

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591187

研究課題名(和文)系球体障害におけるポドサイトと内皮細胞の細胞間協調メカニズムの解明

研究課題名(英文)The elucidation of interaction between glomerular podocyte and endothelium in glomerular injury

研究代表者

清元 秀泰 (kiyomoto, hideyasu)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：00304585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎障害の原因として系球体上皮細胞(ポドサイト)と内皮細胞のクロストークは重要であり、系球体の濾過膜を挟んだポドサイトと内皮細胞の直接的もしくはエンドクリン/パラクリン的な相互作用の破綻が疾患発症や進展に寄与していると考えられている。我々はヒト臨床における血栓性微小血管炎(TMA)の事案から、ポドサイト領域に豊富に存在する血栓形成や炎症反応の中心的物質であるプラスミノゲン活性化阻害因子(PAI-1)に注目し、腎炎モデル動物でのPAI-1の関与とインシリコ技術で合成された新規PAI-1阻害薬の有効性を検証し、系球体腎炎発症に関するPAI-1の役割と抗炎症作用を介した腎炎治療の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The loss of interaction between glomerular podocyte and endothelium leads to severe glomerular injuries such as thrombotic micro-angiopathy (TMA) like glomerulonephritis. Both cells affect each other with endocrine and/or paracrine manner beside the glomerulus basement membrane. The lack of cross-talk between cells leads to initiate glomerulonephritis and accelerate the disease condition. There are certain activities of the plasminogen activation inhibitor (PAI-1) around the glomerular podocyte area in clinical thrombi-genesis and inflammatory reaction, which may involve the progression glomerular damages such as TMA. We verified a newly developing PAI-1 inhibitor to examine the effectiveness onto the animal models of glomerulonephritis. The inhibitor of PAI-1 significantly decreased inflammatory changes and ameliorates the progression of renal injury. These findings suggest a small molecule PAI-1 inhibitor represents new therapeutic strategy as anti-inflammatory agents.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：系球体腎炎 血栓性微小血管炎 ポドサイト 内皮障害 PAI-1阻害薬

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や高血圧などの生活習慣病の拡大から、本邦のみならず腎不全患者は世界的規模で増加している。爆発的な腎不全患者の増大は維持透析療法への医療費の投入で各国の医療経済に大きな負担となっているだけでなく、近年は慢性腎臓病が全身の心血管障害と関連するいわゆる“心腎連関”が提唱され、早期からの積極的な腎障害への介入が重要視されている。

腎糸球体係蹄にはメサンジウム細胞、内皮細胞、上皮細胞（ポドサイト）が基底膜を挟む形で存在しており、個々の細胞については蓄積された今までの研究成果によってある程度の機能や役割などが明らかになってきた。古くから研究されているメサンジウム細胞は貪食能、収縮能、遊走能を有する細胞で、IgA 腎症や膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎などの糸球体腎炎では主に細胞増殖とメサンジウム基質の拡大に寄与することが特徴である。また、糸球体内皮細胞は内皮依存性拡張因子である一酸化窒素やプロスタノイドを産生し、腎循環調節と抗血栓作用に重要な細胞であり、その内皮細胞の機能低下は溶血性尿毒症性症候群や血栓性血小板減少性紫斑病などに代表される重篤な血栓性微小血管炎（TMA）を引き起こす。

一方、糸球体基底膜の尿細管管腔側に存在するポドサイトは長らくその機能もブラックボックスであった。これは、ポドサイトは神経細胞と同様のタンパク発現（シナプトポディンなど）呈する非常に機能的分化度の高い細胞であるため単離培養は困難を極め、十分なポドサイト研究は 21 世紀に入るまで遅々として進まなかった。しかし、臨床的には微小変化型ネフローゼ症候群ではポドサイトの足突起消失が唯一の病理所見であり、また、難治性ネフローゼ症候群の代表的疾患である巣状糸球体硬化症（FSGS）では、脂質異常症に伴う酸化 LDL コレステロール（Ox-LDL）が増悪因子として示唆され、強制的に LDL コレステロールを排除する LDL アフェレシスが治療の中に組み込まれている。

このような臨床でのエビデンスに加え、ポドサイトの重要性は意外にも腎臓以外の臨床現場からの報告が糸口となって近年注目を集めることになった。トロント大学の Quaggin らは、血管内皮増殖因子 VEGF の抗体を用いた腫瘍治療の際、治療を受けた癌患者にタンパク尿と進行性の腎障害が高率に認められることを見出した。彼女たちはこの

