

第37回腎臓セミナー・Nexus Japan

プログラム抄録集

日 時：平成27年8月29日（土曜日）

会 場：東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

主 催：一般社団法人日本腎臓学会

腎臓セミナー企画小委員会 委員長 岡田 浩一

第37回当番幹事：一般社団法人日本腎臓学会 理事長 松尾 清一

※腎臓セミナーに参加することにより、腎臓専門医資格更新のための単位
(5単位)が取得できます。

第 37 回 腎臓セミナーNexus Japan プログラム

第 1 部

13:00

Opening remarks 第 37 回当番幹事 日本腎臓学会 理事長 松尾 清一

13:05

YIA 授賞式

13:10

YIA 受賞講演 (各発表 13 分、質疑応答 2 分)

司会：岡田 浩一 (埼玉医科大学腎臓内科)

YIA受賞講演 1

「**Polycystin-1** の糖鎖と細胞内局在の異常が **AQP11** ノックアウトマウスの**嚢胞腎**形成を引き起こす」

井上 佑一 (東京医科歯科大学腎臓内科・東京共済病院)

13:25

YIA受賞講演 2

「**Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters**」

菊池 絵梨子 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科腎臓内科学)

13:40

YIA受賞講演 3

「**Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II –With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus**」

銭谷 慕子 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科腎臓内科学)

13:55

大島賞受賞講演 (各発表 26 分、質疑応答 4 分)

司会：岡田 浩一 (埼玉医科大学腎臓内科)

大島賞受賞講演 1

「**腎臓におけるミネラルコルチコイド受容体の制御機構の解明**」

柴田 茂 (帝京大学医学部内科学講座腎臓内科)

14:25

大島賞受賞講演 2

「**CKD 全ステージにおける CKD-MBD——基礎研究と臨床研究の融合**」

濱野 高行 (大阪大学大学院医学系研究科腎疾患統合医療学)

14:55
Coffee Break

第 2 部

15:05
特別講演

司会：柏原 直樹（川崎医科大学腎臓・高血圧内科学）

「日本の科学研究における国際競争力の動向」

伊神 正貫（文部科学省科学技術・学術政策研究所 科学技術・学術基盤調査研究室長）

15:50

シンポジウム

「疾患モデル動物—病態解明と創薬研究における有用性と限界を知る—」

（各発表 30 分、質疑応答 5 分）

司会：内田 信一（東京医科歯科大学腎臓内科学）
柳田 素子（京都大学大学院医学研究科腎臓内科学）

シンポジウム-1

「IgA 腎症」

鈴木 仁（順天堂大学大学院医学研究科腎臓内科）

16:25 シンポジウム-2

「PKD」

西尾 妙織（北海道大学病院内科Ⅱ）

17:00

シンポジウム-3

「糖尿病 eNOS 欠損マウスにおけるポドサイト障害の機序；ポドサイトにおけるエネルギー代謝と NO の関与」

仲川 孝彦（京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター TMK プロジェクト）

17:35

Closing remarks 第 38 回当番幹事 東京女子医科大学 新田 孝作

抄 録

第 1 部

YIA 受賞講演 1 P4

YIA 受賞講演 2 P5

YIA 受賞講演 3 P6

大島賞受賞講演 1 P7

大島賞受賞講演 2 P8

YIA 受賞講演 1

Polycystin-1 の糖鎖と細胞内局在の異常が AQP11 ノックアウトマウスの嚢胞腎形成を引き起こす

東京医科歯科大学腎臓内科・東京共済病院
井上佑一

常染色体優性多発性嚢胞腎の原因遺伝子としては、Polycystin-1(PC-1)をコードする PKD1 と、Polycystin-2 (PC-2)をコードする PKD2 が知られているが、その病態メカニズムについては未だ不明な点が多い。

AQP11 は、水透過性を有する膜チャネル蛋白であり、AQP11 ノックアウトマウス (AQP11KO) 腎臓は多発性嚢胞腎を呈するが、AQP11 の局在や機能、そして、AQP11KO における嚢胞腎形成メカニズムは不明であった。

今回 3×HA tag が付いた AQP11 を発現する AQP11BAC トランスジェニックマウスを作成し AQP11 が近位尿細管細胞の小胞体に存在する事を明らかにした。

次に、AQP11KO 腎臓における嚢胞腎形成の分子機序を明らかにするため、AQP11 欠損による小胞体の機能異常が、Polycystin など既知の嚢胞腎原因遺伝子産物の品質管理や細胞膜への輸送に影響を与えている可能性を検討した。AQP11KO 腎臓において、PC-1 のイムノブロット上の分子量が AQP11KO では野生型マウスよりも大きく、その分子量の違いが PNGase の脱糖鎖反応によって消失する事から、PC-1 の糖鎖異常が起きている事が明らかになった。また、AQP11KO 腎臓では、すべての PC-1 が EndoH 感受性を示した事から、PC-1 の小胞体からゴルジ体への輸送障害が示唆された。事実、AQP11KO 腎臓では PC-1 の細胞形質膜分画での発現は減少していた。これらの結果から、PC-1 の細胞形質膜発現低下による PC-1 の機能低下が AQP11KO の嚢胞腎の原因と考えられ、実際に Pkd1(+/-)AQP11KO では、Pkd1(+/+)AQP11KO と比較して嚢胞腎形成が悪化した。

