

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591277

研究課題名（和文）小児の難治性糸球体腎炎におけるHic-5の役割解明

研究課題名（英文）The role of Hic-5 in intractable glomerulonephritis in children

研究代表者 近藤 秀治 (KONDO SHUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00380080

研究成果の概要（和文）：

本研究ではHic-5の糸球体発現と糸球体細胞機能(増殖、接着、遊走等)への影響の有無を検討した。ヒト小児及びラット腎炎組織でHic-5の糸球体内発現が亢進し、メサンギウム細胞増殖やECM蓄積と相関がみられ、Hic-5が腎炎進展に関与する可能性が示された。培養メサンギウム細胞では、TGF- β がHic-5の発現を亢進させ、siRNAによるHic-5の発現抑制はECMリモデリングを抑制した。以上からHic-5は腎炎進展に関与し、その制御による治療応用が期待された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research is to clarify the expression of Hic-5 in nephritic glomeruli and how Hic-5 affects mesangial cell (MC) function. Immunohistochemistry showed that the expression of Hic-5 was increased in MC in human and rat mesangial proliferative glomerulonephritis (GN). Hic-5 expression was significantly correlated with extracellular matrix (ECM) accumulation and glomerular cell number in patients and GN rats. TGF- β up-regulated Hic-5 protein levels by human cultured MCs. Knockdown of Hic-5 by siRNA reduced ECM remodeling in collagen gels. Thus, our findings suggest that Hic-5 is involved in the development of glomerulonephritis. Controlling Hic-5 activity might be a therapy strategy for GN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学

細胞・組織 シグナル伝達 細胞接着分子 糸球体腎炎 病理学

1. 研究開始当初の背景

小児の代表的腎疾患であるIgA腎症や紫斑病性腎炎では、病初期よりメサンギウム細胞増

殖を認め、腎炎の進展とともにメサンギウム基質が増加することを特徴とする。メサンギウム基質の増加はファイブロネクチンやコ

ラーゲン等の細胞外基質 (ECM) の産生増加と蓄積によるが、実際には、ECM の構築が不可逆性の病的状態に再構築 (リモデリング) されることが重要である。硬化糸球体や線維性半月体等の慢性病変を伴う症例では、治療後も蛋白尿が残存し、腎不全への進展が不可避である。我々は、糸球体や腎間質の慢性病変での ECM の異常なリモデリングに、ECM 受容体インテグリンが関わっていること、アンジオテンシン II、活性酸素、TGF- β が ECM リモデリングに関与していることを示してきた。従って、TGF- β や活性酸素等によって誘導される細胞接着関連蛋白が、ECM リモデリングに関与すると仮定した。Hic-5 は、55kDa のパキシリンに類似構造をもつ細胞接着斑蛋白であり、TGF- β に誘導されるだけでなく、FAK とパキシリンの結合を阻害することにより ECM リモデリングに影響することが明らかとなってきた。しかし、腎疾患における役割は未だ不明である。糸球体硬化進展の機序を明らかにするために、Hic-5 とインテグリン関連蛋白の接着斑での役割を明らかにすることが必要不可欠である。

2. 研究の目的

小児の難治性糸球体腎炎やラット進行性腎炎において Hic-5 の糸球体での発現と局在を明らかにし、同時に培養メサンギウム細胞等を用いて細胞の機能 (増殖、接着、遊走等) への影響の有無を調べることにより、糸球体腎炎進展における Hic-5 の役割を検討する。Hic-5 を制御するシグナル解析を通じて、実験を通じて糸球体腎炎での Hic-5 関連 ECM リモデリングの機序を明らかにする。

3. 研究の方法

1) ヒト及びラット腎炎での Hic-5 の免疫組織化学的検討

小児の進行性腎疾患 (IgA 腎症、紫斑病性腎炎、巣状糸球体硬化症) の症例やそれらと同様の組織像を呈するラット進行性腎炎モデル (片腎 Thy-1 腎炎) の腎組織を用いて、インテグリンシグナルが深く関与するメサンギウム細胞増殖と ECM リモデリングを示す部位における Hic-5 を機転とする細胞接着斑関連蛋白の発現を検索する。

