

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07415

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症における特異的ポドサイト障害分子の同定と尿中バイオマーカーの樹立

研究課題名(英文) Identification of specific podocyte-damaging molecules in diabetic nephropathy and establishment of urinary biomarkers

研究代表者

櫻井 明子 (SAKURAI, Akiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70707900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク尿の出現や腎機能低下の直接の原因となる糸球体上皮細胞(ポドサイト)に着目し、新規標的分子CXCR4・CXCR7の解析を行った。ヒト培養不死化ポドサイトの免疫組織化学染色では、細胞膜上にCXCR4・CXCR7が発現していることを確認した。またヒト培養不死化ポドサイトのCXCR4・CXCR7遺伝子発現はRT-PCR、Realtime-PCRで確認した。健常者随時尿と患者尿中エクソソーム由来RNAと沈渣内脱落細胞由来RNAのRT-PCR、Realtime-PCRを行いCXCR4、CXCR7のmRNA発現レベルについて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)の主たる原因である糖尿病性腎症によって新規に透析導入となる患者数は最も多い。現行の治療法では、腎不全への進展をわずかに遅延させるのみであり、他のCKDの原因と比較しても、予後は極めて不良である。そのため、診断法を明確なものとし、腎症に特異性の高く、有効な治療法を開発することは急務である。腎症における分子病態を統合的に理解し、腎症の病態・病期ごとに特異的な分子を抽出し、新たな診断のためのバイオマーカーの樹立と新規分子標的治療の探索を行うことで、腎臓病の分子病態把握、治療の奏功性の評価、透析にいたる予後予測等の評価ができるようになる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on glomerular epithelial cells (podocytes) that directly cause the appearance of proteinuria and decreased renal function, we analyzed the novel target molecules CXCR4 and CXCR7. Immunohistochemical staining of human cultured immortalized podocytes confirmed that CXCR4 and CXCR7 were expressed on the cell membrane. The expression of CXCR4 and CXCR7 genes in human cultured immortalized podocytes was confirmed by RT-PCR and Realtime-PCR. The mRNA expression levels of CXCR4 and CXCR7 were analyzed by performing RT-PCR and Realtime-PCR of RNA derived from exosomes in healthy subjects and urine of patients and RNA derived from shedding cells in the sediment.

研究分野：臨床病態検査学

キーワード：ポドサイト バイオマーカー 糖尿病性腎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は我が国のみならず全世界において最も重要な病態である。この主たる原因は糖尿病性腎症であり、年々増加している。我が国では末期腎不全の45%を占める。また、CKDは心血管病変(CVD)の重大な危険因子であり、さらに血管合併症は糖尿病性腎症では高頻度におこる合併症であり、予後は極めて不良である。CKDは進行すると透析導入となり、患者の医療費負担が高騰しQOL(Quality of Life)が低下する。そのため早期の診断と治療開始が重要となる。

### 2. 研究の目的

糖尿病性腎症の診断は難しく、アルブミン尿は腎症以外のほとんどのCKDで認められるという問題があり、治療の面でも、現行の治療では腎不全や透析になるのを少し遅らせるだけであり、進行する腎症を画期的に治癒させる治療法はない。本研究ではタンパク尿の出現や腎機能低下の直接の原因となる糸球体上皮細胞(ポドサイト)に着目し、これまでの研究で見出した糸球体上皮細胞膜分子の分子病態解析を基に、新たな診断のためのバイオマーカーの樹立と新規分子標的治療の探索を行う。

### 3. 研究の方法

Conditional BMP4 transgenic マウスの解析で、BMP4の活性化がヒト糖尿病性腎症に非常に特徴的な組織変化と大量のタンパク尿を呈し、ポドサイトに障害がみられるとの報告がある。正常マウス腎臓組織の免疫組織化学染色で発現が確認されているCXC Chemokine Receptorが、ヒト培養不死化ポドサイトに発現しているか免疫組織化学染色を実施し確認する。また、ヒト腎臓組織でCXC Chemokine Receptorの発現を確認するため、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会で承認され、同意書の得られた、腎生検を行った患者組織の免疫組織化学染色を実施する。ヒト尿中に排出されているCXC Chemokine Receptorについては、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会で承認され、同意書の得られた、健常者ならびに患者検体の尿中エクソソーム由来RNAと、沈渣内脱落細胞由来RNAのRT-PCR、Realtime-PCR解析を行う。また、ヒト尿中に排出されているCXC Chemokine Receptor 蛋白については、ウエスタンブロットを行い解析する。不死化培養ポドサイトに高濃度グルコース等の刺激を行いCXC Chemokine Receptorの機能解析を実施する。

### 4. 研究成果

(1)Immortalized Human Podocytes for academic user, Human(APB)を用いて、CXC Chemokine Receptor4(CXCR4)、CXC Chemokine Receptor7(CXCR7)、WT1の免疫組織化学染色を行った。ヒト培養不死化ポドサイトの細胞膜上にCXCR4、CXCR7が発現しているのが確認できた。WT1は、ヒト培養不死化ポドサイトの核内に発現が確認できた。培養不死化ヒトポドサイトを用いてGAPDH・WT1・CD2AP・nephrin・Actn4・podxl・CXCR4・CXCR7がヒトポドサイトに発現していることをRT-PCRにて確認した。

