

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893155

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症のポドサイト障害マーカーの樹立と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Development and Establishment of therapeutic target molecules as podocyte failure markers in diabetic nephropathy

研究代表者

櫻井 明子 (SAKURAI, Akiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70707900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)は我が国のみならず全世界において重要な病態である。腎症発症・進行の分子レベルでの病態を明らかにし、有効な治療法を開発することは極めて急務である。そのためには、病態の中心となる標的分子の同定が不可欠である。タンパク尿の出現や腎機能低下の直接の原因となる糸球体上皮細胞(ポドサイト)に着目し、新規標的分子CXCR4・CXCR7の腎症での分子病態解析を基に、新たな診断のためのバイオマーカーの樹立と新規分子標的治療の探索を行った。CXCR7は腎臓組織のポドサイトに存在し、尿中に排出されていることが確認できた。腎症発症後、ポドサイトのCXCR7発現量は低下することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is an important condition in the whole world not only in our country. It is very urgent to develop effective therapies based on the molecular mechanisms underlying the onset and progression of CKD, especially regarding diabetic nephropathy (DMN). For this purpose, it is essential to identify the target molecule which plays central role for the pathophysiology. Focusing on the podocytes which induce direct causes of the significant renal function decline and proteinuria, we investigated the molecular basis of the novel target molecules (CXCR4 and CXCR7) in diabetic nephropathy. CXCR7 was expressed in podocytes of kidney glomeruli and was excreted in the urine in diabetic nephropathy. Moreover, the expression levels of CXCR7 was decreased in glomeruli during the course of the progression of nephropathy.

研究分野：病態検査学

キーワード：糖尿病性腎症 ポドサイト バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は我が国のみならず全世界において最も重要な病態である。この主たる原因は糖尿病性腎症であり、年々増加し、我が国では末期腎不全の45%を占める。また、CKDは心血管病変(CVD)の重大な危険因子であり、さらに血管合併症は糖尿病性腎症では高頻度におこる合併症であり、予後は極めて不良である。CKDは進行すると透析導入となり、患者の医療費負担が高騰しQOL(Quality of Life)が低下する。そのため早期の診断と治療開始が重要となる。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の診断は難しく、アルブミン尿は腎症以外のほとんどのCKDで認められるという問題があり、治療の面でも、現行の治療では腎不全や透析になるのを少し遅らせるだけであり、進行する腎症を画的に治療させる治療法はない。本研究ではタンパク尿の出現や腎機能低下の直接の原因となる糸球体上皮細胞(ポドサイト)に着目し、これまでの研究で見出した新規標的分子CXCR4・CXCR7の腎症での分子病態解析を基に、新たな診断のためのバイオマーカーの樹立と新規分子標的治療の探索を行う。

3. 研究の方法

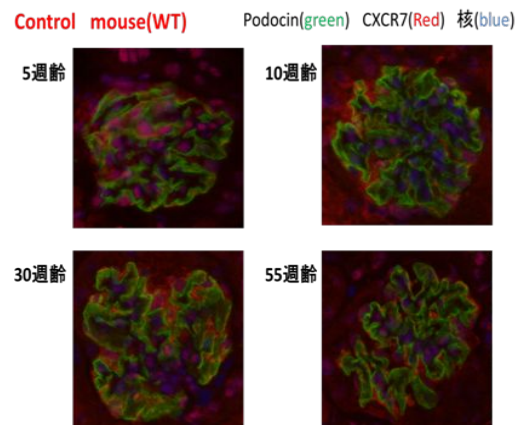
HIV感染者はHIV腎症という特徴的な疾患を発症する。これはHIVが直接、受容体CXCR4を介して、糸球体上皮細胞(ポドサイト)に障害を及ぼし発症することが知られている。また、conditional BMP4 transgenicマウスの解析で、BMP4の活性化がヒト糖尿病性腎症に非常に特徴的な組織変化と大量のタンパク尿を呈し、ポドサイトに障害がみられるとの報告がある。ポドサイトに特異的に存在すると考えられるCXCR4・CXCR7の発現を免疫組織染色で確認する。正常マウス、糖尿病性腎症モデルマウス腎臓組織の免疫組織染色を

実施し発現量の比較検討を行う。週齢の異なる正常マウス腎臓組織の免疫組織染色を行い、加齢とともにポドサイトに発現するCXCR4・CXCR7が変化するか確認する。ヒト腎臓組織でのCXCR4・CXCR7の発現確認は、腎生検を行った患者組織の免疫組織染色で確認する。尿中に排出されているCXCR4・CXCR7の存在をwestern blotを行い解析する。培養ポドサイトを用いてBMP4/Smad1/CXCR4・CXCR7の解析を行う。培養ポドサイトに高濃度グルコース等の刺激を行いCXCR4・CXCR7の機能解析を実施する。CXCR4ノックアウトマウス、CXCR7ノックアウトマウスを作製し解析を行う。

