

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670429

研究課題名(和文)腎臓病患者におけるiPS細胞由来腎系球体上皮細胞の機能解析と病態解明

研究課題名(英文)Functional analysis of glomerular podocytes differentiated from iPS cells established from patients with kidney disease

研究代表者

成田 一衛(NARITA, Ichiei)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20272817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性ネフローゼ症候群患者の末梢血Tリンパ球に対し、初期化遺伝子を導入してiPS細胞を誘導、腎系球体上皮細胞へと分化させ、これを用いたin vitroでの系球体上皮細胞の機能解析を行うことを目的とした。iPS細胞を樹立、系球体上皮細胞への分化誘導に成功し、各々の上皮細胞は、Nephrin, などのマーカー陽性であることが確認された。一方これらのiPS細胞由来腎系球体上皮細胞に対し、成長ホルモンや増殖因子、TGF- などの各種サイトカイン、レニン、アンジオテンシンなどの内因性ホルモン等に対する反応性を免疫染色、RT-PCR法、ウエスタンブロット法などで比較したが、明確な差違は検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish iPS cells from peripheral T-cells of healthy volunteers or patients with hereditary nephrotic syndrome, and to introduce differentiation into glomerular podocyte, and investigate their functions. We succeeded to establish the iPS cells and found that the differentiated cells from these iPSs were positive with nephrin, podocin, synaptopodin, podocalyxin. However, any functional difference was not observed on cells originated from patients with hereditary nephrotic syndrome as compared to those from healthy controls, in respect with the response to renin-angiotensin, inflammatory cytokines, etc. In parallel, we also demonstrated that male-predominant Mups expression and MUPs production and urine excretion were down-regulated, whereas female-predominant genes such as Cyp3a41 and Cyp3a44 expressions were up-regulated by prolactin, and that the regulatory role of prolactin was independent with sex-specific GH secretion pattern or testosterone.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ネフローゼ症候群 iPS細胞 系球体上皮細胞 プロラクチン 性差

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体毛細血管係蹄壁の上皮側は、糸球体上皮細胞の足突起とスリット膜で構成されており、蛋白質などの透過性を制御している。微小変換型ネフローゼ症候群(MCNS)や巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)では、糸球体上皮細胞足突起の融合とスリット膜の消失を認め、多量の蛋白尿を呈する。ネフローゼ症候群に対して、副腎皮質ステロイド剤が使われるが、その効果には個体差がある。同じ病理像を呈しながら、良好な反応性を示す場合と、減量に伴い再発する依存性、治療が奏功しない抵抗性の症例も存在する。そのメカニズムは不明であり、治療前に評価する方法も無い。

一方、私共は心不全モデルラットに 5/6 腎摘出による腎不全を誘発すると、腎尿細管においてプロラクチンが強発現すること、これが蛋白尿を抑制する可能性があることを報告した(Tsutida Y et al. Clin Exp Nephrol 2014)。プロラクチンは下垂体前葉から分泌されるポリペプチドホルモンで乳腺発達や泌乳に関わることがよく知られているが、その他に、免疫に関わる作用や浸透圧調整に関わる作用など多彩な生理機能を持つことが近年明らかとなっている。しかし、腎の機能や炎症における詳細な意義、糸球体への影響等については不明であった。

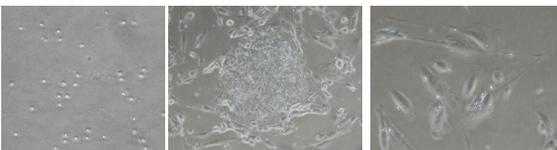
2. 研究の目的

本研究では健常人および遺伝性ネフローゼ症候群患者の末梢血 T リンパ球に初期化遺伝子を導入して iPS 細胞を誘導、その後腎糸球体上皮細胞へと分化させ、これを用いた *in vitro* での糸球体上皮細胞の機能解析を行うことを第 1 の目的とした。またプロラクチンの生体への影響、特に蛋白尿に対する作用を明らかにすることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

