

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22249033

研究課題名(和文)慢性腎臓病進行の機序

研究課題名(英文)Mechanisms of progression of chronic kidney disease

研究代表者

松阪 泰二 (MATSUSAKA, Taiji)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50317749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病や腎炎等により腎臓の働きが失われる時、たこ足細胞と呼ばれる独特な細胞が傷害され、それをきっかけに腎臓全体へと傷害が拡大してゆく。腎臓は多種類の細胞から構成されるが、本研究において、たこ足細胞特異的な遺伝子発現変化を網羅的に解析する方法を確立した。また腎傷害時は、腎臓内に血圧を上昇させるホルモンであるアンジオテンシンが増加し、さらに腎傷害を助長させている可能性がある。本研究で、たこ足細胞が傷害されると、アンジオテンシンの元になる蛋白質が尿中へ漏出し、それが腎臓で再吸収されて、アンジオテンシンに変換される事を明らかにした。以上の知見は、慢性腎臓病進行機序の解明に大きな寄与をなすものである。

研究成果の概要(英文)：In chronic kidney diseases caused by diabetes or nephritis, the key event is injury in a unique type of cells, called podocytes. Podocyte injury triggers progressive deterioration of kidney function. In the present study, we established a method to comprehensively analyze gene expression selectively in podocytes. We also revealed the mechanism underlining induction of angiotensin II within the kidney. Angiotensin II is the most potent blood pressure-raising hormone, and also may further worsen kidney injury. Podocyte injury causes leakage of angiotensinogen, the precursor protein of angiotensin II, which is reabsorbed by kidney cells, and then converted to angiotensin II. This finding provides an insight into mechanism underlining progressive worsening of kidney diseases.

研究分野：腎臓病

キーワード：Angiotensin Angiotensinogen ポドサイト 慢性腎不全 ノックアウトマウス Magalin 糸球体硬化症 ネフローゼ症候群

研究開始当初の背景

(1) 糖尿病や腎炎、高血圧による慢性腎臓病患者の一部は、腎機能を失い、透析療法や腎移植を余儀なくされる。このような状態は、腎糸球体のポドサイト(たこ足細胞)の損傷を契機としておこる事が知られている。ポドサイトは、血液を濾過して尿を産生する場である糸球体において、濾過バリアとして重要な働きをし、その損傷は蛋白尿をもたらす。ポドサイトは生後に増殖や再生する事ができず、ある程度以上のポドサイトが失われると、その糸球体は硬化という病理的形態を示し、不可逆的に濾過機能を失う。糸球体硬化は、通常糸球体の一部に出現し糸球体全体へと拡大する。申請者等は、一部のポドサイトが傷害されると、当初傷害を免れた他のポドサイトも二次的に傷害される事を示したが、この現象が糸球体硬化病変の拡大に関与している可能性が考えられる。申請者等の作製した NEP25 マウスは、イムノトキシンにより選択的ポドサイト傷害を誘導可能であるが、ポドサイト傷害後に、多くの遺伝子の糸球体内発現変化が認められた。ポドサイトを傷害する因子の増加や、ポドサイトの生存に不可欠な因子の減少が上記二次的ポドサイト傷害に関与する可能性が考えられた。

(2) 一方、硬化に陥った糸球体の下流の尿細管は変成、萎縮、壊死、アポトーシスをおこし、尿細管の周囲には線維化がおこる。これらの糸球体硬化や、続発する尿細管間質の傷害は、アンジオテンシン (Angiotensin) II (AII) の阻害により軽減する事が知られていた。腎臓内には血漿濃度を上回る濃度の AII が含有され、また様々な腎障害時において、血漿 AII 濃度は増加しないのに対して、腎臓内 AII 含量が増加する事が知られていた。AII は、主に肝臓で合成される前駆体蛋白質 Angiotensinogen (Agt) から産生されるが、腎臓の近位尿細管でも Agt が産生される。上記現象は、腎傷害時に腎内で Agt 産生が増加する事で説明されてきた。一方申請者の行った予備実験の結果、肝臓由来の Agt の一部が、糸球体で濾過され、megalin 依存的に近位尿細管に再吸収される事がわかった。さらにポドサイト傷害時には、多量の Agt が腎臓に漏出する事がわかった。この糸球体で漏出した Agt が腎内 AII の源になっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本申請は、ポドサイト傷害を契機に悪循環的に進行する慢性腎臓病の糸球体内外の2つの鍵になる問題を解明する事を目的とする。

