

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591019

研究課題名（和文） 足細胞障害と保護の分子機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of Molecular Mechanisms of Podocyte Injury and Its Prevention

研究代表者

廣村 桂樹 (HIROMURA KEIJU)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70292597

研究成果の概要（和文）：

足細胞障害の関連する分子機序として、以下の3つの点について明らかにした。1) ミゾリビン、従来知られている IMPDH 阻害とは別の機序を介してピューロマイシンアミノヌクレオシドによる足細胞障害を直接的に抑制する作用を有する。2) SIRP $\alpha$  の細胞内領域の欠損した変異型マウスでは、足突起の平坦化、配列の乱れが生じる。また本マウスでは糖尿病性腎症への感受性が高まることより、SIRP $\alpha$  とその下流のシグナル伝達系路は糖尿病性腎症の進展に関連した分子と考えられる。3) 培養足細胞において TGF- $\beta$ 1 により WT1 プロモーター領域の DNA メチル化が生じる。しかし、その程度は大きくはなく、TGF- $\beta$ 1 による WT1 の発現抑制には今回調べた領域より上流のメチル化や WT1 に関連した他の分子のメチル化など関与が推測された。

研究成果の概要（英文）：

We have examined the molecular mechanisms of podocyte injury and found the 3 following results. 1) Mizoribine directly inhibits puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury through the mechanism independent from IMPDH inhibition. 2) The mice that express mutant SIRP $\alpha$  lacking cytoplasmic region show flattened and irregularly arranged foot processes. In addition, the mutant mice are sensitive to diabetic nephropathy, suggesting that SIRP $\alpha$  and its downstream signalling pathway are involved in the progression of diabetic nephropathy. 3) TGF- $\beta$ 1 induces DNA methylation of WT1 promoter in cultured podocytes. However, the degree of DNA methylation was modest, suggesting that the possibility of methylation of the upstream region of that we have examined or methylation of the promoter of WT1-related molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓病内科学

キーワード：足細胞、ネフローゼ症候群、蛋白尿、細胞内シグナル伝達経路、DNA メチル化

### 1. 研究開始当初の背景

nephrin の発見以来、スリット膜関連蛋白を中心に糸球体上皮細胞（足細胞）障害と蛋白尿の出現機序に関する研究が大きく進歩した。蛋白尿は慢性腎臓病（CKD）の主要な診断項目であり、その制御に関する研究は臨床でも重要である。研究代表者らは長年、足細胞の研究に取り組み、最近ではアンジオテンシン II が足細胞障害に関与すること報告し（J Am Soc Nephrol 18:515-527, 2007、Am J Physiol Renal Physiol 293:F1214-1221, 2007）、また受容体型膜蛋白である Signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )が足細胞に発現し、蛋白尿に関与する可能性を見いだした。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させ、足細胞障害と保護の分子機序の解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Mizoribine (MZR)に関する検討

ラットピューロマイシンアミノヌクレオシド (PAN) 腎症に対して、核酸代謝拮抗薬である MZR に抗蛋白尿効果があることが、Sibasaki らにより報告 (Am J Nephrol 1996;16:167-172) されているが、足細胞に直接的に作用するのか明らかではなかった。そこで、温度感受性マウス不死化培養足細胞株を使用して、PAN による足細胞障害に対する分子機序を検討した。

#### (2) SIRP $\alpha$ 経路に関する検討

SIRP $\alpha$  はチロシンホスファターゼである SHP-1/2 の基質として同定された受容体型の膜蛋白であり、マクロファージ、樹状細胞、神経細胞などに豊富に発現し、細胞骨格の再構成、細胞形態、遊走などの制御に関与している。我々はこれまでの検討で SIRP $\alpha$  が足細胞に強く発現することを見いだしており、SIRP $\alpha$  の細胞内ドメインを欠損した変異型 SIRP $\alpha$  を発現するマウス (SIRP $\alpha$  変異型マウス) と野生型マウスを用いて、SIRP $\alpha$  の機能消失による足細胞の形態や機能の変化について、電子顕微鏡を用いて詳細な観察を行った。またストレプトゾトシン (STZ) 投与による 1 型糖尿病性腎症を作成して、糖尿病性腎症における SIRP $\alpha$  の機能を検討した。

#### (3) Wilms' Tumor Suppressor (WT1)に関する検討

WT1 は癌抑制遺伝子であるが、足細胞に強く発現する蛋白である。最近、Transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1) により、WT1 の発現が減少することが Sakairi らにより報告された (Nephrol Dial Transplant 26:2746,

