

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08723

研究課題名（和文）難治性腎疾患におけるCaMK4を介した新規ポドサイト特異的治療法の開発

研究課題名（英文）Novel CaMK4-mediated podocyte-specific therapy in refractory renal disease

研究代表者

前田 佳哉輔（Maeda, Kayaho）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00836306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：難治性ネフローゼ症候群である巣状分節性糸球体硬化症におけるCaMK4の役割の解明と、ポドサイト特異的治療の開発にとりくんだ。ポドサイト特異的CaMK4欠損マウスを使用した結果などからポドサイト内のCaMK4がポドサイト細胞死に関与し、より蛋白尿を誘導することが示された。CaMK4阻害薬を使用したポドサイト指向性ナノ粒子は、ナノ粒子なしの投与時より明らかな有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年増加している慢性腎臓病は、心血管系の病気のリスクを上昇させ、進行に伴い維持透析療法が必要になる。その進行予防にはポドサイト（糸球体上皮細胞）の恒常性の維持も重要な要素となる。本研究では、不可逆性のポドサイト傷害をおこす難治性ネフローゼ症候群の進展にCaMK4が重要であることが示され、ポドサイト指向性ナノ粒子の可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the role of CaMK4 in refractory nephrotic syndrome such as focal segmental glomerulosclerosis, and developed podocyte-specific therapy. The findings using podocyte-specific CaMK4-deficient mice showed that CaMK4 in podocytes is involved in podocyte cell death and induces more proteinuria, and podocyte-directed nanoparticles with a CaMK4 inhibitor showed the efficacy compared to administration without nanoparticles.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ポドサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に増加する慢性腎臓病(CKD)は、透析治療を含め医療経済上大きな問題となっている。ポドサイトは、糸球体の濾過機能や恒常性の維持に重要な役割をもつ。持続するポドサイト傷害は、糸球体硬化そして慢性腎不全へと進行する CKD の共通のメカニズムであり、ポドサイトを直接標的とした治療は国際的に望まれる。カルシウムイオン(Ca^{2+})チャネルの変異が難治性ネフローゼ症候群の病態に寄与することから、 Ca^{2+} 依存性シグナルの制御は臨床的有用性が高いと考えるが、代表的な阻害薬であるカルシニューリン阻害薬の治療効果は充分でない。今回、新たな治療標的とする Ca^{2+} 依存性シグナルとして、CaMK4(Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼ)に着目する。申請者らは、ループス腎炎において、CaMK4がポドサイトに強く発現し、運動能亢進・アクチン細胞骨格の再構成を介してポドサイト障害に関与する知見を得ている。そして、世界に先駆けて、ポドサイトを直接ターゲットとするデリバリーシステムを作成し、ポドサイト特異的 CaMK4 阻害薬(KN93)治療が、劇的に蛋白尿を改善することを報告した(申請者 J Clin Invest. 2018)。これらの知見を発展させ、「進行性腎障害に共通するポドサイト障害に対して、CaMK4 は有効な新規治療標的となりうるか」について検証をすすめる。

2. 研究の目的

本研究では、難治性腎疾患(治療抵抗性ネフローゼ症候群、進行性半月体形成性腎炎)を標的とした治療応用を見据え、下記を目的とし、CaMK4 シグナルの機能解析をすすめる。

- (1) ポドサイト内の CaMK4 を介した治療抵抗性ネフローゼ症候群における機能解明。
- (2) 難治性腎疾患に対する、CaMK4 をターゲットとしたポドサイト特異的治療の開発。

3. 研究の方法

野生型、ポドサイト特異的 CaMK4 欠損マウスに FSGS マウスモデル(アドリアマイシン誘導性腎障害モデル)を作製する。アドリアマイシンを尾静注し、14 日後、28 日後に屠殺し腎臓を採取。糸球体を中心とした病理組織学的な解析を行う。また、同時に 7、14、28 日後の血清、尿を採取し、蛋白尿や腎機能の推移について検討する。ポドサイト特異的治療については、10 μg の CaMK4 阻害薬(KN93)を入れたナノ粒子に、ポドサイトのマーカーであるネフリン、ポドシン各抗体をコートしたものを作製する。前述したアドリアマイシン誘導性腎障害モデルに対して、このポドサイト特異的 CaMK4 阻害薬(KN93)治療を、尾静注する前日から(予防的治療)もしくは静注後 7 日目から(発症後の治療)週 1 回のペースで腹腔内投与を行い、同量(10 μg)の KN93 単体を全身投与した群と比較検討する(蛋白尿、腎機能、ポドサイト障害の程度など)。