(1) 慢性腎臓病において、腎臓内アンジオテンシン (A)II の産生が亢進する機序を明らかにする。

具体的には、以下の4つの仮説を検証する事である。

肝臓由来Agtの一部は、糸球体で濾過され、megalinにより再吸収され、AII の源となる。

ポドサイト傷害により、尿細管腔への Agt 漏出が増加し、腎内 AII が増加する。

Megalin の阻害は、Agt の再吸収を抑制し、腎内 AII の減少をもたらす。

Megalin の阻害は、Agt の再吸収を抑制し、腎内 AII 作用を軽減する。

(2) ポドサイト傷害に起因して糸球体傷害が自動拡大する分子機序

具体的には、ポドサイト傷害前後の NEP25 マウスの糸球体から RNA を採取して、RNA アレイ実験を行い、変動遺伝子の機能解析を行い、糸球体傷害の自動拡大に影響を与える遺伝子を同定するのが目的である。計画段階では、Shroom3 と Dner という2つの遺伝子に着目した。しかし、実際の研究は少し路線を変更し、500以上の糸球体で変動する遺伝子のうち2つのみを解析する事よりも、系統的に解析する方法を模索する事を選択した。糸球体は、内皮細胞、メサンジウム細胞、ポドサイトの3種の細胞から構成されているため、糸球体を単離して RNA を解析しても、その変動がどの細胞で起こっているのかが不明である。そこで、傷害前後のポドサイトでの発現 mRNA を網羅的に解析する方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 慢性腎臓病の腎内 (A)II

肝臓特異的 Agt 欠損 (KO) マウス、腎臓 (近位直尿細管) 特異的 Agt KO マウス、近位尿細管 megalin モザイク状 KO マウス、近位尿細管完全 megalin KO マウス、およびポドサイト傷害モデルマウス (NEP25) を作製し、これらを組み合わせ、腎内 AII を測定した。腎臓内 AII 測定は、分担研究者西山より抗体と方法を導入し、また協力者 DJ Campbell 博士より示唆を受けた改善と、若干の独自の改変を加えて行った。腎内 Agt 蛋白質は、特異抗体による免疫染色と Western 解析で半定量した。腎内 Agt、レニン、ACE mRNA は、RT-PCR 法で定量した。

(2) 糸球体傷害が自動拡大する分子機序

ポドサイトの mRNA を単離するために、RIBOTAG マウスを導入した。これは、Cre 組換え酵素が存在する細胞においてのみ、リボソーム蛋白質 Rlp22 に HA タグが挿入されるようにデザインされたトランスジェニックマウスである。RIBOTAG マウスと、ポドサイトに特異的に Cre を発現する Nephro-Cre トランスジェニックマウス、および NEP25 マウスの3者を交配させた。ポドサイト傷害誘導前後で、糸球体を採取し、HA に対する免疫沈降をおこない、リボソームとそれに結合する RNA を採取し、RT-PCR と RNA アレイで解析した。