2011)。この WT1 低下の機序の 1 つとして DNA のメチル化が関与しているという仮説を立て、ヒト不死化培養足細胞 (AB8/13) を用いて検討した。コントロールの細胞として、WT1 を発現しない、ヒト腎尿細管上皮細胞株 (HK-2) を使用した。WT1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化について、メチル化特異的 PCR 法、バイサルファイトシーケンス法、パイロシーケンス法を用いて検討した (図 1)。



図1 WT1のプロモーター領域の遺伝子配列とプライマー等の設計

### 4. 研究成果

#### (1) MZRに関する検討

ラットへの PAN の投与により、投与 9 日目をピークに大量の蛋白尿が見られたが、MZR を PAN と同時に投与することで、ほぼ完全に蛋白尿を抑制することができた (図 2)。また、PAN 投与の 2 日後から MZR を投与した (MZR late) においても、蛋白尿の減少効果が見られた。

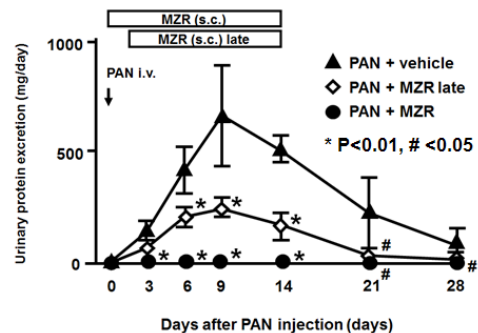


図2 ラットPAN腎症に対するミゾリビンの抑制効果

MZR の足細胞に対する直接的な作用を検討するために、マウス培養足細胞を使用して検討した。PAN を 48 時間添加し MTT アッセイで生細胞を調べると、コントロールの無添加に比べて著明に減少したが、MZR の投与により生細胞数の有意な改善が得られた (図 3、上)。

Phalloidin 染色でアクチン骨格の検討したところ、PAN 添加により足細胞のアクチン骨格の破綻が生じるが、MZR の添加により抑制された (図 3、下)。

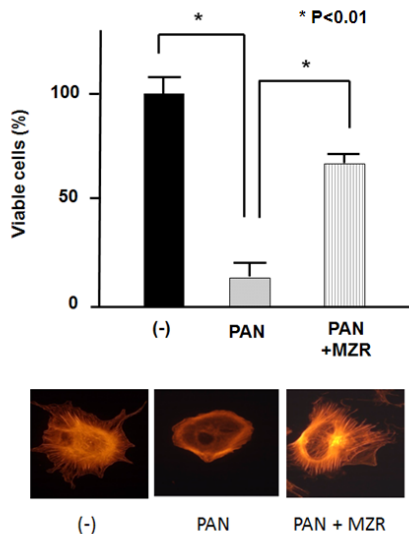


図3 PANによる培養系球体上皮細胞障害に対するミゾリピンの抑制

MZR は核酸代謝拮抗薬であり、プリン合成経路において IMP デヒドロゲナーゼ (IMPDH) を阻害し GMP を枯渇させることでプリン合成を抑制する。しかし、GMP を添加しても MZR の抑制作用に影響はなく、足細胞障害抑制は IMPDH 阻害によらないことが示された。さらに、他の IMPDH 阻害薬として知られている、ミコフェノール酸やリバピリン添加では PAN による足細胞障害が抑制できないことより、MZR は IMPDH 阻害以外の薬理作用により、PAN による足細胞障害を保護するものと考えられた。

MZR の保護効果の作用機序を検討するため、PAN 腎症において活性化されることが報告されているインテグリン結合キナーゼ (ILK) シグナル経路に注目した。ILK の活性化状態については ILK によりリン酸化される GSK-3 $\beta$  のリン酸化状態を検討した。PAN 腎症の単離系球体では PAN 投与 9 日目をピークに GSK-3 $\beta$  のリン酸化の増加が見られたが、MZR によりそのリン酸化は抑制された。ILK の活性化は、単離系球体からの抽出蛋白を用いての ILK キナーゼアッセイでも確認された。培養足細胞でも同様の実験を施行したところ、PAN 投与 6 時間後においてリン酸化 GSK-3 $\beta$  の増加が認められたが、MZR 投与によりリン酸化 GSK-3 $\beta$  の増加は抑制された (図 4、上)。また ILK キナーゼ活性は PAN 添加により増加したが、MZR の投与により抑制された (図 4、下)。

