

## 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 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590877

研究課題名（和文）ポドサイトのノッチシグナル修飾による糸球体硬化の治療

研究課題名（英文）Treatment of focal segmental glomerulosclerosis by Notch signaling inhibition.

## 研究代表者

長田 道夫（NAGATA MICHIO）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10192238

研究成果の概要（和文）：進行性腎症である巣状糸球体硬化症（FSGS）の病因を調べるために、ポドサイトを特異的に障害するマウスモデルを用い、ノッチシグナルの関与について検討した。その結果、ポドサイト特異的障害により、虚脱型 FSGS が発症し、進行性のポドサイトの減少と、ボウマン嚢の増殖が起こった。ノッチシグナル系の発現は、ボウマン嚢上皮に強く認められ、これにそのリガンドの発現も認められたことから、ノッチシグナル系の発現はボウマン嚢上皮細胞の増殖と遊走を促し、FSGS 病変形成に関与する可能性が考えられた。そこで、培養ボウマン嚢上皮細胞を用いて TGF- $\beta$  によりノッチ発現を誘導すると、細胞が移動することを transmembrane migration assay, wound healing assay にて確認した。また、ノッチ阻害薬を添加したところ、ボウマン嚢上皮細胞の遊走は抑制されたが、増殖は抑制されなかった。そこで本 FSGS モデルマウスにノッチ阻害薬を投与したところ、ボウマン嚢上皮細胞病変は抑制されたものの、タンパク尿の増加、組織障害の増悪などが認められたことから、ポドサイト障害によるボウマン嚢上皮細胞遊走は、糸球体の創傷治癒機序としてノッチ依存性に起こり、その結果として FSGS 病変が形成されると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Collapsing focal segmental glomerulosclerosis (cFSGS) is a progressive kidney disease characterized by glomerular collapse with epithelial hyperplasia. Here we used a transgenic mouse model of cFSGS with immunotoxin-induced podocyte-specific injury to determine the role for Notch signaling in its pathogenesis. The mice exhibited progressive loss of podocytes and severe proteinuria concomitant with histological features of cFSGS. Hyperplastic epithelium was negative for genetic podocyte tags, but positive for the parietal epithelial cell marker claudin-1, and expressed Notch1, Jagged1, and Hes1 mRNA and protein. Enhanced Notch mRNA expression induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 in cultured parietal epithelial cells was associated with mesenchymal markers ( $\alpha$ -smooth muscle actin, vimentin, and Snail). Notch inhibition in vitro suppressed these phenotypic transcripts and Notch-dependent cell migration. Moreover, Notch inhibition in vivo significantly decreased parietal epithelial cell lesions but worsened proteinuria and histopathology in our cFSGS model. Thus, aberrant Notch1-mediated parietal epithelial cell migration with phenotypic changes appears to underlie the pathogenesis of cFSGS. Parietal epithelial cell hyperplasia may also represent an adaptive response to compensate for a disrupted filtration barrier with progressive podocyte loss.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓学

キーワード：ポドサイト、FSGS、ノッチシグナル

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は、難治性腎疾患の代表であるが、その原因は多岐にわたる。ポドサイト障害は FSGS 病態に深く関わり、原因に関わらない糸球体硬化の共通機構とされる。糸球体形成期にはノッチシグナルが特徴的な働きをし、この機構が FSGS の形成にも関与していると考えられる。

### 2. 研究の目的

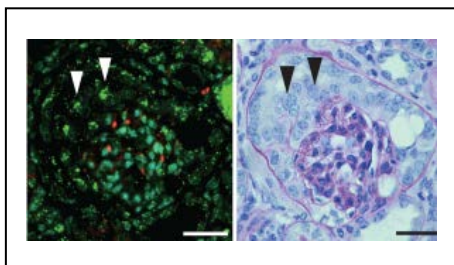
ポドサイト障害による FSGS の進展にノッチシグナルがどのように関与するのかを明らかにする目的で研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) ポドサイト特異的障害マウスモデル (NEP25) を用いて、in vivo において糸球体病変内に Notch シグナルが存在するか、存在するならばその発現細胞について、免疫染色、単離糸球体からの mRNA 発現などを調べた。次に、ボウマン嚢上皮細胞培養株を用いてノッチの阻害薬による細胞の生物学的活性を検討し、最後に NEP25 マウスにノッチ阻害薬を投与し、治療効果を検討した。