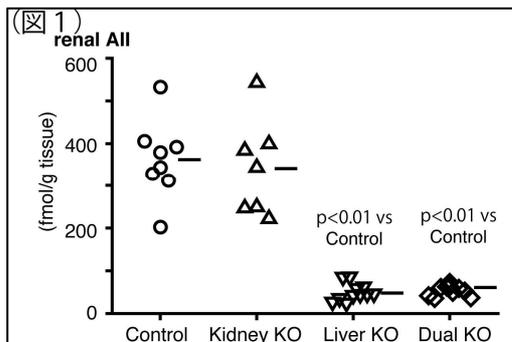
4. 研究成果

(1) 慢性腎臓病の腎内 (A)II

ポドサイト傷害がない状態での腎内 AII 産生機序: 腎臓 Agt KO マウスでは、腎内 Agt 量も、腎内 AII 含量も、対照マウスとなら変わり

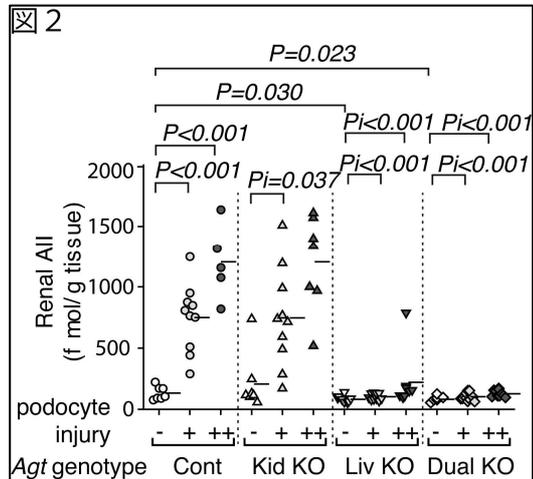
なかった(図1)。また、血圧、腎臓組織形態、尿Na排泄等すべて正常で、唯一見いだした変化は、尿Agt排泄の低下であった。このことから、腎臓内で転写されるAgt mRNAに由来するAgt蛋白質は、おそらく即座に尿に排泄され、なんら腎内AIIに寄与していない事がわかった。一方、肝臓Agt KOマウスは、肝臓AgtのmRNA、肝臓Agt蛋白質、血漿Agt濃度のみならず、腎臓内Agt量も著減していた。腎臓Agt mRNAはむしろ対照より増加していた。このことは、腎臓内で検出されるAgt蛋白質は肝臓に由来する事を示している。肝臓Agt KOマウスの腎臓内AIIも著減していた(図1)。このマウスは、全身Agt KOマウスと類似し、低血圧で、レニンが著増し、腎小葉間動脈の中膜肥厚を示した。また肝臓と腎臓両方Agt KOマウスは、肝臓単独Agt KOマウスと同様の低い腎内AII含量と、同様の表現形質を示した。これらの事から、肝臓が、血漿Agt・腎内Agt蛋白質・腎内AIIの主要な源であり、肝臓Agtが生理的機能の大部分を担っている事がわかった。

また尿細管モザイク状megalin KOマウスの腎臓を抗Agt抗体で染色したところ、megalinを発現しない近位尿細管細胞はすべてAgt染色陰性であった。この事から、血漿Agtの一部は糸球体で濾過され、近位尿細管でmegalin依存的に再吸収されている事がわかった。



ポドサイト傷害後の腎内AII産生機序:
NEP25 マウスにポドサイト傷害を誘導すると、腎内Agtが増加した。ポドサイト傷害後は、ネフローゼ症候群となり、有効循環血漿量の低下によりレニンが増加すると予想された。そこで、マウス血漿を腹腔内に補充して、ネフローゼ症候群を予防し、レニンの増加を防いだ(実際には低下した)。それにもかかわらず、ポドサイト傷害後に、腎内AII含量は増加している事がわかった。この事から、レニンではなく糸球体で漏出するAgt量が腎内AIIを規定している可能性が考えられた。