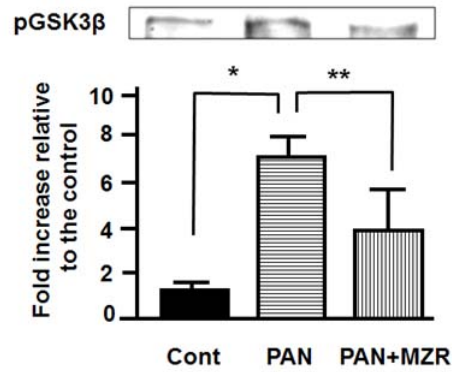


図4 ラットPAN腎症におけるミゾリピンのILK活性化抑制

以上、PAN による足細胞障害に対して、MZR は in vivo と in vitro ともに保護することを示した。培養足細胞でも MZR による保護作用が見られることから、従来知られている MZR の免疫抑制作用とは独立した新たな薬理作用であると考えられた。今回の検討より、MZR の直接のターゲットは、ILK-GSK-3 $\beta$  シグナルの上流に位置するものと思われる。PAN による足細胞障害における MZR のターゲット分子のさらなる検討が必要である。

#### (2) SIRP $\alpha$ 経路に関する検討

これまでの検討で、SIRP $\alpha$  はマウス足細胞に強く発現することがわかった (図 5)。そこで、野生型マウスと SIRP $\alpha$  変異型マウスをメタボリックケージにいて、尿中アルブミン排泄について詳細に検討したところ、SIRP $\alpha$  変異型マウスにおいて、その程度は小さいもののアルブミン尿排泄が有意に増加していた。

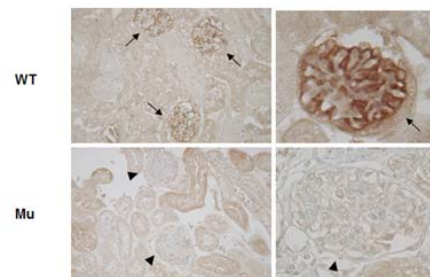


図5 足細胞でのSIRP $\alpha$ の発現

WT:野生型マウス、Mu:SIRP $\alpha$ 細胞内ドメイン欠損マウス

光学顕微鏡レベルでは両マウスの腎臓に明らかな差が見られず、また蛍光抗体法によりポドサイト特異蛋白の発現を検討したが、明らかな差を認めなかった。しかし、透過型電子顕微鏡で観察すると、ポドサイトの足突

起が平坦化し、幅が広がっており、走査型電子顕微鏡による観察では、1次突起ならびに足突起が不規則に配列していることが見いだされた(図6)。

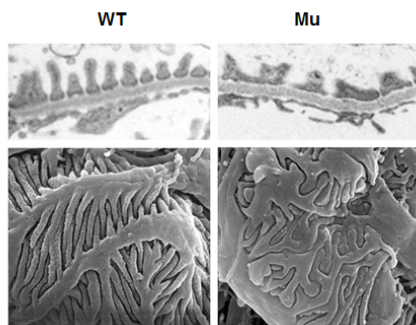


図6 SIRP $\alpha$ 変異マウスにおける、足突起の乱れ  
WT:野生型マウス、Mu:SIRP $\alpha$ 細胞内ドメイン欠損マウス

ラットにアドリアマイシンを投与すると巣状糸球体硬化症を来しネフローゼ症候群となる。しかし、マウスでは感受性が低く、SIRP $\alpha$ 変異型マウスの系統であるC57BL6では、通常アドリアマイシン腎症を生じない。しかし、これまでの検討で、片腎摘出後にアドリアマイシンを投与すると、野生型マウスでは蛋白尿ならびに組織学的変化が軽微であったのに対して、SIRP $\alpha$ 変異型マウスでは高度の蛋白尿を生じ、巣状分節状の糸球体硬化が見られた。

そこで今課題ではネフローゼ症候群を呈するモデルとして、STZ投与による1型糖尿病性腎症モデルについて両マウスで検討した。STZ投与後、随時血糖300mg/dL以上が持続するものを糖尿病発症マウスとした。C57BL6はSTZによる1型糖尿病による腎障害が発症しづらい系統であるが、変異型マウスでは期間を通じて、野生型に比べて尿中アルブミン排泄の有意な増加が見られた(図7)。

