

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17701

研究課題名（和文）Integrinを標的とした糸球体硬化進展の新規機序解明と特異的治療の開発

研究課題名（英文）Targeting integrins as a novel mechanism for progression of glomerulosclerosis

研究代表者

原 怜史（Hara, Satoshi）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80749820

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）：ヒト腎糸球体においてはgalectin-8がポドサイトにおいてわずかに発現しており、RNAシーケンシングによりgalectin-8 isoform aであることが明らかになった。また、様々な糸球体疾患でgalectin-8の発現を検討したところIgA腎症のみならず、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、糖尿病性腎症、良性腎硬化症、ループス腎炎と多様な糸球体疾患において糸球体ポドサイト、一部は血管内皮細胞において亢進していた。以上より、galectin-8のポドサイトにおける発現亢進は疾患特異的な現象というよりも、蛋白尿が出現するような状況においてみられると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸球体硬化は様々な腎疾患の終末像であり、慢性腎臓病を呈することで生命予後を低下させる。糸球体硬化は糸球体の臓側上皮細胞（ポドサイト）の傷害および糸球体基底膜からの剥離が起点となることから、糸球体ポドサイトの傷害と剥離は糸球体硬化の病態形成に重要である。

本研究はポドサイトに発現している接着分子であるintegrinのリガンドであるgalectin-8に着目し、蛋白尿が出現する様々な糸球体疾患においてgalectin-8蛋白の発現が糸球体ポドサイトにおいて亢進していることを明らかにした。今後、その役割をさらに解明することにより糸球体硬化進展予防のための新規治療へ繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the human glomeruli, galectin-8 was expressed slightly in podocytes, and RNA sequencing revealed that it is galectin-8 isoform a.

Additionally, immunofluorescence for galectin-8 unveiled that galectin-8 was strongly expressed not only in IgA nephropathy but also in minimal change disease, focal segmental glomerulosclerosis, membranous nephropathy, diabetic nephropathy, benign nephrosclerosis, and lupus nephritis, with glomerular podocytes and partially in vascular endothelial cells. These findings suggested that the increased expression of galectin-8 in podocytes is observed in situations where proteinuria occurs, rather than being a disease-specific phenomenon.

研究分野：腎臓病理、慢性腎臓病、自己免疫疾患

キーワード：ポドサイト galectin-8

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糸球体硬化は慢性糸球体腎炎や高度の蛋白尿を呈するネフローゼ症候群といった様々な腎疾患の終末像であり、糸球体濾過が出来なくなることによって腎機能低下をきたし、慢性腎臓病を呈することで生命予後を低下させる。糸球体硬化を形成する機序として、糸球体の臓側上皮細胞(ポドサイト)の傷害および糸球体基底膜からの剥離が起点となって蛋白尿が出現し、徐々にポドサイト剥離部分の糸球体係蹄に細胞外基質蛋白が蓄積することで硬化病変が形成される。このように糸球体ポドサイトの傷害と剥離は糸球体硬化の病態形成に重要である。

ポドサイトが糸球体基底膜へ接着した状態を維持するためには integrin が重要な役割を果たしている。Integrin は I 型膜貫通型蛋白で、組織特異的に  $\alpha\beta$  のヘテロ接合体を形成し、主に細胞と基質の接着を担っている。ポドサイトには integrin  $\alpha3\beta1$  が多く発現しており、実験的に integrin  $\alpha3\beta1$  を不活性化させるとポドサイトが剥離し、糸球体硬化性病変が形成されたり、integrin  $\alpha3$  を欠損したヒトでは先天性のネフローゼ症候群を呈する。しかしながら integrin  $\alpha3\beta1$  を標的にした特異的治療へはまだ繋がっておらず、また他にポドサイトに存在している integrin  $\alpha6\beta1$ 、 $\alpha2\beta1$ 、 $\alpha v\beta3$  の機能は十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、integrin  $\alpha3\beta1$  や  $\alpha6\beta1$  をリガンドとするレクチンである galectin-8 に着目し、ポドサイト障害を呈する慢性腎臓病における意義を明らかにすることである。代表的な慢性糸球体腎炎であるヒト IgA 腎症においては galectin-8 の関与が示唆されているが、他の糸球体疾患においてはこれまで不明である。糸球体における integrin  $\alpha6\beta1$  の不活性化は蛋白尿ひいては糸球体硬化へ関与している可能性があり、そのリガンドである galectin-8 は integrin  $\alpha6\beta1$  に対して調節的な役割を持つ可能性があるため、本研究でその機能を解析することにより galectin-8 が治療のターゲットとなりうると考えられる。