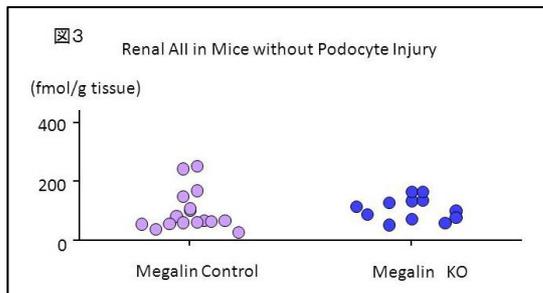
しかしながら、ポドサイト傷害後に腎臓



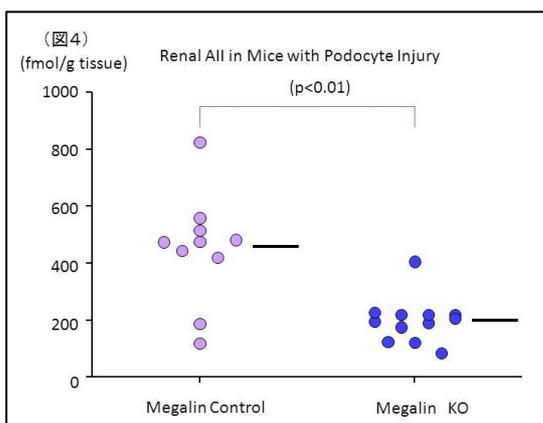
内Agt mRNAも増加し、これが腎内AIIの増加に寄与する可能性も考えられた。そこで、肝臓Agt KO、腎臓Agt KO、肝腎両Agt KOとそれぞれNEP25マウスを交配し、ポドサイト傷害を誘導した。ポドサイト傷害の程度に応じて腎臓Agt mRNAは増加した。腎臓Agt KOマウスでは、Agt mRNAは減少していたが、腎内AII含量はまったく変化しなかった(図2)。肝臓Agt KOマウスは、腎内AII含量は、腎内Agt蛋白質同様に、著減していた(図2)。肝臓腎臓両Agt KOマウスは、肝臓単独Agt KOマウスと同様の形質を示した。腎内AII量は、腎臓Agt mRNAとは全く無関係で、もっぱら肝臓Agt遺伝子の有無により規定されていた。これらのことから、ポドサイト傷害時においても、腎臓Agt mRNAは腎内AII産生にまったく寄与せず、糸球体で漏出する血漿Agt蛋白質量と相関する事がわかった。

ポドサイト傷害誘導前後において、NEP25マウスの腎静脈と間質内の細胞外液を灌流して回収し、Agt含量を比較したが、ポドサイト傷害の有無により差はなかった。したがって、腎内AIIは、間質や毛細血管腔内ではなく、糸球体で漏出したAgtに由来する事が示唆された。これをさらに確認するために、NEP25マウスにポドサイト傷害を誘導し、その1日後に片側の尿管を結紮した。結紮までの1日間に、両方の腎臓は等分のイムノトキシンにさらされるが、結紮側腎臓では、尿細管内圧およびボーマン腔圧が上昇し、糸球体濾過が実質0となる。尿管結紮の4または7日後に腎臓を解析したところ、非結紮側腎臓では、多量のAgt蛋白質が存在していたが、結紮側腎臓は腎内Agtは著減していた。腎臓内AII含量も、結紮側腎臓の方が少なく、この変化はAgt, renin, AceのmRNAでは説明できなかった。以上の事から、糸球体で漏出したAgtがAIIに変換される事が示唆された。

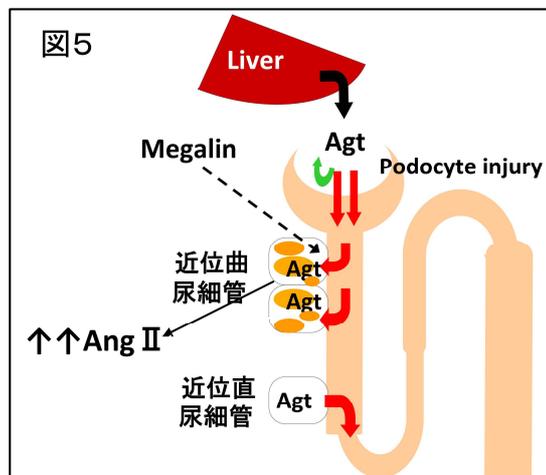
ポドサイト傷害がない状態での腎内 AII 産生における megalin の役割: 前述のように、尿細管腔の Agt 蛋白質は、megalin に異存して近位尿細管に再吸収される。この過程が、腎臓内 AII 産生に与るかどうかを検証した。このため、近位尿細管のほとんどすべてが megalin を欠損するマウスを作製した。このマウスにおいて、腎臓内 Agt 蛋白質取り込みは減少したが、腎内 AII 含量は対照マウスと差がなかった (図 3)。したがって、基底状態の腎内 AII 産生に、megalin が関与するかどうか不明であり、他の経路での産生が主であると推察された。