ヒト腎炎組織は、インフォームドコンセントを得て腎生検を施行し、病名診断を終了し承諾を得た組織標本を用いる。ラット進行性メサンギウム増殖性腎炎の作成は、6 週齢の SD ラットの左腎を摘出後、抗 Thy-1 抗体を尾静脈から投与し、糸球体メサンギウム細胞障害とそれに続く細胞増殖を引き起こす。0, 3, 1, 2, 4, 8, 14 週で採尿、採血、組織を採取して、尿蛋白、腎機能、病理組織を評価する。組織を採取する際は、パラフィン切片と凍結切片を用いる。免疫染色は、酵素抗体法 (ABC 法) や蛍光抗体法を施行する。

また、他の Hic-5 関連蛋白 (FAK、パキシリン)、ECM 蛋白 (コラーゲン、フィブロネクチン) 等も免疫染色を行い、その関連性を探る。2) 培養メサンギウム細胞を用いた Hic-5 の発現及び機能解析

Hic-5 の発現が、コラーゲンやインテグリンを介して変化するかを明らかにする。培養細胞を用いた、Hic-5 蛋白・遺伝子の発現解析は主にウェスタンブロット法とリアルタイム RT-PCR 法を用いて行う。

増殖因子や ECM からの情報伝達が Hic-5 の発現の変化を通じて細胞機能にどのように影響するかを調べる。また、Hic-5 の発現によるメサンギウム細胞の機能 (増殖、接着、遊走等) への影響の有無を siRNA 等を用いた抑制実験を通じて Hic-5 の糸球体細胞での影響を明らかにする。

4. 研究成果

1) ヒト及びラット腎炎での Hic-5 の免疫組織化学的検討

小児の進行性腎疾患 (IgA 腎症、紫斑病性腎炎、巣状糸球体硬化症) の症例やラット進行性腎炎モデル (片腎 Thy-1 腎炎) の腎組織の腎炎糸球体では Hic-5 の発現が亢進し、メサンギウム細胞増殖や ECM 蓄積との相関がみられ、Hic-5 が腎炎進展に関与する可能性が示された。さらに、Hic-5 の発現が活性化メサンギウム細胞マーカーである α 平滑筋アクチンの発現と相関し腎炎の活動期に強く発現することが判明した。ヒトとラットの臨床データに関して尿蛋白とも Hic-5 は相関し臨床病像とも関連した。

2) 増殖因子刺激下での細胞培養実験や抗酸化剤を用いた動物実験での Hic-5 の発現

我々は、ヒト及びラットメサンギウム細胞の培養細胞を用いて、TGF- β 等の増殖因子が Hic-5 の発現を亢進させるかを検討した。TGF- β は、濃度依存性及び時間依存性に Hic-5 の発現を亢進させた。また、ラットの腎炎モデルにアンジオテンシン阻害剤や抗酸化剤を使用して活性酸素を抑制することにより Hic-5 の発現が低下したことから腎炎進行因子が Hic-5 の発現に影響することが明らかとなった。一方、強力な増殖因子である PDGF-BB は、逆に Hic-5 の発現を低下させた。共焦点顕微鏡を用いた Hic-5 の発現検討では、細胞接着部位でパキシリンなどと協調して作用する可能性があることが分かった。

腎炎進展でみられる Hic-5 の発現と役割が腎臓の発生過程でも共通しているかを確認したところ、Hic-5 の発現は未分化メサンギウム細胞にみられ、この発現は Hic-5 と構造が類似するパキシリンや関連蛋白である FAK、ILK の発現と全く異なるものであった。さらに、Hic-5 の活性化誘導分子である活性酸素とその産生機構 NADPH オキシダーゼの発現も調べたが、実際に Hic-5 の発現だけでなく活性酸素も腎発生で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。このことから Hic-5 や Hic-5 誘導因子である活性酸素の適切な調整が腎臓発生に重要であるだけでなく、腎炎進展を抑制しうる重要な機構であることが推測された。

siRNA を用いた Hic-5 の発現制御実験では、Hic-5 発現は細胞接着分子の機能に影響しコラーゲングル収縮に関与することが明らかとなり、現在 Hic-5 ノックアウトマウスを用

いて腎炎モデルでの検討を進めている。

今後、この研究で得られた成果が、動物実験腎炎モデルで、Hic-5 と細胞接着斑蛋白の結合阻害ペプチドやHic-5 ノックアウトマウスを用いることによりHic-5 発現及び活性の制御による治療応用の可能性を検討している。

