

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16848

研究課題名(和文)ネフローゼ新規治療開発を目指した腎系球体ポドサイトの足突起制御機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of foot process regulation of renal glomerular podocytes

研究代表者

宇田川 智宏 (Udagawa, Tomohiro)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：30623392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微小変化型ネフローゼ症候群では、腎ポドサイト(Pd)の足突起構造は可逆的に形態変化する。本研究では、Pd特異的転写因子WT1にEGFP-mCherryを発現するマウスで薬剤誘導したPd障害とその回復過程の遺伝子解析により形態制御機構解明を目指したが、コロナ禍に直面しマウス繁殖・実験が遅れ、漸く繁殖に成功した2022年度の途中で代表者が研究機関から異動、未達に終わった。

一方、巣状分節性硬化症で期腎不全の患者でWT1のZinc finger domainの変異を発見した。腎切片染色でWT1とPd蛋白発現が低下し、変異WT1を培養細胞に強制発現すると下流遺伝子発現は低下した。病態の一端が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白尿は末期腎不全のリスク要因である。蛋白尿が生じる病態解明を解明し、新規治療標的を明らかにすることは人類にとって有意義である。我々は蛋白尿モデルマウスと患者変異を用いてその病態発症機序の解明を目指した。巣状分節性系球体硬化症患者で新たに見つかったZinc finger領域の変異のついて解析した所、変異WT1は細胞内局在の変化と下流蛋白遺伝子の発現低下と局在変化をもたらすと判明した。ポドサイトのWT1制御機構の一端が明らかとなり、今後末期腎臓病へと進展するこの病態の詳細な検討から、ポドサイトを修復するような機序や薬剤の開発の礎となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In minimal change nephrotic syndrome, the foot process structure of renal podocytes (Pd) undergoes reversible morphological changes. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of morphological regulation by genetic analysis of drug-induced Pd damage and its recovery process in mice expressing EGFP-mCherry in the Pd-specific transcription factor WT1. The project ended in failure.

On the other hand, we discovered a mutation in the Zinc finger domain of WT1 in a patient with focal segmental sclerosis to stage renal failure. Renal section staining showed decreased WT1 and Pd protein expression, and forced expression of mutant WT1 in cultured cells resulted in decreased downstream gene expression. One aspect of the pathogenesis of the disease was revealed.

研究分野：小児 腎系球体疾患

キーワード：蛋白尿 WT1 ネフローゼ症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎系球体において濾過機能を担うポドサイトの不可逆的な障害に起因して蛋白尿が生じ、慢性腎臓病を経て末期腎不全へと進展することがわかっている。高度蛋白尿と低蛋白血症を呈するネフローゼ症候群では濾過障壁機能を果たすポドサイトの足突起に病理学的には電子顕微鏡レベルで癒合 (foot process effacement) が生じている。興味深いことに小児特発性ネフローゼ症候群の大半を示す微小変化型 (Minimal Change Disease:MCD) では、癒合したポドサイト足突起が寛解時に正常形態へと修復される。ポドサイトの形態変化とその修復過程における詳細な分子機序はよくわかっていない。この足突起修復過程に着目し、ポドサイトに蛍光蛋白を発現する Wt1-eGFP /mCherry マウスで薬物誘導性 MCD モデルを作成し、薬剤投与により蛋白尿を誘導し、ポドサイトの足突起形態変化と修復過程の分子制御機構の解明を目指した。

### 2. 研究の目的

ポドサイト足突起の修復過程の分子制御機序を解き明かし、特発性ネフローゼ症候群の新規治療標的の探索や発症因子を解明することを目的とする。さらに他の腎系球体疾患での新規治療標的開発や腎オルガノイド研究の発展への貢献を目指す。

### 3. 研究の方法

1) Wt1-RG マウス、あるいは同系統の C57/B6 マウスに 1) 既報にある患者血清から抽出した抗 UCHL1 抗体のリコンビナント蛋白、2) Poly-IC 等の薬剤で MCD モデルを誘導可能か、またいずれの薬剤が有効か検討する。

2) 1) のデータを基に、Wt1-RG マウスに薬剤を投与し MCD マウスを作成する。蛋白尿出現時期から継時的な腎臓の切出しを行い、mRNA 分解を防ぐため氷上で速やかにシクロヘキシミド入りの Buffer に溶解し、FACS で eGFP 陽性のポドサイトを単離する。