事象の原因は、ポドサイト由来の VEGF 分泌不全が最初に誘導され、次いで VEGF 受容体を介した糸球体内皮細胞の恒常性の破綻につながり、更に内皮細胞機能不全から引き起こされる TMA が病気の本態ではないかと仮説を立てた。そして、彼女たちの予想通り、解析結果はポドサイトはパラクリンの VEGF を糸球体内皮細胞に向けて分泌し、内皮細胞の VEGF 受容体を介したポドサイトによる糸球体係蹄の恒常性維持機構を証明した。すなわち、ポドサイトと内皮細胞の VEGF を介した細胞間情報伝達が破綻すると内皮障害が顕著となり、腎糸球体を中心とした TMA が生じることを明らかにしたのである（Eremina V, et al. *New Engl J Med.* 358:1129-1136. 2008）。

一方、我々も糖尿病性腎症や腎炎の組織障害を研究するなかで、腎障害の初期病変におけるポドサイトの重要性を認識するようになってきた。我々は 2004 年以降、2 型糖尿病性腎症の発症メカニズムについて研究を開始し、糖尿病早期に認められる微量アルブミン尿は、デスミン染色で評価するポドサイト障害に起因するものであり、この障害はアンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）の単なる降圧効果とは異なるメカニズムでポドサイト障害を予防する事、更に、このポドサイト保護効果は早期介入することがより重要であることを示した（Nishiyama A, et al. *J Hypertens.* 26:1849-1859, 2008）。驚くことに、顕性タンパク尿期にまで進行した 2 型糖尿病性腎症においても、十分な ARB 投与によってタンパク尿を減少させることができ、組織学的にも皮質表層に存在する糸球体という限定はあるものの、デスミン染色で評価したポドサイト障害が ARB によって少なくとも改善できる事を示した（Ihara G, Kiyomoto H, et al. *J Hypertens.* 28:2289-2298, 2010）。この一連の研究は、近年行われた糖尿病におけるヒト大規模臨床試験でも確認され、ARB の早期介入によって糖尿病による微量アルブミン尿の出現が抑制できる可能性が示された（Haller H, Ito S, et al. *New Engl J Med.* 364:907-17. 2011）。

しかしながら、ARB は基本的には降圧薬として開発された薬剤であり、元来は腎臓に対する特異的な薬効を発揮する薬剤ではない。これらの薬剤には、基本的に腎症に対しての有効性を検証する proof of concept（POC）がないため、高血圧を有していない患者に積極的に投与できない。更に、十分な腎保護を

発揮するだけの容量を投与すれば、過降圧による副作用も懸念される。このような現状をふまえて、腎系球体病変の発症や進展抑制の POC を有する“真の腎疾患有効な新薬”の開発が臨床現場で渴望されている (Miyata T, Kikuchi K, Kiyomoto H, et al. Nature Review Nephrology 7:469-477,2011)。

前述の TMA や FSGS は希少疾患であるが、ひとたび発症すれば重篤かつ難治性であり、複雑な細胞間ネットワークや細胞間相互作用の破綻が病態に大きく関与していると推測される。特に TMA は内皮障害を伴うため高率に血栓形成が認められ、腎から全身へ TMA は急速に波及し、その生命予後も著しく悪い疾患である。現在、臨床的にヘパリンやワルファリン、抗血小板薬に加え、糸球体循環改善と抗血栓作用を有するプロスタノイドの有用性の報告が散見されるが、このような抗凝固・抗血小板療法の有効性は臨床試験で明確に示されていないため、TMA に対する新薬が待望されている。そこで、我々は腎系球体、特にポドサイト領域に豊富に存在する血栓形成や炎症反応の中心的物質であるプラスミノーゲン活性化阻害因子 (PAI-1) に注目し、この阻害薬が TMA に対して有効でないかと仮説を立てている。現在、東北大学では *in silico* およびハイスループット・スクリーニングによる標的阻害薬の探索が盛んであり、PAI-1 阻害薬の最適化と前臨床試験が企画されている事より、本研究では TMA による腎障害メカニズムの解明と PAI-1 阻害薬の有効性について、早期探索的臨床研究と並行しながら推進していくことを計画している。

2. 研究の目的

TMA 様の血管障害を伴う腎炎モデルでポドサイト障害と内皮細胞障害の関連について、まず *in vivo* で検討する。

次いで、ポドサイトと内皮細胞の細胞相互作用を障害する因子 (PAI-1 や酸化 LDL) に対する阻害薬を用いて、腎障害が軽快するか検証する (平成 24 年度)。更に、一連の動物実験に並行して、ポドサイト単離培養系および内皮細胞との共培養系を用いて、*in vivo* で認められた事象や各阻害薬の効果に関して、分子生物学的手法を駆使してポドサイトと内皮細胞障害に関するメカニズムを検討する (平成 25 年度)。そして、最終年である平成 26 年度では得られた結果の詳細な解析による論文化に努め、更に有力な化合物に関してはヒトへの臨床応用に向けた特許申請、並行する早期探索的臨床試験への橋渡しを行う。