ポドサイト傷害後の腎内 AII 産生における megalin の役割: 次にポドサイト傷害後多量の蛋白尿がある状態で、megalin が腎内 AII 産生に与るかどうかを検証した。上記、megalin KO マウスを NEP25 と交配し、ポドサイト傷害を誘導した。Megalin KO では、対照マウスと比較して、腎内 Agt 蛋白質は少なく、腎内 AII 含量も少なかった (図 4)。この変化は、renin、Ace、Agt の mRNA の変化によっては説明ができなかった。この結果、多量の蛋白尿がある状態では、megalin により再吸収された Agt 蛋白質が AII に変換されている事が示唆された。



以上の結果をまとめると、主に肝臓で産生される血漿 Agt の一部は系球体から尿細管腔へと濾過され、megalin を介して近位尿細管に再吸収される。ポドサイト傷害が起こると、多量の Agt が尿細管腔へと供給され、megalin 依存的に再吸収される (図 5)。少なくともこの状態においては、腎内 AII は megalin により再吸収された Agt から産生される。蛋白尿がない基底状態では、尿細管腔内で Agt が



直接 AII に変換される可能性も考えられる。腎内 AII の機能としては、ネフローゼ症候群における Na の再吸収に与っている可能性が考えられたが、上記の実験において、megalin の有無にかかわらず、同等の浮腫と血圧を示し、その予想は確認できなかった。今後の検討が必要である。

(2) 系球体傷害が自動拡大する分子機構
系球体ホモジネートから抗 HA 抗体の免疫沈降によりポドサイト特異的ポリゾーム RNA を得た。qRT-PCR により Nephrin や Podocin 等既知のポドサイト特異的 RNA の濃縮を確認した。次に NEP マウスを交配し、ポドサイト傷害を誘導前後で、系球体およびポドサイト mRNA を採取し、Array 解析を行った。基底状態において 5070 のプローブがポドサイトで 2 倍以上有意に濃縮され、傷害誘導 7 日後のポドサイトにおいて、3130/1938 のプローブが増加/減少した。特に、Cxc11、Fos、Relb など多数の炎症関連遺伝子の増加が顕著で、これらは qRT-PCR でも確認した。GWAS で得られた 90 の既知の慢性腎臓病感受性遺伝子候補の挙動をみると、33 の遺伝子がポドサイトに濃縮して発現し、そのうち Vegf、Dach1、Aff3 が傷害後に減少した。Vegf はポドサイトで重要な機能を果たすので、後二者も同様にポドサイト傷害の鍵をにぎる可能性が考えられた。本マウスは簡便なポドサイトの mRNA 単離を可能にし、慢性腎臓病の治療ターゲットの検出に有用であると考えられた。

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 24 件)

1. Unilateral ureteral obstruction attenuates intrarenal angiotensin II generation induced by podocyte injury. Okabe M, Niimura F, Nishiyama A, Ichikawa I, Matsusaka T. et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2015 15;308:F932-7. doi: 10.1152/ajprenal.00444.2014. 査読有り
2. Keap1 inhibition attenuates glomerulosclerosis. Miyazaki Y, Matsusaka