(2) 徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会で承認され、徳島大学病院で腎生検を実施し同意書の得られた病理診断の確定した患者腎臓組織の免疫組織化学染色を実施し、CXC Chemokine Receptor4 (CXCR4)、CXC Chemokine Receptor7 (CXCR7)、WT1、nephrin、podocin の発現を確認した。微小変化型ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症の2疾患患者で発現を比較すると、CXC Chemokine Receptor4 (CXCR4)、CXC Chemokine Receptor7 (CXCR7) に顕著な差は確認できなかった。WT1、nephrin、podocin の発現は、微小変化型ネフローゼ症候群に比べ糖尿病性腎症患者組織で発現量が減少していた。

(3) 徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会で承認され、徳島大学病院で腎生検を実施し同意書の得られた病理診断の確定した患者と健常者随時尿中エクソソーム由来 RNA 抽出方法と、RT-PCR、Realtime-PCR の条件検討を行った。条件検討後、健常者随時尿と患者尿中エクソソーム由来 RNA と沈渣内脱落細胞由来 RNA の RT-PCR、Realtime-PCR 解析を行った。患者尿中エクソソーム由来 RNA と沈渣内脱落細胞由来 RNA の CXCR4、CXCR7 の mRNA 発現レベルは、健常者随時尿検体に比べ増加が認められた。

(4)(3) で使用した健常者随時尿、腎生検患者尿中 CXCR4、CXCR7 タンパク発現について確認した。蛋白量を統一して Western blot を実施したところ、尿中に排出されているアルブミン、IgG 量が多く目的の CXCR4、CXCR7 タンパクは確認できなかった。尿中アルブミン、IgG を除去し Western blot を実施した結果も同様にタンパク発現は確認できなかった。

(5) ヒト培養不死化ポドサイトの高濃度グルコース刺激による CXCR4、CXCR7 の mRNA 発現レベルについて Realtime-PCR を用いて検討した。高血糖条件下で、CXCR4、CXCR7 の mRNA 発現レベルに変化は確認できなかった。また、過酸化水素刺激によるヒト培養不死化ポドサイトの CXCR4、CXCR7 の mRNA 発現レベルに変化がないことを確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kataoka Keiko, Nemoto Hideyuki, Sakurai Akiko, Yasutomo Koji, Shikanai Masataka	4. 巻 78
2. 論文標題 Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on spontaneous type 1 diabetes in NOD female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 104356 ~ 104356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2021.104356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai Akiko, Ono Hiroyuki, Ochi Arisa, Matsuura Motokazu, Yoshimoto Sakiya, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Tominaga Tatsuya, Nagai Kojiro, Abe Hideharu, Doi Toshio	4. 巻 14
2. 論文標題 Involvement of Elf3 on Smad3 activation-dependent injuries in podocytes and excretion of urinary exosome in diabetic nephropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ono Hiroyuki, Abe Hideharu, Sakurai Akiko, Ochi Arisa, Tominaga Tatsuya, Tamaki Masanori, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Nagai Kojiro, Kohashi Masayuki, Doi Toshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel Interplay Between Smad1 and Smad3 Phosphorylation via AGE Regulates the Progression of Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28439-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Hideharu, Sakurai Akiko, Ono Hiroyuki, Hayashi Sanae, Yoshimoto Sakiya, Ochi Arisa, Ueda Sayo, Nishimura Kenji, Shibata Eriko, Tamaki Masanori, Kishi Fumi, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Nagai Kojiro, Doi Toshio	4. 巻 65
2. 論文標題 Urinary Exosomal mRNA of WT1 as Diagnostic and Prognostic Biomarker for Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 208 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.65.208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Hideharu, Sakurai Akiko, Ochi Arisa	4. 巻 508
2. 論文標題 Induction of steady-state glomeruloid sphere by self-assembly from human embryonic kidney cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 654 ~ 659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小笠真琴、櫻井明子、片岡佳子、越智ありさ、安部秀斉
2. 発表標題 ヒト尿沈渣中のCXC Chemokine Receptor遺伝子発現について
3. 学会等名 徳島県医学検査学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井明子、越智ありさ、安部秀斉
2. 発表標題 ポドサイト障害における尿中バイオマーカーWT1・CXCR4による各種腎疾患の評価
3. 学会等名 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智ありさ、櫻井明子、安部秀斉
2. 発表標題 iPS/ES細胞を用いない、腎臓病治療薬HTPのための腎系球体スフェロイド開発
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智ありさ、櫻井明子、安部秀斉
2. 発表標題 iPS/ES細胞を用いない、糸球体スフェロイド作成
3. 学会等名 徳島医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	安部 秀斉  (ABE Hideharu)  (60399342)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授   (16101)	
研究分担者	冨永 辰也  (TOMINAGA Tatsuya)  (80425446)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授   (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------