### 4. 研究成果

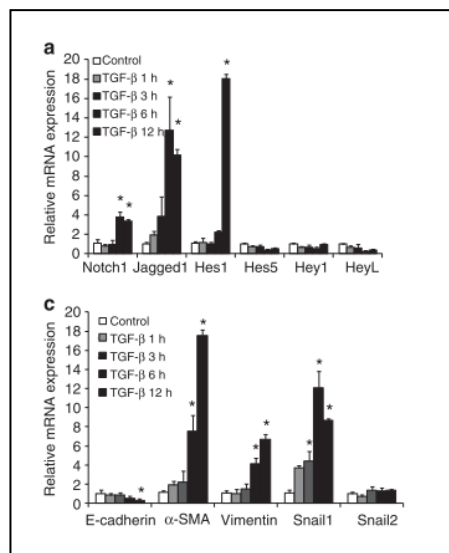
(1) ノッチ 1 は NEP25 マウス糸球体の増殖性病変に発現した。また、ノッチのリガンドである Jagged1, HES も同様に増殖性病変に発現した。ノッチとそのリガンド発現細胞は、beta-gal 染色や Claudin 1 陽性細胞との関連から、ボウマン嚢上皮細胞にノッチシグナルが発現することが分かった。



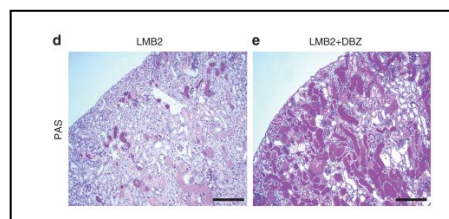
(2) ヒト FSGS 症例腎生検のサンプルでも同様の発現パターンが認められた。

(3) ボウマン嚢上皮細胞培養株において TGF-beta により増殖を促したところ、ノッチの発現と細胞の遊走がみられた。これは、ノッチの特異的阻害薬によりブロックされ

た。



(4) NEP25 マウスにノッチ特異的阻害薬を投与したところ、蛋白尿の増加、腎病理組織の悪化が観察された。



### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件、すべて査読有)

- (1) Ueno T, Kobayashi N, Nakayama M, Takashima Y, Uesugi N, Pastan D, Pippin J, Shankland S, Matsusaka Nagata M. Aberrant Notch1-dependent effects on glomerular parietal epithelial cells promotes collapsing focal segmental glomerulosclerosis with progressive podocyte loss. *Kidney Int*