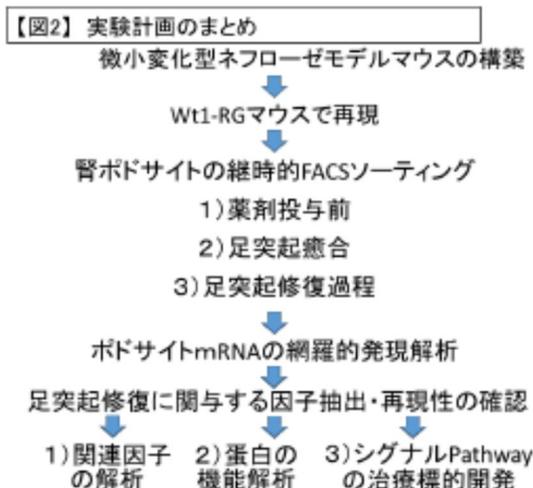
3) 候補遺伝子について生体用 siRNA を行い、1) で最適と考えられた MCD モデルマウスでポドサイト障害の修復が障害されか調べる。

4) 分子機構の解明 (2-3 年目)

上記までの結果をもとに足突起制御する遺伝子のサブクロニングを行いその上流または下流を免疫沈降や近接ライゲーションアッセイによる結合蛋白の解析を行う

### 4. 研究成果

2020 年研究基金を使えるようになった年からコロナの世界的流行があり、全面的に動物実験が完全にストップした。実験再開の時期を待たずマウス用代謝ケージや FCM、腎切片染色に有効な抗体などの準備検討を進めた。2021 年度の後半より動物実験の制約が緩和され、実験に必要な



と計算される WT1-RG マウスの繁殖を再開、ジェノタイピングや尿、血液採取、採取した血液の FCM を行うためにセットアップした。当初計画していた抗 UCHL1 抗体や Poly-IC での投与実験を計画していた矢先に、研究代表者は所属施設が異動となり、動物実験の継続が立ち行かなくなり本研究は十分な成果を上げることができず未達となった。

一方、巣状分節性硬化症で期腎不全の患者で WT1 の Zinc finger domain の変異を発見した。これまでこの変異によるヒトでの巣状分節性糸球体硬化症や末期腎不全患者の報告はまだない。我々は腎切片染色で WT1 の局在変化とポドサイト蛋白の発現が低下を見出した。さらに変異 WT1 を不死化培養細胞 H E K 293 T に強制発現し、その下流遺伝子発現を解析したところ、WT1 の下流遺伝子の発現量は低下していた。その作用はドミナントネガティブ様であった。これらの点に関して、さらなる作用機序については検討していく予定であるが、ポドサイト傷害を来す WT1 遺伝子の変異とその作用機序の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamaguchi Yohei, Takasawa Kei, Irabu Hitoshi, Hiratoko Kanako, Ichigi Yosuke, Hirata Ko, Tamura Yumie, Murakoshi Miki, Yamashita Motoi, Nakatani Hisae, Shimoda Masuhiro, Ishii Taku, Udagawa Tomohiro, Shimizu Masaki, Kanegane Hirokazu, Morio Tomohiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Infliximab treatment for refractory COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in a Japanese child	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 814～818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2022.01.011	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 Udagawa Tomohiro, Motoyoshi Yaeko	4. 巻 37
2. 論文標題 Macroscopic hematuria in two children with IgA nephropathy remission following Pfizer COVID-19 vaccination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Nephrology	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00467-022-05517-1	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 Urae S, Harita Y, Udagawa T, Ode KL, Nagahama M, Kajiho Y, Kanda S, Saito A, Ueda HR, Nangaku M, Oka A.	4. 巻 133
2. 論文標題 A cellular model of albumin endocytosis uncovers a link between membrane and nuclear proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs242859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.242859	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 Udagawa T, Matsuyama Y, Okutsu M, Motoyoshi Y, Okada M, Tada N, Kikuchi E, Shimoda M, Kanamori T, Omori T, Takahashi M, Imai K, Endo A, Fujiwara T and Morio T	4. 巻 2021
2. 論文標題 Association between Immunoglobulin M and Steroid Resistance in Children with Nephrotic Syndrome: A Retrospective Multicenter Study in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 487-493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34067/KID.0004432020	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 -

