

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659442

研究課題名（和文） 糸球体上皮細胞前駆細胞を用いた糸球体再生法の開発

研究課題名（英文） Establishment of the technique to convert the immature podocyte to differentiated podocyte with the interdigitated foot process.

研究代表者

河内 裕 (KAWACHI HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60242400

研究成果の概要（和文）：

糸球体上皮細胞（ポドサイト）の分化、成熟に関わる分子の同定を目的として次世代シーケンサなどを用いた解析を行い、カチオンチャネル分子であるTRPM4、シナプス関連分子であるNeurologinがポドサイトの足突起の形成、糸球体のバリアー装置であるスリット膜の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、胎生18日ラットより摘出した後腎原基を試験管内で足突起形成を誘導する培養法を確立した。今回の検討で同定した分子を強制発現することにより、ポドサイトの分化誘導につなげることができると考えられる。前駆細胞をポドサイトに分化させることによる糸球体再生法の開発のための重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

In this study we found that TRPM4 a cation channel molecule and neurologin a synapse protein play a role for podocyte differentiation to form the slit diaphragm. We established the culture technique to form foot process in metanephroi from e-18 rat embryo. It is expected that the transformation of these molecules can enhance the podocyte differentiation. It is convinced that the findings obtained in this study contribute to the establishment the technique to convert the immature podocyte to the differentiated podocyte with the interdigitated foot processes and the slit diaphragm.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体上皮細胞、ポドサイト、足突起、スリット膜、カチオンチャネル、シナプス小胞、

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全の治療法は、透析療法、腎移植療法しかなく、腎移植は限られた患者しか機会がないというのが現状である。現在、全国で約30万人の方が血液透析を受けおられ、その総コストは、年間1兆円を超えていると報告されている。腎不全に至る原疾患として重要なのは慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症などの糸球体疾患である。糸球体を再生させる技術を開発することは、腎不全進行阻止に向け

た戦略上極めて重要である。

## 2. 研究の目的

糸球体の構造維持、濾過障壁の形成に最も重要な細胞である糸球体上皮細胞（ポドサイト）は増殖能を持たない終末分化細胞である。本研究の目的は、(1)ポドサイトの分化・成熟機構を解明すること。(2)ポドサイトの前駆細胞をポドサイトに分化誘導させる方法

を開発し、ポドサイトを再生させることにより、糸球体機能を回復させる方法の開発のための基礎研究を進めることである。

### 3. 研究の方法

(1) ボウマン嚢上皮細胞、ポドサイトの遺伝子プロファイル：成熟ラットから腎を摘出、糸球体を単離する。実体顕微鏡下での観察で、ボウマン嚢が剥離している糸球体（血管網）とボウマン嚢を分離する。得られた糸球体毛細血管網を collagenase 処理し、細胞を遊離させ、抗ポドカリキシン抗体を用いたパンニング法によりポドサイトを分離した。また剥離したボウマン嚢からボウマン嚢上皮細胞を分離する。得られたポドサイト、ボウマン嚢上皮細胞の遺伝子発現のプロファイリングを行った。

(2) 培養ポドサイト (Dr. M. Mundel より供与) の未分化条件での培養細胞と分化条件での細胞の遺伝子プロファイリングを行い、分化、成熟過程で発現が増加する分子の探索を行った。

(3) 胎生 15.5 日齢ラットから摘出した後腎原器培養系を用いて成熟過程で発現が変化する分子を同定する作業を行った。

(4) 研究代表者はこれまでの研究でシナプス小胞関連分子がポドサイトに発現しておりポドサイトの機能分子の細胞内輸送に関与していることを示す所見を得ており、シナプス小胞関連分子がポドサイトの分化構造の形成、維持に重要な役割を果たしていると考えている。シナプス関連分子群のポドサイトでの発現、分化課程での発現の動態の解析を行った。