- 2013
- (2) Ueno T, Takeda Y, Nagata M. Remission of proteinuria in renal amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Nephrol Dial Transplant* 2012 Feb;27(2):633-9.
- (3) Honda K, Taneda S, Yumura W Nitta K, Oda H, Nagata M. Histological heterogeneity of glomerular segmental lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *Int Urol Nephrol*44(1):183-96. 2012
- (4) Yamaguchi Y, Kanetsuna Y, Honda K, Kawano M, Yamanaka N, Nagata M Characteristic tubulointerstitial nephritis in IgG4-related disease. *Human Pathol* 2012 Apr;43(4):536-549.
- (5) Iijima K, Someya T, Ito S, Nozu K, Nakanishi K, Matsuoka K, Ohashi H, Nagata M, Kamei K, Sasaki S. Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele. *Pediatrics*. 2012 Jun;129(6):e1621-5. Epub 2012 May 14.
- (6) Ito K, Yamada K, Mizushima I, Aizu M, Fujii H, Mizutomi K, Matsumura M, Hayashi K, Yamagish M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, Kawano M. Henoch-Schönlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: A possible association. *Clin Nephrol*. 2012 Feb 17. [Epub ahead of print]
- (7) Tanaka M, Seki G, Ishizawa K, Hirahashi J, Miura K, Sekine T, Someya T, Hataya H, Nagata M, Fujita T. Resolution of Henoch-Schönlein purpura nephritis after acquired IgA deficiency. *Pediatr Nephrol*. 2010 Nov;25(11):2355-8. Epub 2010 Jun 6.
- (8) Sakai K, Morito N, Usui J, Hagiwara M, Hiwatashi A, Fukuda K, Nanmoku T, Toda T, Matsui N, Nagata M, Yamagata K. Focal segmental glomerulosclerosis as a complication of hepatitis B virus infection. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jan;26(1):371-3.
- (9) Tanaka M, Seki G, Someya T, Nagata M, Fujita T. Aberrantly glycosylated IgA1 as a factor in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Clin Dev Immunol*. 2011; *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011: 470803. Published online 2011 January 24
- (10) Kaito H, Kamei K, Kikuchi E, Ogura M, Matsuoka K, Nagata M, Iijima K, Ito S. Successful treatment of collapsing focal segmental glomerulosclerosis with a combination of rituximab, steroids and ciclosporin. *Pediatr Nephrol*. 2010 May;25(5):957-9.
- (11) Fujita H, Hida M, Kanemoto K, Fukuda K, Nagata M, Awazu M. Cyclic stretch induces proliferation and TGF-beta1-mediated apoptosis via p38 and ERK in ureteric bud cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Sep;299(3):F648-55. Epub 2010 Apr 14.
- [学会発表] (計 7 件)
- 1) 長田道夫 シンポジウム、腎糸球体のリモデリングと分節性硬化 第57回 日本病理学会秋期特別総会 2011年11月18日 東京
- 2) Satoshi Takahashi, Keiju Hiromura, Mayuko Tsukida, Yuko Ohishi, Hiroko Hamatani, Noriyuki Sakurai, Toru Sakairi, Hidekazu Ikeuchi, Akito Maeshima,

- Takashi Kuroiwa, Michio Nagata, Yoshihisa Nojima. A Novel Case of Nephrotic Syndrome Caused by Immune-Mediated Severe LCAT Deficiency. American Society of Nephrology Kidney week 2011. 2011年11月12日 アメリカ
- 3) Namiko Kobayashi, Toshiharu Ueno, Toshio Miyata, Taiji Matsusaka, Michio Nagata. Podocyte Injury Specific Microangiopathy in Collapsing FSGS; the Role of PAI-1 and the Beneficial Effect of Its Inhibitor TM5484. American Society of Nephrology Kidney week 2011. 2011年11月11日 アメリカ
- 4) Toshiharu Ueno, Namiko Kobayashi, Takamoto Ohse, Taiji Matsusaka, Jeffrey W. Pippin, Stuart J. Shankland, Michio Nagata. Novel Roles of Notch Signal in the Pathogenesis of Collapsing FSGS. American Society of Nephrology Kidney week 2011. 2011年11月11日アメリカ
- 5) Michio Nagata: シンポジウム Podocytology and FSGS. 第46回日本小児腎臓病学会学術集会 2011年6月13日 福岡
- 6) Mariko Hida, Michio Nagata, Midori Awazul: Downregulation of mTOR signaling pathway by maternal nutrient restriction in rat metanephros. 第46回日本小児腎臓病学会学術集会 2011年6月13日 福岡
- 7) Shigeru Fukuyama, Tomoo Kise, Hiroshi Yoshimura, Michio Nagata, Kunihiro Aya: Two patients of atypical infantile nephritic syndrome. 第46回日本小児腎臓病学会学術集会 2011年6月13日福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 道夫 (NAGATA MICHIO)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：10192238