3. 研究の方法

ポドサイト障害を有する腎炎モデルラットの作成と病態関連物質の評価 (*in vivo*)

到達目標：従来からメサンジウム増殖性腎炎として抗 Thy1.1 腎炎が知られているが、その誘導を行う抗体のエピトープ認識部位に差があり、引き起こされる腎炎の重症度や障害部には若干の差異が認められる。この腎炎のオリジナルは ER4G 抗体であるが、汎用される OX-7 ではメサンジウム融解のみが顕著で、腎炎誘導にけるポドサイト障害はほとんどない。この差異を利用して、腎炎におけるポドサイトの役割を明らかにすることを主眼にしている。この腎炎に対して東北大学において新規合成した PAI-1 阻害薬の有効性を検証する。

1) 腎炎惹起抗体の調整：

BALC マウス (4 週令) の腹腔に pristane 1ml をあらかじめ投与しておく。

腹水が出現してくる投与約 2 週間後、GIT 培地上で培養した ER4G クローンと OX-7 クローンの B 細胞ハイブリドーマを 10^7 個/ml に調整し、各マウスの腹腔に 1ml ずつ投与する。

更に 2 週間後、播種したハイブリドーマの産生した腹水を回収するため、頸椎脱臼で屠殺し腹水を回収したのち、proteinA カラムにて IgG を精製し、1 mg/ml になるように調整する。

抗 Thy1.1 腎炎の作成：6 週令の SD ラットに経静脈的に 1mg/kg の抗 Thy1.1 抗体 (各 ER4G、OX-7 由来) を投与し、抗体投与後 3 日目、7 日目、14 日目にラットを屠殺し、腎組織における病理学的検討を行う。屠殺の前 24 時間はメタボリックケージにラットを収容し、腎機能検査を行う。腎機能はクレアチニン・クリアランス法で定量し、一日タンパク尿定量も追加し、腎機能の評価する。

2) 病理組織評価 (ER4G 抗体、OX-7 抗体による組織像の比較)：

十分な深度の麻酔をかけたラットの両腎を灌流した後に回収し、腎組織をホルマリン固定、OCT コンパウンドにそれぞれ固定する。ホルマリン固定切片は通常の HE, PAS, PAM, MT 染色によって病理スコア (微小動脈瘤形成スコアを含む) を算出する。一方、OCT 包埋されたサンプルは免疫染色、もしくは特殊染色を行い、以下の項目を検討する。

非障害ポドサイト評価：WT-1 染色、障害ポドサイト評価：デスミン染色、マクローファージ遊走評価：ED-1 染色、内皮細胞評価：Factor α 、Vimentin、内皮ポドサイト相互作用評価：VEGF、VEGFR、血栓形成評価：PTAH 染、Fibrinogen 免疫染色を行い病理学的な検討を行う。

病態関連因子の阻害薬を用いた腎障害改善効果の検証 (*in vivo*)

到達目標：薬剤投与は腎炎誘導の 3 日前より行い、十分な血中濃度に達した状況で検討する。I での腎炎評価④～⑥を行い、各種薬剤の有効性を評価する。検討する薬剤は、現在、東北大学でリード化合物として臨床試験を検討している PAI-1 阻害薬であり、その対照薬は一般的な抗血小板薬 (チクロピジン) を Head to Head で比較検討する。

・単離ポドサイト培養系における有効阻害薬の分子学的作用メカニズムの解明 (in vitro)

到達目標：分化度の高い培養ポドサイト系を確立し、I、IIで認められたポドサイト障害に關与するタンパクの発現調節と薬剤有効性に関して、RT-PCR、ウェスタン・ブロッティング法、レンチウイルス・ベクターによる標的遺伝子のノックアウトなどを駆使して、そのメカニズムを検討する。

不死化したマウス・ポドサイト (Peter Mundel 博士により確立された培養系) は、共同研究者であるマイアミ大学の腎臓内科の Jochen Reiser 教授より供与を受けた。

ポドサイトは IFN- 投与後に 33 で増殖させ、IFN- を含まない培地に 37 に温度を上げて機能分化させる。ポドサイトの正常分化については、アクチンファイバー形成およびシナプトポディン発現にて確認する。

無血清培地にて 24 時間培養したポドサイトに各種アゴニストを加え、細胞死 (ネクローシスおよびアポトーシス) を評価する。

ネクローシスに関しては、ポドサイトの培地より 50 μ l 上清を 96well プレートに移し、Cytotoxicity Detection Kit (Roche) を用いて LDH を測定し、評価する。