(5) 上記(1-5)の検討で得られた分子群の分化誘導機能を解析するため、siRNA 技術を用いて候補分子をノックダウンさせた培養ポドサイトの形態観察、機能分子の発現の検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) Subtraction法, Differential display法, 次世代シーケンサを用いた検討でポドサイトの分化構造の形成、維持に関わる分子として 20 余種の分子を同定した。

(2) 胎生 15.5、18.5 日齢ラットから摘出した後腎原器培養系を確立し、培養条件下で足突起が形成されるのを観察した。この系は足突起形成機序の検討のために有用であると考えられる。

(3) 次世代シーケンサでの検討で、Adherens junction 関連分子の発現低下がポドサイトの成熟分化に関与していることを示す所見を得た。

(4) カチオンチャネル分子である TRPM4 が糸球体上皮細胞基底部に発現していることを観察した (図 1)。TRPM4 は未分化ポドサイトでの

発現は極めて低くポドサイトの分化とともにその発現が増強すること (図 2)、スリット膜のバリア機能を喪失した細胞では発現の著しい低下が認められることを観察した (図 3)。

図 1



図 2

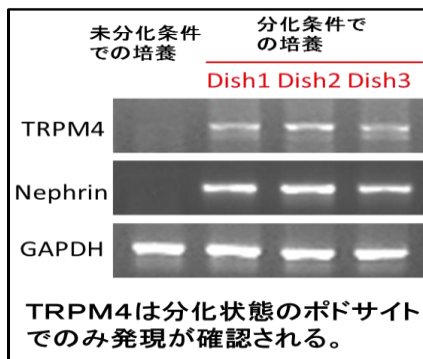
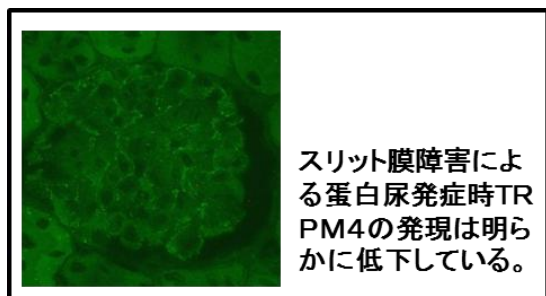


図 3



(5) シナプス間隙を結ぶ分子である Neurexin-Neurologin がスリット膜部に発現していること (図 4)、スリット膜のバリア機能の低下時、その発現が低下していることを観察した。Neurologin をノックアウトした培養ポドサイトでは細胞間接着装置の主要構成分子である ZO-1 の発現、局在が変化するのを観察した、この所見は、Neurologin がポドサイトの分化構造である足突起間の細胞間接着装置の形成、維持に役割を果たしていることを示していると考えられる。(図 5)

図 4

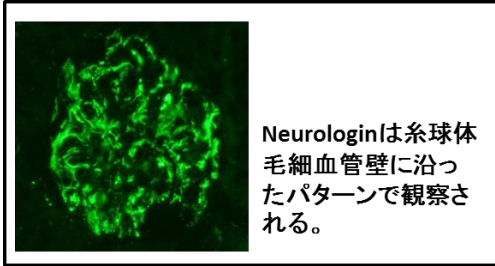
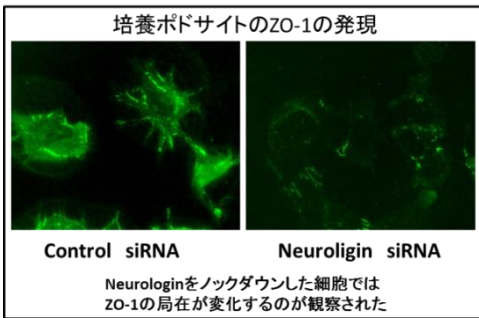


図 5



以上、報告したように本研究費補助金による研究で、ポドサイト（糸球体上皮細胞）の分化構造の形成、維持に関わる分子を同定することができた。TRPM4, Neurologinに関する最新の知見は第56回日本腎臓学会学術総会（東京、2013年5月）において報告した。

