

平成22年5月18日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590972
 研究課題名(和文) 慢性腎疾患におけるインテグリンの病態生理学的役割の解明とその制御による治療への応用
 研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiological roles of integrins and therapeutic application by regulating integrins in chronic kidney disease
 研究代表者
 田村 雅仁 (TAMURA MASAHIRO)
 産業医科大学・大学病院・准教授
 研究者番号：40330980

研究成果の概要(和文)：各種腎疾患において生じる細胞外基質のリモデリングによりインテグリンを介した細胞内シグナルや遺伝子発現の変化が、病態の進展にどのような影響を与えるのか検討した。その結果、各種腎疾患においてみられる $\beta 1$ integrinの発現亢進が、ICAM-1やco-stimulatory factorであるCD80の発現を介し、炎症細胞浸潤やリンパ球の活性化を引き起こし腎疾患の進展に影響を与えていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the modulatory effects of extracellular matrix (ECM) accumulation on the expression of cell adhesion molecules involved in the progression of renal diseases. Our results suggest that accumulation of pathological ECM components such as type I and III collagens might play a role in the progression of glomerular diseases by enhancing ICAM-1 expression and leukocyte adhesion to mesangial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：インテグリン、慢性腎臓病、Focal adhesion kinase、細胞接着分子、慢性腎炎

1. 研究開始当初の背景

慢性糸球体腎炎に加え近年の糖尿病性腎症の増加による慢性腎不全患者数の増加のため、我が国では毎年約3万人以上にも及ぶ新規の維持透析導入があり、慢性腎臓病の進展機序の解明と有効な治療法の確立が渴望されている。各種腎疾患の進展過程において共通して観察される現象の一つに、糸球体や尿細管間質領域への炎症細胞浸潤がある。単球やマクロファージは各種成長因子やケモカインの発現亢進を生じ、これらは最終的に細胞外基質の異常蓄積を引き起こし糸球体硬化や尿細管間質の線維化へと進展するものと考えられている。インテグリンは細胞表面に存在する α 鎖と β 鎖からなる受容体で、細胞を他の細胞と、あるいは細胞と細胞外基質とを物理的に結合させる働きを持ち、炎症細胞の局所への浸潤や細胞構築の維持に重要な役割を果たしている。各種ヒト腎疾患や実験腎炎においても実際にI型、III型、IV型コラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンといった細胞外基質の発現亢進が見られることや、これらに対する受容体である $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 1$ などのインテグリンの発現も同時に発現が亢進することが報告されている。これらのことは各種腎疾患で見られる細胞外基質の異常なリモデリングは、インテグリンとの相互作用により様々な細胞生物学的な変化を引き起こしていることを示唆している。しかし、実際に各種腎疾患において、増加した細胞外基質とインテグリンにより生じた細胞内シグナルや遺伝子発現の変化が、病態の進展にどのような影響を与えているのかはこれまでほとんど知られていない。

2. 研究の目的

今回の我々の研究は、各種腎疾患において観察される細胞外基質の増加が、メサンギウム細胞をはじめとする糸球体細胞や尿細管上皮細胞の細胞内シグナル伝達経路の活性化とそれにより生じる様々な遺伝子の発現に与える影響について検討することにより腎疾患の進展における細胞外基質と接着因子の病態生理学的役割の解明を行うことと、この細胞接着に中心的な役割を果たしている接着分子であるインテグリンによる細胞内シグナル伝達の制御により炎症や線維化を阻止することが出来るかどうかを検討することにより、慢性腎臓病におけるインテグリン制御による治療への応用の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)インテグリンによる細胞内シグナル伝達および遺伝子発現の研究

培養ヒトメサンギウム細胞などを用い、インテグリンを介した細胞接着がFAKを中心としたインテグリンシグナル伝達経路と各遺伝子発現に与える影響を検討する。

①細胞外基質 (fibronectin, laminin, collagen type I, III, IV など) への細胞接着により生じる後述の細胞内シグナル伝達経路の活性化につい

て検討する。

②同様に $\beta 1$ インテグリン (mAb13) や $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 αv インテグリンなどを特異的に活性化する抗体を用いてインテグリンを刺激し、インテグリンのサブユニットの違いによるシグナルの変化があるかどうかを見る。

③インテグリン活性化による細胞内シグナル伝達系の活性化について検討する。

④上記の細胞外基質や特異的インテグリン刺激抗体による遺伝子の発現をICAM-1、Fas、CD44、VCAM-1などにつき、FACSscanなどで調べる。

(2)インテグリンシグナリング制御方法の検討。インテグリンによる細胞内シグナルの活性化(あるいは抑制)方法の検討を行う。

①インテグリン特異的結合モチーフとして最近報告されたインテグリン活性化PHSRNペプチドとこれらの不活化ペプチドなどによる影響を各々比較検討する。

②PHSRNペプチドが線維化に与える影響を検討する。

4. 研究成果

培養ヒトメサンギウム細胞で各種細胞接着分子の発現をFACSscanで検討した。 $\beta 1$ integrin 特異刺激抗体(mAb13)により $\beta 1$ integrin の刺激を行なった。[結果]静止期のメサンギウム細胞において $\alpha 2$ 、3、4、5、 $\beta 1$ integrins、CD44、CD80の恒常的な発現を認めた。 $\alpha 6$ 、 v 、 $\beta 3$ integrins、ICAM-1、Fasはわずかに発現していたが、 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ integrins、VCAM-1、CD40、CD40L、CD86は発現していなかった。 $\beta 1$ integrin 活性化によりICAM-1とCD80のみ発現が亢進した。MHC class IやICAM-1、VCAM-1などの刺激ではICAM-1などの発現に影響を与えなかった。以上より、各種腎疾患においてみられる $\beta 1$ integrin の発現亢進は、ICAM-1やco-stimulatory factorであるCD80の発現を介し、炎症細胞浸潤やリンパ球の活性化を引き起こし腎疾患の進展に影響を与えている可能性が示唆された。