健常および遺伝性ネフローゼ症候群患者から末梢血を採取し、T 細胞から iPS 細胞を樹立、さらに糸球体上皮細胞への分化誘導

末梢血単核球(左)に初期化遺伝子を導入し、iPS細胞を樹立(中央)。さらに上皮細胞分化因子を加えて腎糸球体上皮細胞へと分化させた(右)。

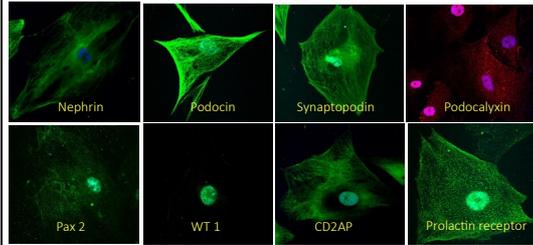


に成功した。

各々の上皮細胞は、Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin 等の上皮細胞マーカー陽性であることが確認された。(右上の図)

これらの細胞の成長ホルモンや増殖因子、TGF- β などの各種サイトカイン、レニン、アンジオテンシンなどの内因性ホルモン等に対する反応性を免疫染色、RT-PCR 法、ウェスタンブロット法などで比較した。

iPS細胞から分化誘導を行った腎糸球体上皮細胞は各種特異マーカー陽性である。



プロラクチンについては、まず、マウスプロラクチンの cDNA を pCAGGS ベクターに組み込み、マウスプロラクチンの発現ベクターを作製した。オス・メスマウス双方に尾静脈よりハイドロダイナミック法によって発現ベクターを投与し、肝細胞へプロラクチン遺伝子を導入することで、プロラクチンを高発現させて、実験的に高プロラクチン血症を誘導した。高プロラクチン血症状態のマウスの肝臓から抽出した全 RNA を用いて、P450 をはじめとする性別優位性のある各遺伝子の発現量の変化をリアルタイム PCR 法で検討した。

4. 研究成果

患者および健常人由来の上皮細胞に明確な差違は検出されなかった。

一方、プロラクチン発現ベクター投与群のマウスにおいて、有意に高い高プロラクチン血症が誘導された。高プロラクチン血症マウスでは肝臓での STAT-5 のリン酸化が亢進した。高プロラクチン血症となったメスマウスの肝臓において、メスマウス優位に発現するとされる P450 遺伝子である *Cyp3a16*、*Cyp3a41*、*Cyp3a44*、*Cyp2b9* の mRNA 発現が有意に増加した。さらに高プロラクチン血症メスマウスにおいて、メスマウス有意の遺伝子である *Prolactin receptor* 遺伝子の発現が上昇した。一方で、高プロラクチン血症オスマウスの肝臓において、オスマウス有意に発現するとされる P450 遺伝子である *Cyp2d9*、*Cyp7b1* の mRNA 発現が有意に低下した。また、高プロラクチン血症オスマウスにおいて、オスマウス有意の遺伝子である *Mup1* の発現が有意に低下した。発現に性別優位性がないとされている *Cyp3a11*、*Cyp3a13*、*Cyp3a25* などの P450 遺伝子の発現は、高プロラクチン血症による変化は認められなかった。高プロラクチン血症のオスマウス・メスマウスのいずれも成長ホルモンやテストステロンの血清値には変化を認めなかった。

心不全モデルラットではプロラクチンが腎保護的に作用している可能性を見出し報告したが、さらに申請者らはプロラクチン過剰発現ラットを作成し、機能として、性差特異的な肝代謝酵素の発現調節に関与していることを明らかにし、報告した(文献 1)。

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 29 件)