今回の研究で得られた知見は、蛋白尿という極めて重要な臨床症状を引き起こす原因となる細胞の分子構造の解明、蛋白尿の発症機序の解明につながる重要な情報である。また、今回同定した分子を強制発現することにより、分化誘導につなげることができると考えられる。今回の研究でポドサイト（糸球体上皮細胞）の分化による糸球体再生法の開発のための重要な情報を得ることができた。

#### 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 20 件）

1. Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Soetikno V, Nagata M, Nakamura T, Takahashi T, Sone H, Kawachi H, Watanabe K. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 45:438-447.2013 doi:10.1016/j.biocel.2012.09.017. (査読有)
2. 河内裕、高橋彩、山崎美穂子、福住好恭、富田雅之  
腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）スリット膜の構造と機能－ARB のポドサイト保護作用－Pharma Medica、2013 印刷中
3. Soetikno V, Sari FR, Lakshmanan AP, Arumugam S, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K. Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1 pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2012 doi: 10.1002/mnfr.201200540. (査読有)
4. Soetikno V, Sari FR, Sukumaran V, Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K. Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK-SREBP signaling pathway in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2012 Aug 13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.013. (査読有)
5. Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Thandavarayan RA, Kawachi Y, Yokoyama J, Tomita M, Kawachi H, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H, Takagi R. Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol.* 45: 140-151. 2012 (査読有) .
6. Ramadan R, Faour D, Awad H, Khateeb E, Cohen R, Yahia A, Torgovicky R, Cohen R, Lazari D, Kawachi H, Abassi Z. Early treatment with everolimus exerts nephroprotective effect in rats with adriamycin-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 27:2231-2241. 2012 doi: 10.1093/ndt/gfr581. (査読有)
7. Tanabe M, Shimizu A, Masuda Y, Kataoka M, Ishikawa A, Wakamatsu K, Mii A, Fujita E, Higo S, Kan. Development of lymphatic vasculature and morphological characterization in rat kidney. *Clin Exp Nephrol.* 16:833-842.2012 doi: 10.1007/s10157-012-0637-z. (査読有)
8. Sofue T, Kiyomoto H, Kobori H, Urushihara M, Nishijima Y, Kaifu K, Hara T, Matsumoto S, Ichimura A,

- Ohsaki H, Hitomi H, **Kawachi H**, Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *Am J Hypertens*. 25(5):604-11.2012 doi: 10.1038/ajh.2012.1. (査読有)
9. Sato A, Piao H, Nozawa Y, Morioka T, **Kawachi H**, Oite T. Local delivery of a direct renin inhibitor into the kidney ameliorates progression of experimental glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol*. :539-48. 2012 doi: 10.1007/s10157-012-0601-y. (査読有)
  10. Toyama K, Morisaki H, Cheng J, **Kawachi H**, Shimizu F, Ikawa M, Okabe M, Morisaki T. Proteinuria in AMPD2-deficient mice. *Genes Cells*. 17:28-38.2012 doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01568.x. (査読有)
  11. 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 renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Transl Res*. 158:235-48.2012 doi: 10.1016/j.trsl.2011.05.003. (査読有)
  12. Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, Lakshmanan AP, Suzuki K, **Kawachi H**, Watanabe K. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. *Nutr Metab (Lond)*. 8:35.2011 doi: 10.1186/1743-7075-8-35. (査読有)
  13. Suzuki K, Sun X, Nagata M, Kawase T, Yamaguchi H, Sukumaran V, Kawachi Y, **Kawachi H**, Nishino T, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathol Int*. 61:228-238.2011 doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02647.x. (査読有)
  14. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, Narita I, **Kawachi H**, Polkinghorne KR, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology* 58:198-210. 2011: doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03742.x. (査読有)
  15. Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M, Sumi T, Tomita M, Ikezumi Y, Suzuki K, Koitabashi Y, Shimizu F, **Kawachi H**. Neurexin-1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comparative Physiology* 300: R340-R348. 2011 doi: 10.1152/ajpregu.00640.2009 (査読有)
  16. Ohtsuka Y, Kanaji T, Nishi M, Sakai N, Sato T, Aoki S, Wakayama K, Nakazato S, Hisano S, Sado Y, **Kawachi H**, Izuhara K, Hamasaki Y. A notable case report of May-Hegglin anomaly with immune complex-related nephropathy: a genetic and histological analysis. *Clin Nephrol* 75:255-262, 2011 doi: 10.5414/CNP75255 (査読有)
  17. Kojima K, Nosaka H, Kishimoto Y, Nishiyama Y, Fukuda S, Shimada M, Kodaka K, Saito F, Matsumura K, Shimizu T, Toda T, Takeda S, **Kawachi H**, Uchida S. Defective glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan contributes to podocyte flattening. *Kidney Int* 79:311-316. 2011 doi: 10.1038/ki.2010.403 (査読有)
  18. Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, Kimura T, Kitamura H, **Kawachi H**, Li XK, Hünig T, Takahara S, Rakugi H, Isaka Y. CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangio proliferative glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol* 15:50-57. 2011 doi: 10.1007/s10157-010-0370-4. (査読有)
  19. 河内裕、長田道夫、膜性腎症（特発性膜性腎症）腎臓 33 : 227-231, 2011
  20. 長田道夫、河内裕、ループス腎炎モデル腎臓 34 : 48 -53, 2011