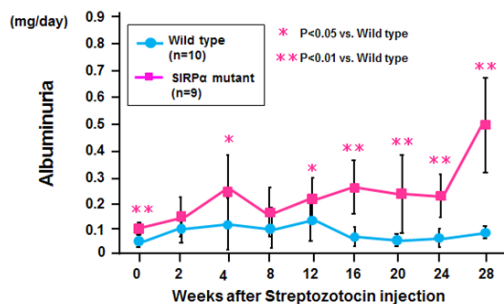


図7 1型糖尿病性腎症モデルにおけるアルブミン尿の推移

ヒト糖尿病性腎症では、早期腎症より糸球体基底膜の肥厚が見られる。STZ投与28週目に電子顕微鏡を用いて、糸球体基底膜の厚さを計測したところ、SIRP $\alpha$ 変異型マウスにお

いて有意な糸球体基底膜の肥厚が見られた(図8)。

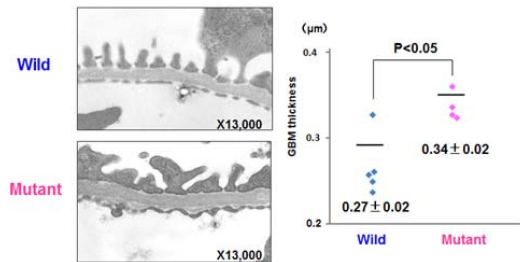


図8 1型糖尿病性腎症モデルにおける糸球体基底膜肥厚

Wild:野生型マウス、Mutant:SIRP $\alpha$ 細胞内ドメイン欠損マウス

STZ投与28週目の糸球体濾過値を検討したところ、SIRP $\alpha$ 変異型マウスにおいて糸球体濾過値の上昇が見られ、糸球体過剰濾過が生じているものと考えられた(図9)。

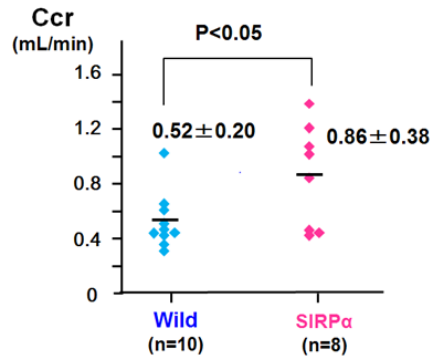


図9 1型糖尿病性腎症モデルにおける糸球体濾過値

Wild:野生型マウス、Mutant:SIRP $\alpha$ 細胞内ドメイン欠損マウス

以上より、SIRP $\alpha$ とその下流のシグナル伝達系は糖尿病性腎症の進展に関連した分子と考えられた。

### (3) WT1に関する検討

培養ヒト足細胞はWT1蛋白を強く発現するが、TGF- $\beta$ 1を11日間添加するとWT1の発現が減弱することがWestern blot法で確認された(図10)。一方、脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidineを同時に添加すると、TGF- $\beta$ 1によるWT1の発現減弱は抑制した(図10)。またリアルタイムPCR法で、同様の条件でWT1のmRNA発現の検討を行ったが、Western blotと同様の結果が得られた(図11)。

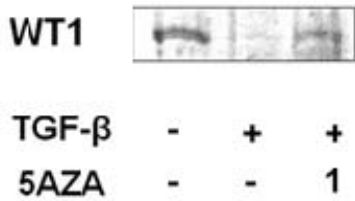


図10 TGF-βによるWT1蛋白の発現抑制 (Western Blot)

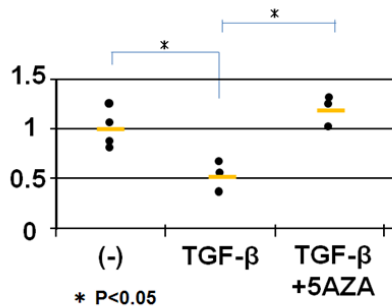


図11 TGF-βによるWT1 mRNAの発現抑制 (Real-time PCR)

続いて、WT1のプロモーター領域のメチル化について、メチル化特異的PCR法で検討を行った。未刺激状態の足細胞 (AB8/13) ではDNAのメチル化はほとんど見られなかったが、11日間のTGF-β1添加によりメチル化の増加を認めた。またWT1を発現しない培養尿細管細胞 (HK2) では、高度なWT1のメチル化が見られた (図12)。

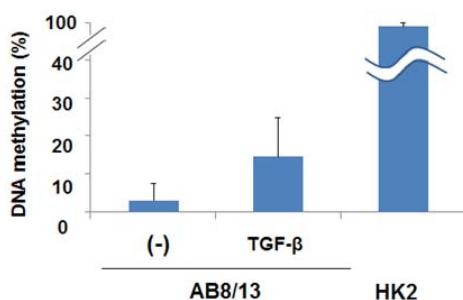


図12 TGF-βによるWT1のDNAメチル化 (メチル化特異的PCR法)