- T et al. Nephrol Dial Transplant. 2014;29:783-91. doi: 10.1093/ndt/gfu002. 査読有り
3. Mice are unable to endogenously regenerate podocytes during the repair of immunotoxin-induced glomerular injury. Miyazaki Y, Ichikawa I, Matsusaka T. Nephrol Dial Transplant. 2014;29:1005-12. doi: 10.1093/ndt/gft413. 査読有り
 4. Podocyte injury enhances filtration of liver-derived angiotensinogen and renal angiotensin II generation. Matsusaka T, Niimura F, Nishiyama A, Ichikawa I. Kidney Int. 2014;85:1068-77. doi: 10.1038/ki.2013.453. 査読有り
 5. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. Matsusaka T, Niimura F, Nishiyama A, Ichikawa I. J Am Soc Nephrol. 2012;23:1181-9. doi: 10.1681/ASN.2011121159. 査読有り
 6. ARB protects podocytes from HIV-1 nephropathy independently of podocyte AT1. Shimizu A, Zhong J, Miyazaki Y, Hosoya T, Ichikawa I, Matsusaka T. Nephrol Dial Transplant. 2012 Aug;27(8):3169-75. doi: 10.1093/ndt/gfs033. Epub 2012 Mar 15. PMID: 22422866 査読有り
 7. Podocyte injury damages other podocytes. Matsusaka T, Ichikawa I et al. J Am Soc Nephrol. 2011;22:1275-85. doi: 10.1681/ASN.2010090963. 査読有り
 8. Glomerular sclerosis is prevented during urinary tract obstruction due to podocyte protection. Matsusaka T, Ichikawa I et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2011;300:F792-800. doi: 10.1152/ajprenal.00570.2010. 査読有り
 9. Angiotensin receptor blocker protection against podocyte-induced sclerosis is podocyte angiotensin II type 1 receptor-independent. Matsusaka T, Niimura F, Ichikawa I. Hypertension. 2010;55:967-73. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.141994. 査読有り
- [学会発表](計 38 件)
1. Okabe M, Ichikawa I, Matsusaka T et al. A new mosaic model of segmental podocyte ablation. ASN Kidney Week. Nov. 14, 2014. Philadelphia, USA.
 2. Koizumi M, Fukagawa M, Matsusaka T. Glomerular fibrosis revisited: podocyte injury shuts down Colla2 mRNA, leading to abnormal collagen accumulation. ASN Kidney Week. Nov. 7-9, 2013. Atlanta, USA.
 3. Matsusaka T, Niimura F, Fukagawa M, Nishiyama A, Ichikawa I. Liver-, but Not Kidney- Specific Angiotensinogen Gene Knockout Abrogates the Enhancement of Renal Angiotensin II Synthesis that Follows Podocyte Injury in Progressive Glomerulosclerosis. ASN Kidney Week. Nov. 1-4, 2012. San Diego, USA.
 4. Ichikawa I, Niimura F, Nishiyama A, Matsusaka T. Filtered Angiotensinogen, Not Renal Renin, Determines the Renal Angiotensin II Synthesis when Podocytes Lose Their Molecular Barrier Function. ASN Kidney Week. Nov. 1-4, 2012. San Diego, USA.
 5. Niimura F, Matsusaka T, Ichikawa I et al. Angiotensinogen Is Filtered through the Glomerulus and Reabsorbed by the Proximal Tubule in Both Mice and Humans. ASN Kidney Week. Nov. 8-13, 2011. Philadelphia, USA.
 6. Ichikawa I, Matsusaka T et al. Liver-specific and Kidney-specific Angiotensinogen Gene Knockout Revealed That Renal Renin Activity and JGA Hypertrophy are Dependent on Blood Pressure, Not Renal Angiotensin. ASN Kidney Week. Nov. 18-21, 2010. Denver, USA.
- [図書](計 0 件)
[産業財産権]
出願状況(計 0 件) 取得状況(計 0 件)
[その他] 無
6. 研究組織
- (1)研究代表者
松阪 泰二 (MATSUSAKA, Taiji)
東海大学・医学部・内科・准教授
研究者番号：50317749
 - (2)研究分担者
市川 家國 (ICHIKAWA, Iekuni)
東海大学・医学部・客員教授
研究者番号：80317768
- 新村 文男 (NIIMURA, Fumio)
東海大学・医学部・小児科学・准教授
研究者番号：30282750
- 西山 成 (NISHIYAMA, Akira)
香川大学・医学部・薬理学・教授
研究者番号：10325334
- (3)連携研究者：無し
 - (4)研究協力者
Duncan J. Campbell, Professor, St. Vincent's Institute of Medical Research, Australia
- Ira Pastan, Professor, Laboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland
- 柳田素子、教授、京都大学医学部、大学院医学研究科