ラットの腹膜中皮細胞層を剥離して急性腹膜障害を惹起し、腹膜透析液を連日腹腔内に注入して作成した急性腹膜障害モデルにおいて、組織学的検討を行った。また、培養ラット腹膜中皮細胞を用いて高糖濃度による創傷治癒遅延効果に対するPHSRNの影響をin vitro wound healing assay法、proliferation assay法で検討した。その結果、PHSRNにより創傷治癒が有意に促進した。中皮下組織では透析液により細胞数及びED-1陽性マクロファージ数、CD31陽性血管数、 α SMA陽性細胞数が増加していたが、PHSRNにより改善した。RPMC及びNRKにおいてPHSRNはブドウ糖による腹膜中皮細胞の遊走能阻害作用を軽減した。さらに、PHSRNはFAK、p130^{Cas}のリン酸化を有意に増加させた。以上より、インテグリン活性化ペプチドPHSRNが腹膜組織再生に有効であることが本研究により初めて示された。

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 Tokunaga M, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Matsumoto M, Miyamoto T, Miyazaki M, Furuno Y, Nakamata J, Fujimoto Y, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y, Tamura M: Renoprotective effects of telmisartan in patients with advanced chronic kidney disease. *Clin Nephrol*, 査読有, 73(2): 2010, 139-146
- ② Miyamoto T, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Furuno Y, Miyazaki M, Baba R, Sato N, Doi Y, Okazaki M, Otsuji Y: An integrin-activating peptide, PHSRN, ameliorates inhibitory effects of conventional peritoneal dialysis fluids on peritoneal wound healing. *Nephrol Dial Transplant*, 査読有, 25(4):2010, 1109-1119
- ③ Miyazaki M, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Miyamoto T, Furuno Y, Nishio T, Ohara J, Sakurai T, Otsuji Y: Minimal change nephrotic syndrome in a patient with stronglyloidiasis. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 2010, in press
- ④ Tokunaga M, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Matsumoto M, Miyamoto T, Miyazaki M, Furuno Y, Fujimatsu S, Muta T, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y: A case report of steroid-resistant ANCA-related vasculitis successfully treated by mizoribine in a hemodialysis patient. *Ther Apher Dial*, 査読有, 13(1): 2009, 77-79
- ⑤ Nagatomo T, Abe H, Kohno R, Toyoshima T, Fujimoto H, Kondo S, Kabashima N, Takeuchi M, Tamura M, Okazaki M, Otsuji Y: Electromagnetic Interference with a bipolar pacemaker by an induction heating (IH) rice cooker. *Int Heart J*, 査読有, 50(1): 2009, 133-137
- ⑥ Shibata T, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Tokunaga M, Matsumoto M, Miyamoto T, Miyazaki M, Furuno Y, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y: Fluvastatin attenuates IGF-1-induced ERK1/2 activation and cell proliferation by mevalonic acid depletion in human mesangial cells. *Life Sci*, 査読有, 84: 2009, 725-731
- ⑦ Matsumoto M, Tamura M, Komiya T, Aridome G, Narita R, Hisaoka M, Ohtsuki M, Otsuji Y: Hepatic angiosarcoma - a rare liver tumor in a hemodialysis patient. *Clin Nephrol*, 査読有, 71(5): 2009, 590-592
- ⑧ Takemasa H, Nagatomo T, Abe H, Kawakami K, Igarashi T, Tsurugi T, Kabashima N, Tamura

- M, Okazaki M, Delisle BP, January CT, Otsuji Y: Coexistence of hERG current block and disruption of protein trafficking in ketoconazole-induced long QT syndrome. *Br J Pharmacol*, 査読有, 153(3): 2008, 439-447
- ⑨ Tokunaga M, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Matsumoto M, Miyamoto T, Miyazaki M, Furuno Y, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y: Falecalcitriol for conventional vitamin D therapy-resistant secondary hyperparathyroidism in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient. *Clin Nephrol*, 査読有, 69(5): 2008, 393-394
 - ⑩ Tokunaga M, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Matsumoto M, Miyamoto T, Miyazaki M, Furuno Y, Nakamata J, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y: Mizoribine for relapsed proteinuria in an adult IgA nephropathy patient. *Clin Nephrol*, 査読有, 70(5): 2008, 445-446
 - ⑪ Koide S, Okazaki M, Tamura M, Ozumi K, Takatsu H, Kamezaki F, Tanimoto A, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y: PTEN reduces cuff-induced neointima formation and proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 査読有, 292(6): 2007, H2824-2831

[学会発表] (計 181 件)

- ① Tamura M, et al. Effects of Icodextrin on the Integrin-Mediated Wound Healing of Peritoneal Mesothelial Cells, Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2009年10月31日, San Diego, USA

[図書] (計 9 件)

- ① 田村雅仁、宮本哲: Icodextrin 透析液の生体適合性、Annual Review 腎臓 2009、査読有、中外医学社、2009、pp158-165

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 雅仁 (TAMURA MASAHIRO)
産業医科大学・大学病院・准教授
研究者番号：40330980

(2) 研究分担者

芹野 良太 (SERINO RYOTA)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：00309957

(3) 連携研究者

なし