In vitro においても、ヒトポドサイト細胞株を使用して、CaMK4 の機能解析を行う。刺激剤としては in vivo と同様にアドリアマイシンを使用し、CaMK4 siRNA の投与の有無におけるポドサイト傷害の解析を行う。ポドサイト傷害の評価系としては、ポドサイト特異的マーカーであるネフリンの発現の程度や、傷害により誘導されるアクチン細胞骨格の再構成の程度を確認する。

4. 研究成果

(1) アドリアマイシン誘導性腎障害モデルにおいて CaMK4 の発現は上昇する。

ポドサイト特異的 CaMK4 欠損マウス (*CaMK4^{lox/lox}NPHS2^{Cre+}*) とそのコントロールマウス (*CaMK4^{lox/lox}NPHS2^{Cre-}*) にアドリアマイシン誘導性腎障害を作成した。通常の野生型と同様にコントロールマウスにおいても、糸球体内においてポドサイト内 CaMK4 の発現上昇を認めた。

(2) ポドサイト特異的な CaMK4 欠損はアドリアマイシンによるポドサイト傷害を改善する。

アドリアマイシン投与後 7、14 日後の尿蛋白、14 日後の腎組織と WT1 染色によりポドサイトの糸球体内の数の評価を行った。ポドサイト特異的 CaMK4 欠損マウスにおいては、有意に蛋白尿の改善を認め、コントロールマウスにおいて WT1 陽性ポドサイトの数の低下がみられたのに対して欠損マウスにおいてはポドサイトの数は保たれていた。これはアドリアマイシンに伴うポドサイトの細胞死に CaMK4 が関与していることが示唆された。

(3) CaMK4 はネフリンの発現を減弱し、ポドサイトの細胞骨格破壊を促進する。

アドリアマイシン誘導性腎症においては、コントロールマウスにおいてはポドサイトマーカーであるネフリンの発現が低下しているのに対して、欠損マウスにおいては発現が保たれていた。 *In vitro* の実験においてもアドリアマイシン誘導性のポドサイト細胞骨格の破壊や、ポドサイトマーカーであるネフリンの発現低下を CaMK4 の knock down によって軽減することができた。

(4) CaMK4 はアドリアマイシンによるアポトーシスを誘導する。

アドリアマイシン投与によりポドサイト内の cleaved caspase 3 の発現が上昇するが、CaMK4 siRNA 投与によりその発現が低下した。

(5) ポドサイト指向性ナノ粒子を使用した CaMK4 阻害薬は高い有効性を示した。

ポドサイト指向性ナノ粒子に CaMK4 阻害薬 (KN93) を封入したものを作成、アドリアマイシン作成前に予防的に投与する群と、蛋白尿出現後に治療的介入を行う群を設定した。コントロールの治療としてはナノ粒子に封入したものと同等のフリーの KN93 を用意した。予防的治療も蛋白尿出現後の介入どちらにおいても、コントロールと比較して有意に蛋白尿を改善し有効性を示した。

(6) FSGS 患者のポドサイトにおいて CaMK4 と同様に上流の CaMKK の発現上昇もみられた。

CaMK4 関連シグナルの解明のため、上流の CaMK キナーゼ (CaMKK) とファミリー分子である CaMK2 の発現をヒト FSGS の腎生検検体を用いて行った。ヒト FSGS ではポドサイト上の CaMKK と CaMK4 の発現上昇を認めたが、CaMK2 の糸球体内発現はみられなかった。

(7) CaMKK1/2 ダブル欠損マウスや、CaMKK 阻害薬投与では蛋白尿は改善しなかった

CaMKK-CaMK4 シグナル解析のため、前述のアドリアマイシン誘導性のモデルに対して CaMKK 阻害薬治療を行ったが、コントロール群と比べて有意に蛋白尿の改善がみられなかった。同様に CaMKK1/2 ダブル欠損マウスにおいても野生型との比較において蛋白尿に差はみられなかった。これはポドサイトにおいて CaMKK の二つあるアイソフォーム各々に CaMK4 活性化以外の役割があるものと考えられ、今後の検討課題である。

以上、本研究から、FSGS におけるポドサイト内の CaMK4 の重要性とポドサイト指向性ナノ粒子の有効性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	丸山 彰一 (Maruyama Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	古橋 和拡 (Furuhashi Kazuhiro) (50835121)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	勝野 敬之 (Katsuno Takayuki) (60642337)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	
研究分担者	小杉 智規 (Kosugi Tomoki) (90584681)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	加藤 規利 (Kato Noritoshi) (90716052)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	

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
---------	---------