

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		ICHIKAWA IEKUNI					
①研究代表者氏名		市川 家國		②所属研究機関・部局・職		東海大学・医学部・教授	
③研究課題名	和文	糸球体硬化症					
	英文	Glomerular sclerosis					
④研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		17,000	16,100	16,500	16,500	16,500	82,600
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
市川 家國	東海大学・医学部・教授		腎臓病学、 小児科学	研究総括、データ解析、国内外の研究者との交流			
松阪 泰二	東海大学・総合医学研究所・ 助教授		腎臓病学、 内科学	トランスジェニックマウスの作製・交配・維持・解析			
新村 文男	東海大学・医学部・講師		腎臓病学、 小児科学	podocyte、尿細管特異的ノックアウトマウスの作製・解析			
長田 道夫	筑波大学・基礎医学系・教授		腎臓病理学	P21ノックアウトマウスにおけるpodocyte傷害			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
目的 1. podocyte の数を増やす							
1-1. CDK inhibitor p21 欠損下の podocyte の増殖の有無を調べる。							
1-2. SV40 T 抗原を podocyte に誘導可能なマウスを作製する。							
1-3. BMP4 を podocyte に過剰発現させる。							
目的 2. Podocyte 傷害に誘発される内皮細胞傷害の防止							
2-1. recombinant VEGF による治療効果を調べる。							
2-2. VEGF の過剰発現を podocyte に誘導可能なマウスを作製する。							
目的 3. 蛋白質再吸収阻止による尿細管病変の治療							
3-1. recombinant RAP による治療効果を調べる。							
3-2. Megalin 欠損による尿細管病変の変化を調べる。							
目的 4. 蛋白質再吸収阻止による podocyte 病変の治療							
4-1. megalin ノックアウトマウスの解析							
4-2. recombinant RAP の効果							
4-3. podocyte における Megalin 欠損による病変の変化を調べる。							
目的 5. Angiotensin II 阻害による腎保護効果の機序							
5-1. podocyte 特異的 AT1 欠損マウスを作製、解析する。							
5-2. 尿細管特異的 AT1 欠損マウスを作製、解析する。							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

目的 1. podocyte の数を増やす

- 1-1. p21K0 マウスを輸入して、コロニーを確立し、抗糸球体基底膜抗体を投与して腎炎を作製した。糸球体内に上皮細胞の増殖を認めた。これらの細胞の起源を同定するために、ROSA26loxP マウスと Nephron-Cre マウスを交配中である。
- 1-2. Podocin-tTA マウスを6系統、TRE-SV40T を4系統樹立し、また樹立済みの podocin-rtTA マウスを入手した。1つの組み合わせの podocin-tTA/TRE-SV40T と、ドキシサイクリン (DOX) を投与した podocin-rtTA/TRE-SV40T マウスにおいて、podocyte の一部に SV40T が発現した。後者の方が、強い発現が得られたので、以後の解析はそちらを用いる事にした。SV40T を発現する podocyte は、明らかな核と細胞質の分裂を示したにも関わらず、podocyte 特異的分子の発現は保持し、また少なくとも短期的には傷害は認められなかった。しかしながら、6週間 DOX を投与すると、糸球体硬化が起こった。すなわち、正常な podocyte の分化状態を保ったまま podocyte の数を増加させる事に成功したのである。
- 1-3. Nephron-BMP4 マウスを作製した。出生時の糸球体は、内皮細胞とメサンジウム細胞に乏しく、正常な毛細血管系蹄が形成されなかったが、podocyte の数は正常と変わらなかった。したがって、BMP4 の厳密な発現コントロールは、正常な糸球体系蹄の形成には必須であるが、podocyte の数には影響を与えない事がわかった。

目的 2. Podocyte 傷害に誘発される内皮細胞傷害の防止

- 2-1. NEP25 マウスに podocyte 傷害を誘導後、リコンビナント VEGF を投与したが、トキシン投与早期に認められる内皮マーカー Flk-1 の発現低下は軽減されなかった。
- 2-2. TRE-VEGF マウスを作製し、podocin-rtTA マウスと交配中である。

目的 3. 蛋白質再吸収阻止による尿細管病変の治療

- 3-1. RAP (receptor associate protein) 発現大腸菌を確立したが、*in vivo* 実験に使用可能な量の精製の前に、次項の実験を先行させる事にした。
- 3-2. Megalin-loxP マウスと ApoE-Cre マウスを入手して、コロニーを樹立した。免疫染色により、尿細管特異的 megalin KO マウスでは、近位尿細管の約 40% に megalin が欠損していた。これらは NEP25 マウスと交配中である。

目的 4. 蛋白質再吸収阻止による podocyte 病変の治療

- 4-1. Megalin KO マウスの腎臓の電顕ブロックを入手し、超薄切片を作製し解析した。megalin KO の podocyte は、clathrin coated pit が少ない傾向があった。
- 4-2. 3-1 と同様、次項の実験を先行させる事にした。
- 4-3. NEP25, Nephron-Cre, Megalin-loxP マウスを交配中である。

目的 5. Angiotensin II 阻害による腎保護効果の機序

- 5-1. AT1A-loxP マウスと Nephron-Cre マウスを交配し、podocyte 特異的 AT1 欠損マウスを作製した。単離糸球体の angiotensin II による podocyte 内 Ca の上昇が認められなかった。これらのマウスは、正常な血圧、尿蛋白を示した。NEP25 マウスに交配して、podocyte 傷害を誘導した。podocyte の AT1 の欠損による podocyte 保護効果は認められなかった。
- 5-2. AT1A-loxP と KAP-Cre を交配して、尿細管特異的 AT1 欠損マウスを作製した。基礎状態あるいは塩分制限下での血圧や塩分保持能力に、正常マウスとの差は認められなかった。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