[学会発表] (計 23 件)

1. 高崎麻美、TRPM4 のポドサイトにおける発現様式、ネフローゼモデルにおける発現動態の検討. 第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9 日～11 日、東京
2. 鎌田悠志、ポドサイト機能維持における Neurologin-1 の役割. 第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9 日～11 日、東京
3. 福住好恭、シナプス小胞分子 SV2B のポドサイト機能維持における役割—ノックアウトマウスを用いた解析—. 第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9～11 日、東京
4. 高橋彩、ネフローゼ症候群モデルにおける Endomucin 発現動態の検討. 第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9～11 日、東京
5. 高橋雄一、ラット巣状糸球体硬化症モデルにおける Rituximab の蛋白尿抑制効果. 第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9 日～11 日、第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9～11 日、東京
6. 相馬彩子、糸球体上皮細胞障害モデルにおける Calcineurin の発現の解析. 第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9～11 日、東京
7. 河内裕、糸球体上皮細胞の細胞生物学、第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 9～11 日、東京
8. Yamazaki Y, Glomerular expression of Renin-Angiotensin system components in Rats with podocyte dysfunction 第 45 回アメリカ腎臓学会総会、2012 年 10 月 30 日～11 月 4 日、サンディエゴ、アメリカ
9. Takahashi Y, Role of p38 MAPK activation in the slit diaphragm dysfunction and proteinuria caused by a direct stimulation to nephrin 第 45 回アメリカ腎臓学会総会、2012 年 10 月 30 日～11 月 4 日、サンディエゴ、アメリカ
10. Tomita M, Ephrin-B is interacted with nephrin and plays an important role in the slit diaphragm. —Decreased expression of ephrin-B is an early marker to detect slit diaphragm dysfunction— 9th International Podocyte Conference 2012 年 04 月 22 日～25 日 Miami Beach Resort & Spa マイアミ、アメリカ
11. Murad H, Ephrin - B1 in podocyte is interacted with nephrin and is phosphorylated by a signal from nephrin 第 44 回アメリカ腎臓学会総会、2011 年 11 月 10 日～13 日、フィラデルフィア、アメリカ、

12. Murad H, Ephrin-B1 is expressed at the slit diaphragm and is structurally and functionally interacted with nephrin. 国際腎臓学会 (ISN) Forefront Symposium、2011 年 9 月 22 日～25 日、オーフス、デンマーク

[図書] (計 2 件)

1. 河内裕、「小児腎臓病学」診断と治療社、2011 年、p94-98.
2. 河内裕、「腎臓症候群」日本臨床社、2011 年、p93-96.

[その他]

ホームページ：  
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/nim/welcomej.html> にて成果の概要を報告

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 裕 (KAWACHI HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60242400