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. Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, Shimizu M, Nishiyama A, Kawachi H, Kagami S. Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular RAS activation, oxidative stress, and glomerular injury in crescentic glomerulonephritis. *Translational Res* 2011 査読有 (in press)
2. Shimizu M, Sekiguchi T, Kishi N, Goji A, Takahashi T, Kozan H, Sakaguchi Z, Kinoshita Y, Matsuura S, Suga K, Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Ohara K. A case of a 6-year-old girl with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*. 2011 査読有 (in press)
3. Kondo S, Urushihara M, Kagami S. Progress of pediatric nephrology. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 査読有 2011;53(1):10-4
4. Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kondo S, Kinoshita Y, Suga K, Kitamura A, Matsuura S, Yoshizumi M, Tamaki T, Kawachi H, Kagami S. ERK5 activation enhances mesangial cell viability and collagen matrix accumulation in rat progressive glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有 298:F167-176, 2010
5. Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Kobori H. Urinary angiotensinogen accurately reflects intrarenal Renin-Angiotensin system activity. *Am J Nephrol*. 査読有 31:318-325, 2010
6. Suga K, Kondo S, Matsuura S, Kinoshita Y, Kitano E, Hatanaka M, Kitamura H, Hidaka Y, Oda T, Kagami S. A case of dense deposit disease associated with a group A streptococcal infection without the involvement of C3NeF or complement factor H deficiency. *Pediatr Nephrol*. 査読有 25:1547-1550, 2010
7. Oto J, Suga K, Matsuura S, Kondo S, Ohnishi Y, Inui D, Imanaka H, Kagami S, Nishimura M. Low-density lipoprotein apheresis in a pediatric patient with refractory nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis. *J Anesth*. 査読有 23:284-287, 2009
8. Kondo S, Oakes MG, Sorenson CM. Rescue of renal hypoplasia and cystic dysplasia in Bcl-2 -/- mice expressing Bcl-2 in ureteric bud derived epithelia. *Dev Dyn*. 査読有 2008;237:2450-9.
9. Kondo S, Tang Y, Scheef EA, Sheibani N, Sorenson CM. Attenuation of retinal endothelial cell migration and capillary morphogenesis in the absence of bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 査読有 294: C1521-30, 2008
10. Kanematsu Y, Yamaguchi K, Ohnishi H, Motobayashi Y, Ishizawa K, Izawa Y, Kawazoe K, Kondo S, Kagami S, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有 295:F1457-1462, 2008
11. Takamatsu M, Urushihara M, Kondo S, Shimizu M, Morioka T, Oite T, Kobori H, Kagami S. Glomerular angiotensinogen protein is enhanced in pediatric IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 査読有 23:1257-1267, 2008

[学会発表] (計 6 件)

1. The 15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association (IPNA) 2010年8月29日～9月2日
Matsuura S, Kondo S, Suga K, Kinoshita Y, Tamaki T, Kagami S:
Expression and localization of focal adhesion proteins in the developing rat kidney.
2. The 15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association (IPNA) 2010年8月29日～9月2日
Kinoshita Y, Kondo S, Suga K, Matsuura S, Urushihara M, Kagami S:
Candesartan Suppresses Glomerular Renin-Angiotensin System (RAS) Activation, Oxidative Stress and Progressive Glomerular Injury in Rat Anti-GBM GN
3. ISN-Nexus Kyoto Symposium 2010 April 15

- 18, 2010 at Kyoto

Kondo S, Suga K, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Tamaki T, Kagami S: Enhanced expression of Hic-5 is involved in the development of human and rat mesangioproliferative glomerulonephritis.

4. The American Society of Nephrology Renal Week 2009 (2009年10月27日-11月1日, San Diego, CA, USA)

Kondo S, Suga K, Matsuura S, Kinoshita Y, Tamaki T and Kagami S: Expression and localization of proteins in focal adhesion in the developing rat kidney.

5. The American Society of Nephrology Renal Week 2008 (2008年11月4-9日, Philadelphia, Pennsylvania, USA)

Suka K, Kondo S, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Tamaki T, Kagami S: Enhanced expression of Hydrogen peroxide-inducible clone-5 (Hic-5) on activated mesangial cells in human glomerulonephritis.

6. The American Society of Nephrology Renal Week 2008 (2008年11月4-9日, Philadelphia, Pennsylvania, USA)

Kondo S, Suka K, Matsuura S, Kinoshita Y, Urushihara M, Tamaki T, Kawachi H, Kagami S: The Expression of Hic-5 Is Involved in the Development of Progressive Glomerulonephritis in the Rat.

[図書] (計0件)

[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

<http://www.tokudai-pediatrics.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 秀治 (KONDO SHUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00380080

(2) 研究分担者

香美 祥二 (KAGAMI SHOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：00224337

(3) 連携研究者

()

研究者番号：