1. Sato Y, Kaneko Y, Cho T, Goto K, Otsuka T, Yamamoto S, Goto S, Maruyama H, Narita I. Prolactin up-regulates female-predominant Cyp gene expressions and down-regulates male-predominant gene expressions in mice liver. *Drug Metab Dispos* 2017. in press. (査読有り)
2. Iseki K, Asahi K, Yamagata K, Fujimoto S, Tsuruya K, Narita I, Konta T, Kasahara M, Shibagaki Y, Yoshida H, Moriyama T, Kondo M, Iseki C, Watanabe T, Design of the comprehensive health care system for chronic kidney disease based on the individual risk assessment by Specific Health C. Mortality risk among screened subjects of the specific health check and guidance program in Japan 2008-2012. *Clin Exp Nephrol* 2017. in press (査読有り)
3. De S, Kuwahara S, Hosojima M, Ishikawa T, Kaseda R, Sarkar P, Yoshioka Y, Kabasawa H, Iida T, Goto S, Toba K, Higuchi Y, Suzuki Y, Hara M, Kurosawa H, Narita I, Hirayama Y, Ochiya T, Saito A. Exocytosis-Mediated Urinary Full-Length Megalin Excretion is Linked with the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2017. in press. (査読有り)
4. Hughes DA, Nicholls K, Shankar SP, Sunder-Plassmann G, Koeller D, Nedd K, Vockley G, Hamazaki T, Lachmann R, Ohashi T, Olivotto I, Sakai N, Deegan P, Dimmock D, Eyskens F, Germain DP, Goker-Alpan O, Hachulla E, Jovanovic A, Lourenco CM, Narita I, Thomas M, Wilcox WR, Bichet DG, Schiffmann R, Ludington E, Viereck C, Kirk J, Yu J, Johnson F, Boudes P, Benjamin ER, Lockhart DJ, Barlow C, Skuban N, Castelli JP, Barth J, Feldt-Rasmussen U. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet* 2017; 54: 288-96. (査読有り)
5. Hori Y, Aoki N, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, De S, Kabasawa H, Kaneko R, Aoki H, Tanabe Y, Kagamu H, Narita I, Kikuchi T, Saito A. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2017. in press. (査読有り)
6. Yokoyama H, Narita I, Sugiyama H, Nagata M, Sato H, Ueda Y, Matsuo S. Drug-induced kidney disease: a study of the Japan Renal Biopsy Registry from 2007 to 2015. *Clin Exp Nephrol* 2016; 20: 720-30. (査読有り)
7. Yamazaki M, Fukusumi Y, Kayaba M, Kitazawa Y, Takamura S, Narita I, Kawachi H. Possible role for glomerular-derived angiotensinogen in nephrotic syndrome. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2016; 17. (査読有り)
8. Yamamoto S, Narita I, Kotani K. The macrophage and its related cholesterol efflux as a HDL function index in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2016; 457: 117-22. (査読有り)
9. Watanabe H, Goto S, Mori H, Higashi K, Hosomichi K, Aizawa N, Takahashi N, Tsuchida M, Suzuki Y, Yamada T, Horii A, Inoue I, Kurokawa K, Narita I. Comprehensive microbiome analysis of tonsillar crypts in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2016. in press. (査読有り)
10. Watanabe H, Goto S, Kondo D, Takata T, Yamazaki H, Hosojima M, Yamamoto S, Kaneko Y, Aoyagi R, Narita I. Comparison of methods of steroid administration combined