スロンピンなど PAI-1 アゴニストによって刺激を行った細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR にて機能的ポドサイトのマーカーと共に、PAI-1、VEGF、WT-1、Nephrin、Podocin、などの遺伝子発現を評価する。

更に、直接的にポドサイトの足突起障害を誘導する LPS、Puromycin aminonucleoside (PAN) を投与しアポトーシスが誘導される事を確認し、そのアポトーシス誘導が PAI-1 阻害薬によって抑制できるか否かを検討する。尚、アポトーシスに関しては Caspase-3 アッセイと DNA laddering によって評価する。

PAI-1、VEGF など各関連因子の shRNA をレンチウイルスによって導入し、その細胞内機能を評価する。この時の対照実験として、non-target shRNA 導入ポドサイト細胞も作成し、⑪、⑫で用いたアゴニスト刺激による各反応性について比較検討する。

4. 研究成果

Pristane 投与 BALBc マウス (4 週令) より生成した ER4G クローン B 細胞ハイブリドマ由来の抗体を用いて、6 週令の SD ラットに経静脈的な ER4G 抗体 (1 mg/kg) 注入によって重篤な血栓性微小血管炎 (TMA) を誘導した。血管炎起因の腎障害は一般的な病理評価に加え WT-1 染色、デスミン染色 ED-1、PATH 染色など免疫染色で腎組織変化を評価し、クリアランス試験は代謝ケージにて行い腎障害評価モデルとして機能評価した。

この動物実験に新開発された抗血栓・抗炎症

効果の期待できる plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 阻害薬を従来からある抗血小板薬のクロピドグレルと比較した。この新しいリード化合物 TM5275 は東北大学が中心となり in silico 解析から合成され、前臨床段階までに最適されたもので、その臨床応用の可能性を検討した。

TM5275 は TMA 様腎炎の発症と進展に關し、ポドサイト障害軽減保護効果を確認した。特に血栓性血小板減少性紫斑病に認められるような内皮細胞障害型病変は明らかに軽減していた。一方、動物実験系と並行して分化度の高い培養ポドサイト系を確立し、ポドサイト障害に關与するタンパクの発現調節と薬剤有効性に関して、RT-PCR、ウェスタン・ブロッティング法などによる直接的な効果も検証した。しかし、この in vitro 実験系ではポドサイトに対する TM5275 の保護効果がきわめて弱く、直接的なポドサイト保護は認めなかった。ネクローシスに対する評価のでも再現性なく、この in vitro 実験系では検証が不十分であり、十分な検証結果を論文等にまとめることはできなかった。

そこで、その他の臓器や対象疾患への臨床応用も想定し、無菌性外因的腹膜炎を起こしたモデル動物を作成し、腹腔内への炎症性マクロファージの浸潤抑制効果を検討することで、PAI-1 阻害薬の抗炎症作用を検討した。実際、このモデルに TM5275 を投与すると腹腔内への有意なマクロファージの遊走が有意に抑制され、抗炎症効果を確認することができた。さらに、この効果に関してはノックアウトマウスを用いた実験を加えることで、LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) を介した反応であることを見出し、最終報告をまとめ上げた。

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 2 件)

1. A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33(5):935-42, 2013. 査読有
2. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S,

Yamamoto M. J Am Soc
Nephrol.24(10):1599-616, 2013.
査読有

〔学会発表〕(計 2件)

松本幸子、清元秀泰、市村敦彦、中道崇、
段孝、森建史、伊藤貞嘉、宮田敏男
第55回 日本腎臓学会
2012年6月1日
パシフィコ横浜(横浜)
「糸球体障害におけるポドサイトの役割と
新規 Plasminogen activator inhibitor
(PAI)-1 阻害薬 TM5275 の効果」

Matsumoto S, Kiyomoto H,
Atsuhiro I, takashi D, Takashi N,
tadashi T, koji A, sadayoshi I,
Tosho M
第49回 欧州腎臓学会
2012年5月26日、
Palais des Congres de Paris (パリ)
PHARMACOLOGICAL SUPPRESSION
Of PLASMINOGEN ACTIVATOR
INHIBITOR-1(PAI-1)AMELIORATES
THE INJURY OF GLOMERULAR
PODOCYTE IN THE EXPERIMENTAL
GLOMERULONEPHRITIS.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

東北大学
東北メディカル・メガバンク機構
教授
清元 秀泰 (kiyomoto,hideyasu)
研究者番号：00304585

(2)分担

香川大学医学部 助教
森脇 久美子 (moriwaki,kumiko)
研究者番号：90398040