現在日本人の 600 人に一人が慢性腎不全患者で、血液透析療法等を必要とする。血液透析療法には、年間一人あたり 500 万円が必要である。国民健康の点から、また医療経済の点からも、慢性腎不全の防止は、早急に解決されなければならない問題である。我々は、数年前から、腎不全の進行における podocyte に関して注目し、podocyte の傷害は、急速に糸球体硬化症および慢性腎不全を引き起こす事を明らかにしてきた。

本計画において、我々はいくつかのアプローチで、podocyte 傷害に由来する腎不全の治療方法の開発をめざし、そのために、多くのマウスのモデルを確立した。最も特筆すべきモデルは podocyte の数を増やす事のできるマウスである。

Podocyte は、生後に増殖することではなく、一度失われると後から補充される事はないので、その欠失は、腎臓の傷害を不可逆に行っている主要な要因と考えられる。したがって、究極の腎不全の治療方法は、podocyte の数を増やす事であると考えられる。一方、例外的に podocyte が増殖する事が報告されているが、これらいずれの場合においても、podocyte は脱分化し、激しい糸球体傷害を示す。すなわち、podocyte の増殖と脱分化は不可分であるという可能性がある。そうであるならば、podocyte を増やそうとすれば、podocyte の脱分化が起こり、激しい糸球体傷害を起こして、治療方法としては成り立たない。

本研究の主要な目的の一つは、podocyte の数を増やすという夢の治療方法が成立するかどうかを検討する事にある。我々は、SV40 T 抗原の発現を、*in vivo* の podocyte で誘導する事のできるマウスの作製に苦心の上成功した。SV40 T は、p53 と Rb と結合し、それらの機能を阻害する事により、細胞周期を回転させる。期待通り、SV40 T 抗原の発現誘導後に、podocyte は Ki67 と PCNA を発現し、Bromodeoxyuridine を取り込み、明らかな増殖を示した。増殖 podocyte では、cyclin dependent kinase inhibitor p57 の発現が抑制されていた。また、従来 FGF2 の反復投与等の研究から、条件によっては podocyte の核は分裂するものの、細胞質はけっして分裂せず、結果として多核の podocyte が生じると報告されてきた。Podocin-rtTA/TRE-SV40 T マウスを DOX 投与中に解析すると、多くの増殖 podocyte は多核であったが、DOX 投与して、その後に中止して 1 週間後に解析すると、単核の増殖 podocyte が確認された。すなわち、podocyte の細胞質も分裂を示したのである。さらに、増殖 podocyte は、正常と変わらない WT-1、synaptopodin を発現し、現在調べる限りでは正常の分化状態を保っている。

生後に正常な分化状態の podocyte が増殖したのは他に報告がなく、史上初の発見である。これは、podocyte の数を増やすことにより慢性腎不全を治療するという夢の治療法の第一歩である。我々のモデルの解析により、この夢の治療法が可能かどうかを探る事が可能である。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

計画された研究のほとんどは複数のトランスジェニックマウスの作製と交配を必要とし、過去2年間に、多くは論文発表の段階には至っていないが、執筆の日へと着実な前進を続けている。

(1) 学会誌等

1. Miyazaki Y, Ueda H, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T. Inhibition of endogenous BMP in the glomerulus leads to mesangial matrix expansion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2): 681-688.
2. Ueda H, Miyazaki Y, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T. A role of BMP in the development of glomerular sclerosis. *Nephrology (Carlton).* 2005;10 Supple6:A444.
3. Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(3): 205-210.
- ④ Matsusaka T, Xin J, Niwa S, Kobayashi K, Akatsuka A, Hashizume H, Wang QC, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(4): 1013-1023.
- ⑤ Asano T, Niimura F, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I, Matsusaka T. Permanent genetic tagging of podocytes: fate of injured podocytes in a mouse model of glomerular sclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(8): 2257-2262.
- ⑥ Zhong J, Zuo Y, Ma J, Fogo AB, Jolicoeur P, Ichikawa I, Matsusaka T. Expression of HIV-1 genes in podocytes alone can lead to the full spectrum of HIV-1-associated nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 68(3): 1048-1060.

(2) 学会における発表等

1. Matsusaka T, Fogo A, Ichikawa I. Dual Effect of an α -Actinin-4 Gene Mutation on Podocyte Injury. American Society of Nephrology Renal Week 2005 Annual Meeting. November 10-13, 2005.
2. Matsusaka T, Fogo A, Pastan I, Ichikawa I. Interruption of Glomerular Filtration Interrupts the Pathogenic Pathway from Podocyte Injury to Glomerular Sclerosis. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 – November 1, 2004.
3. Asano T, Matsusaka T, Fogo A, Ichikawa I. Identity of the Origin of Proliferating Visceral Epithelial Cells. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 – November 1, 2004.
4. Ueda H, Miyazaki Y, Asano T, Matsusaka T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Ichikawa I. The Role of BMP4 in Glomerulogenesis and Nephrogenesis. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 – November 1, 2004.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

5. Ichikawa I. Analysis of Podocyte Injury Using Genetically Altered Mice. American Society of Nephrology Renal Week 2004 Annual Meeting. October 29 – November 1, 2004.
6. 市川家國. 糸球体病変が進行性に転じる際の上皮障害の役割. 第35回日本腎臓学会東部学術集会. 新潟. 2005年10月7-8日.