- with tonsillectomy for IgA nephropathy patients. *Clin Exp Nephrol* 2016. in press. (査読有り)
11. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I. Mortality trends among Japanese dialysis patients, 1988-2013: a joinpoint regression analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 1501-7. (査読有り)
 12. Wakamatsu A, Fukusumi Y, Hasegawa E, Tomita M, Watanabe T, Narita I, Kawachi H. Role of calcineurin (CN) in kidney glomerular podocyte: CN inhibitor ameliorated proteinuria by inhibiting the redistribution of CN at the slit diaphragm. *Physiol Rep* 2016; 4. (査読有り)
 13. Tanno T, Tomita H, Narita I, Kinjo T, Nishizaki K, Ichikawa H, Kimura Y, Tanaka M, Osanai T, Okumura K. Olmesartan Inhibits Cardiac Hypertrophy in Mice Overexpressing Renin Independently of Blood Pressure: Its Beneficial Effects on ACE2/Ang(1-7)/Mas Axis and NADPH Oxidase Expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016; 67: 503-9. (査読有り)
 14. Kuwahara S, Hosojima M, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, Sasagawa T, Kabasawa H, Kaseda R, Yasukawa R, Ishikawa T, Suzuki A, Sato H, Kageyama S, Tanaka T, Kitamura N, Narita I, Komatsu M, Nishiyama A, Saito A. Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 1996-2008. (査読有り)
 15. Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Serum Immunoglobulin G Levels to Porphyromonas gingivalis Peptidylarginine Deiminase Affect Clinical Response to Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drug in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2016; 11: e0154182. (査読有り)
 16. Kaneko Y, Yoshita K, Kono E, Ito Y, Imai N, Yamamoto S, Goto S, Narita I. Extracapillary proliferation and arteriolar hyalinosis are associated with long-term kidney survival in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2016; 20: 569-77. (査読有り)
 17. Hasegawa K, Tsukamoto K, Kunimi M, Asahi K, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Fujimoto S, Narita I, Konta T, Kondo M, Kimura K, Ohashi Y, Watanabe T. Control Status of Atherosclerotic Cardiovascular Risk Factors Among Japanese High-Risk Subjects: Analyses of a Japanese Health Check Database from 2008 to 2011. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23: 991-1003. (査読有り)
 18. Yano Y, Fujimoto S, Kramer H, Sato Y, Konta T, Iseki K, Iseki C, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Narita I, Kondo M, Kimura K, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Long-Term Blood Pressure Variability, New-Onset Diabetes Mellitus, and New-Onset Chronic Kidney Disease in the Japanese General Population. *Hypertension* 2015; 66: 30-6. (査読有り)
 19. Yamamoto S, Kido R, Onishi Y, Fukuma S, Akizawa T, Fukagawa M, Kazama JJ, Narita I, Fukuhara S. Use of renin-angiotensin system inhibitors is associated with reduction of fracture risk in hemodialysis patients. *PLoS One* 2015; 10: e0122691. (査読有り)
 20. Yamamoto S, Zhong J, Yancey PG, Zuo Y, Linton MF, Fazio S, Yang H, Narita I, Kon V. Atherosclerosis following renal injury is ameliorated by pioglitazone and losartan via macrophage phenotype. *Atherosclerosis* 2015; 242: 56-64. (査読有り)

21. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I, Konta T, Fujimoto S, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Asahi K, Kimura K, Kondo M, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Association between hypouricemia and reduced kidney function: a cross-sectional population-based study in Japan. *Am J Nephrol* 2015; 41: 138-46. (査読有り)
22. Tsuruya K, Yoshida H, Nagata M, Kitazono T, Iseki K, Iseki C, Fujimoto S, Konta T, Moriyama T, Yamagata K, Narita I, Kimura K, Kondo M, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Impact of the Triglycerides to High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio on the Incidence and Progression of CKD: A Longitudinal Study in a Large Japanese Population. *Am J Kidney Dis* 2015; 66: 972-83. (査読有り)
23. Tsuchida Y, Iino N, Narita I. Pelvic abscess induced by a dormant peritoneal dialysis catheter without obvious intestinal perforation. *Ther Apher Dial* 2015; 19: 191-2. (査読有り)
24. Takai C, Matsumoto I, Inoue A, Umeda N, Tanaka Y, Kurashima Y, Wada Y, Narita I, Sumida T. Specific overexpression of tumour necrosis factor-alpha-induced protein (TNFAIP)9 in CD14(+) CD16(-) monocytes in patients with rheumatoid arthritis: comparative analysis with TNFAIP3. *Clin Exp Immunol* 2015; 180: 458-66. (査読有り)
25. Saka S, Hirawa N, Oka A, Yatsu K, Hirukawa T, Yamamoto R, Matsusaka T, Imai E, Narita I, Endoh M, Ichikawa I, Umemura S, Inoko H. Genome-wide association study of IgA nephropathy using 23 465 microsatellite markers in a Japanese population. *J Hum Genet* 2015; 60: 573-80. (査読有り)
26. Eino A, Kageyama S, Uemura T, Annoh H, Saito T, Narita I, Waguri S, Komatsu M. Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. *J Cell Sci* 2015; 128: 4453-61. (査読有り)
27. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Fujimoto S, Tsuruya K, Asahi K, Konta T, Kimura K, Kondo M, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Association between combined lifestyle factors and non-restorative sleep in Japan: a cross-sectional study based on a Japanese health database. *PLoS One* 2014; 9: e108718. (査読有り)
28. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney Int* 2014; 86: 649. (査読有り)
29. Tsuchida Y, Kaneko Y, Otsuka T, Goto K, Saito A, Yamamoto K, Yamamoto T, Narita I. Upregulation of prolactin receptor in proximal tubular cells was induced in cardiac dysfunction model mice. *Clin Exp Nephrol* 2014; 18: 65-74. (査読有り)
- [学会発表] (計 7 件)
1. 成田一衛. (教育講演良くわかるシリーズ) ネフローゼ症候群: 食事と生活指導. 第7回日本腎臓リハビリテーション学会. つくば国際会議場 (つくば市) 2017年2月18日
2. Iida T, Hosojima M, Kabasawa K, Nakamura K, Kuwahara S, Ishikawa T, Kaseda R, Suzuki Y, Narita I, Saito A. Two Forms of Urinary Megalin Excretion Are Novel Predictors of the Progression of Early-Stage Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus. American Society of

- Nephrology 2016, Chicago (USA) . Nov 17, 2016
3. Kaseda R, Tsuchida Y, Zhong J, Narita I, Ikizler T, Kon V. Differential Effects of Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) versus ACE Inhibitor (ACEI) on HDL Functionality in Patients on Maintenance Hemodialysis (MHD). American Society of Nephrology 2016, Chicago (USA) . Nov 18, 2016
 4. Wakamatsu T, Iwasaki Y, Yamamoto S, Ito A, Takahashi Y, Gejyo F, Kazaa J, Fukagawa M, Narita I. Renin-Angiotensin System Inhibition Ameliorates Bone Fragility Through Blocking Both Osteocytic and Osteoblastic Actions in Uremic Rats. American Society of Nephrology 2016, Chicago (USA) . Nov 19, 2016.
 5. 後藤 眞、渡辺 博文、土田 雅史、井ノ上逸朗、黒川 颯、成田 一衛 : (シンポジウム) IgA 腎症の口蓋扁桃陰窩のマイクロバイオーム解析. 第 59 回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜 (横浜市) 2016 年 6 月 17 日.
 6. 高村 紗由里、福住 好恭、張 瑩、成田 一衛、河内 裕 : ネフローゼ症候群モデルにおける細胞極性因子 Par3 の発現動態の解析. 第 59 回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜 (横浜市) 2016 年 6 月 17 日.
 7. 俵田 亮平、細島 康宏、土田 陽平、斎藤 亮彦、Kon Valentina、成田 一衛 : レニン-アンジオテンシン系(RAS)阻害薬の血液透析患者(HD)HDL への効果. 第 61 回日本透析医学会学術集会・総会, 大阪国際会議場 (大阪市) 2016 年 6 月 12 日.

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 一衛 (NARITA, Ichiei)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号 : 20272817

(2) 研究分担者

後藤 眞 (GOTO, Shin)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号 : 00463969

金子 佳賢 (KANEKO, Yoshikatsu)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号 : 80444157

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

佐藤 勇也 (SATO, Yuya)