同様の傾向は、バイサルファイトシーケンス法 (図13) やパイロシーケンス法 (図14) でも確認された。

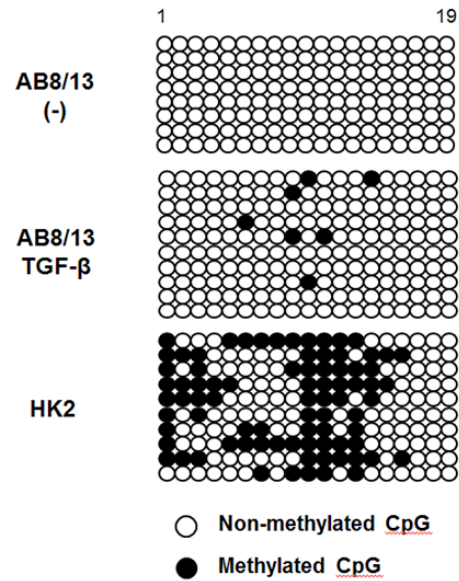


図13 TGF-βによるWT1のDNAメチル化 (バイサルファイトシーケンス法)

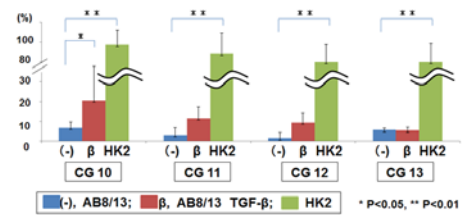


図14 TGF-βによるWT1のDNAメチル化 (パイロシーケンス法)

以上TGF-β11によりWT1遺伝子プロモーター領域のメチル化の軽度増加することがわかった。しかし、その程度は小さく、TGF-β1によるWT1の発現抑制には、今回調べた領域より上流のメチル化やWT1に関連した他の分子のメチル化など関与が推測された。

## 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4件)

(1) Kaneko T, Saito Y, Kotani T, Okazawa H, Iwamura H, Sato-Hashimoto M, Kanazawa Y, Takahashi S, Hirumura K, Kusakari S, Kaneko Y, Murata Y, Ohnishi H, Nojima Y, Takagishi K, Matozaki T. Dendritic Cell-Specific Ablation of the Protein Tyrosine Phosphatase Shp1 Promotes Th1 Cell Differentiation and Induces Autoimmunity. J Immunol. 査読有 2012 Apr

25. [Epub ahead of print]

(2) Sakairi T, Hiromura K, Takahashi S, Hamatani H, Takeuchi S, Tomioka M, Maeshima A, Kuroiwa T, Nojima Y. Efficacy and safety of tacrolimus for induction therapy in patients with active lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* 査読有 16:76-86, 2011

(3) Takeuchi S, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T, Nojima Y. The immunosuppressive drug mizoribine directly prevents podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron Exp Nephrol.* 査読有 16(1):e3-10, 2010.

(4) Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T, Nojima Y. Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 査読有 15:568-574, 2010

[学会発表] (計6件)

(1) Takahashi M, Hiromura K, et al A Novel Case of Nephrotic Syndrome Caused by Immune-Mediated Severe LCAT Deficiency 2011年11月12日米国 フィラデルフィア

(2) Sakairi T, Abe Y Hiromura K et al. miR-143 contributes to podocyte injury induced by TGF- $\beta$ 1. 第44回アメリカ腎臓学会 2011年11月11日米国 フィラデルフィア

(3) Hamatani H, Hiromura K, et al. Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 11 Induced DNA Methylation of Wilms' Tumor Suppressor Gene (WT1) Promoter in Human Podocytes. 第44回アメリカ腎臓学会 2011年11月11日米国 フィラデルフィア

(4) Takahashi M, Hiromura K, et al The Role of SIRP $\alpha$  (SHPS-1) in Experimental Diabetic Nephropathy第43回アメリカ腎臓学会 2010年11月19日米国 デンバー

(5) Tomioka M, Hiromura K, et al The Role of SIRP $\alpha$  in Podocyte Structure and Function 国際腎臓学会NEXUS京都シンポジウム 2010年4月16日 国立京都国際会館 (京都)

(6) Tomioka M, Hiromura K, et al Tubulointerstitial nestin expression as a predictive marker for renal prognosis in IgA nephropathy国際腎臓学会NEXUS京都シンポジウム 2010年4月16日 国立京都国際会館 (京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣村 桂樹 (HIROMURA KEIJU)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70292597