- ⑩ Matsusaka T, Ichikawa I, Kopp JB. Experimental attempt to increase podocyte number in vivo. The American Society of Nephrology Annual Meeting 2006 (JASN. 17: 542A). Nov 14-19, 2006. San Diego.
- ⑪ 松阪泰二、市川家國。ポドサイト再生の試み。第49回日本腎臓学会学術総会。2006年6月14日-16日。東京。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松阪 泰二 (MATSUSAKA TAIJI)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：50317749

### (2) 研究分担者

市川 家國 (ICHIKAWA IEKUNI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：80317768

### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：