4. 研究成果

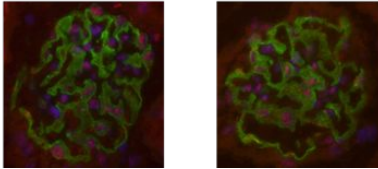
(1)正常マウス腎臓組織・糖尿病性腎症モデルマウス腎臓組織の免疫組織染色

凍結腎臓組織・パラフィン包埋腎臓組織のポドサイト上にCXCR4の発現は確認できなかったが、CXCR7はポドサイト上に特異的に発現していることを確認した。加齢とともにポドサイトのCXCR7発現量が変化するかを生後5週齢、10週齢、35週齢、55週齢の正常マウス腎臓組織を用いて確認した。生後5週齢のマウスではCXCR7の発現量がやや低下していたが、生後10週齢、35週齢、55週齢では特に発現量に変化は見られなかった。糖尿病性腎症モデルマウス腎臓組織のポドサイトCXCR7発現量は正常マウスと比較するとPodocinの発現低下に先行して減少していた。



db/db (2型糖尿病マウス) Podocin(green) CXCR7(Red) 核(blue)

30週齢



(2)腎生検患者腎臓組織の免疫組織染色

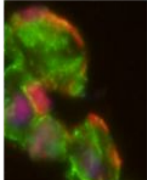
腎生検を実施した微小変化型患者、糖尿病性腎症患者の CXCR7 の発現量を免疫組織染色で確認した。糖尿病性腎症患者のポドサイト CXCR7 発現量は、微小変化型患者に比べ低下しており、Podocin の発現低下に先行して減少していた。

患者腎組織

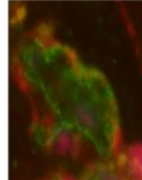
Podocin(green) CXCR7(Red) 核(blue)

微小変化型

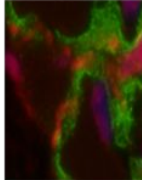
57歳 M



64歳 F

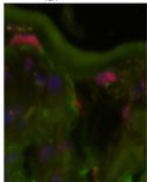


60歳 F

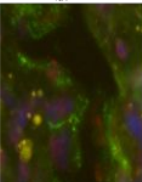


糖尿病性腎症

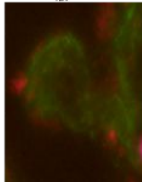
61歳 M



62歳 F



44歳 M



(3)尿中 CXCR4、CXCR7 の Western blot

(2)で使用した腎生検患者の尿中 CXCR4、CXCR7 確認のため Western blot を実施した。蛋白量を統一して Western blot を実施したところ、尿中に排出されているアルブミン、IgG 量が多く目的の CXCR4、CXCR7 が確認できなかった。そこで、尿中アルブミン、IgG を除去し Western blot を実施した。その結果、尿中に CXCR7 が排出されていることを確認した。糖尿病性腎症が進行すると尿中 CXCR7 排出量が減少していた。また、CXCR7 は 2 量体で尿中に存在している可能性を示唆する結果を得た。2 量体を形成しているのが CXCR7/CXCR7、CXCR4/CXCR7 かは解析中である。

(4)培養ポドサイトの高濃度グルコース刺激

培養ポドサイトに正常濃度グルコース、高濃度のグルコース刺激を実施した。刺激後、RNA を回収し RT-PCR を実施した。その結果、正常濃度グルコース、高濃度グルコース刺激で培養ポドサイトの CXCR7 RNA レベルに有意差は確認できなかった。

(5)CXCR7 ノックアウト細胞

マウスの培養ポドサイトにベクター (U6gRNA-Cas9-2A-GFP) を transfection し CXCR7 ノックアウト細胞を作製中である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

櫻井明子、安倍秀斉、長井幸一郎、村上太一、安倍尚子、土井俊夫

糖尿病のポドサイト障害における BMP-CXCR7 シグナル異常の検出法

第 61 回日本臨床検査医学会学術集会

2014 年 11 月 22 日-25 日

福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

櫻井明子、林早苗、富永辰也、藤田結衣、安倍尚子、土井俊夫、安倍秀斉

糖尿病性腎症における miR-21 のポドサイトに対する PDCD4 制御を介した抗アポトーシス効果

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3 日-6 日

神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

[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

櫻井 明子 (SAKURAI, Akiko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：70707900

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：