我々は、様々な糸球体疾患の進展過程において galectin-8 がどのような役割を有するのかを解明することを目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 正常糸球体における galectin-8 の発現

正常糸球体において galectin-8 が発現しているかどうかを明らかにするため、ヒト健常腎組織を用いて蛍光免疫染色を行った。また、ヒトおよびマウス不死化培養ポドサイトの RT-PCR および RNA シークエンスで galectin-8 mRNA の発現およびアイソフォームを確認した

#### (2) 様々な糸球体疾患における galectin-8 の蛋白発現

様々な糸球体疾患における galectin-8 の発現を確認するため、ヒト腎生検組織を用いて galectin-8 の蛍光免疫染色を行った。

#### (3) 培養ポドサイトを用いた in vitro 実験

ヒト培養ポドサイトを用いてポドサイト障害時に galectin-8 の発現がどのように変化するかをウェスタンブロットングで検討した。

#### (4) ポドサイトにおける integrin $\alpha6\beta1$

EA-1 ハイブリドーマを用いて抗 integrin  $\alpha6\beta1$  抗体を産生・精製し、マウスおよび培養ポドサイトへ投与し、galectin-8 やポドサイトにどのような影響があるかを試みた。

### 4. 研究成果

まず、正常糸球体において galectin-8 が発現するかどうかを明らかにするため、ヒト健常腎組織を用いて galectin-8 の蛍光免疫染色を行い、ポドサイトにおいてわずかに発現することがわかった。これを確認するために、ヒトおよびマウス不死化培養ポドサイトの RT-PCR を実施したところ galectin-8 mRNA の存在を確認でき、RNA シークエンスにより galectin-8 isoform a であることが明らかになった。

次に、様々な糸球体疾患における galectin-8 の蛋白発現を確認するため、ヒト腎生検組織を用いて galectin-8 の蛍光免疫染色を行った。その結果、IgA 腎症のみならず、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、糖尿病性腎症、良性腎硬化症、ループス腎炎と多様な糸球体疾患において galectin-8 蛋白の発現が糸球体ポドサイト、一部は血管内皮細胞において亢進していることが分かった。これらのことから、galectin-8 のポドサイトにおける発現亢進は IgA 腎症の疾患特異的な現象というよりも、蛋白尿が出現するような状況においてみられると考えられた。仮説として、ポドサイトにストレスがかかったり障害される状況において

galectin-8 が発現し、ポドサイトに対して保護的ないし侵襲的な役割を有すると考えられた。

この仮説を検証するために、ヒト培養ポドサイトにアドリアマイシンを投与してポドサイトを障害させた際に、ポドサイトの galectin-8 発現が亢進するかどうかをウエスタンブロッティングで検討した。その結果、アドリアマイシン投与 12 時間、24 時間と時間が経つにつれてポドサイトにおける galectin-8 の発現が低下していた。これらのことからポドサイトが壊死するような状況よりも軽度のポドサイト障害において galectin-8 が亢進すると考えられた

さらに、ポドサイトにおける integrin  $\alpha 6\beta 1$  の機能を明らかにするために EA-1 ハイブリドーマを用いて抗 integrin  $\alpha 6\beta 1$  抗体を産生・精製し、マウスおよび培養ポドサイトへ投与することにより galectin-8 やポドサイトにどのような影響があるかを試みた。しかしながら EA-1 ハイブリドーマによる抗 integrin  $\alpha 6\beta 1$  抗体の産生量が当初の想定よりも少なく、投与実験を実施することができなかった。

以上より、本研究により蛋白尿が出現する多様な糸球体疾患において galectin-8 蛋白の発現が糸球体ポドサイト、一部は血管内皮細胞において亢進していることが明らかになった。ポドサイトが壊死するような状況よりも軽度の障害において galectin-8 の発現が亢進する可能性があるが、その役割や integrin  $\alpha 6\beta 1$  との関連についてはさらなる研究が必要と考えられた。

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
研究協力者	川野 充弘  (Kawano Mitsuhiro)		
研究協力者	出井 章三  (Izui Shouzo)		
研究協力者	伊藤 清亮  (Ito Kiyooki)		
研究協力者	蔵島 乾  (Zoshima Takeshi)		

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