このように、AQP11KO における嚢胞腎形成は、糖鎖の異常と細胞膜輸送の異常によって引き起こされた PC-1 の機能低下がその主要な原因であった。近位尿細管小胞体の機能異常が嚢胞腎形成と密接に関わるという新たなエビデンスは、今後の嚢胞腎の病態解明と治療薬開発に貢献する可能性がある。

YIA 受賞講演 2

Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters

J Am Soc Nephrol. 2015 Jul; 26(7):1525-36

- 1 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 腎臓内科学
- 2 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 薬力学分野
- 3 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 医療機能分子開発室
(旧ケミカルバイオロジースクリーニングセンター)
- 4 慶應義塾大学 薬学部 分析科学講座

菊池絵梨子¹, 森 崇寧¹, 銭谷 慕子¹, 磯部 清志¹, 湯浅 磨里³,
藤井 晋也², 影近 弘之², 石原 知明⁴, 水島 徹⁴, 佐々木 成¹,
蘇原 映誠¹, 頼 建光¹, 内田 信一¹

我々は、過去に遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症Ⅱ型の研究を通じて、WNK (with-no-lysine kinases) から OSR1 (oxidative stress-responsive 1)、SPAK (STE20/SPS1-related proline/alanine-rich protein kinase)、さらに下流の Na-Cl 共輸送体 (NCC) や Na/K/Cl cotransporter (NKCC1、2) へ続くシグナルカスケードが尿細管での塩分再吸収を制御し、塩分感受性高血圧をもたらすことを明らかとした。更にこのカスケードは血管平滑筋のトーン調整を介しても血圧調節に深く関与している。従って、このシグナルを阻害する薬剤は、利尿作用と血管拡張作用の二つを併せ持つ新しいタイプの降圧剤となり、また、インスリンがこの系を活性化することから、高インスリン血症を来すメタボリック症候群における降圧に効果的と期待される。我々は、この系の阻害に関して、SPAK ノックアウトマウスが低血圧を呈する事から、SPAK キナーゼに着目し阻害薬の探索を行った。

ELISA を用いたスクリーニング系を新たに確立し、当学所有の化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した結果、一つの化合物がヒットした。また既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングでは、駆虫薬として知られる Closantel が高い SPAK キナーゼ阻害効果を有することを発見した。これらの 2 つの化合物は結果的に高い構造類似性を有し、分子間相互解析の結果、SPAK に直接結合し、更にその阻害様式は ATP と競合しないことが判明した。既存のキナーゼ阻害薬の多くが ATP 競合性であり、特異性の面で難がある事を考えると、今回発見した化合物が ATP 非競合性にキナーゼを阻害することは大きな利点である。更にこれらの化合物は SPAK キナーゼによる NCC、NKCC1 のリン酸化をマウス培養細胞やマウス腎臓、血管レベルでも抑制し、急速投与では実際の降圧効果も確認された。

高血圧患者は年々増加し、その制御は臓器障害の進展阻止に重要である。新たな作用機序の降圧薬は、単なる降圧効果以上の臓器保護作用を持つ可能性がある。さらなる構造解析や構造活性相関の評価が必要ではあるが、SPAK キナーゼを *in vivo* で効果的に阻害する化合物を発見できた事は、今後に向けて重要な研究成果であると考えている。

Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II–With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus

東京医科歯科大学医歯学総合研究科 腎臓内科学

銭谷 慕子

偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) の原因遺伝子である WNK4 は、腎臓の SPAK-NCC リン酸化シグナルを活性化し、Na の再吸収を促進する。また PHAII の原因遺伝子として近年新たに同定された KLHL3 は、Cullin3 と複合体を形成し、E3 リガーゼとして WNK family の分解を促進する。さらに、類似蛋白の KLHL2 も WNK の分解を促進する。

Angiotensin II (AngII) は血管平滑筋を収縮させ、血圧を上昇させる。また、血管平滑筋の Na/K/Cl cotransporter isoform 1 (NKCC1) による細胞内 Cl 濃度の調節は血管平滑筋収縮に関与する。これまでに我々は、塩分摂取および AngII が血管平滑筋の WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルを制御し血管を収縮させることを解明した (Hypertension 2013 Zeniya et al)。しかし、AngII が WNK3 を制御する機序は依然不明であったため、今回その制御機構の解明を KLLH 蛋白の関与を想定して試みた。

マウス大動脈と血管平滑筋細胞には KLHL3 の発現はなく KLHL2 のみが発現していた。さらにマウスへの塩分負荷および AngII 投与、血管平滑筋細胞への AngII 投与により、分単位の早い KLHL2 の減少と WNK3 の増加を認めた。また KLHL2 の knockdown および強制発現実験により、KLHL2 が WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルを制御していることが明らかになった。さらに、種々の分解阻害薬投与や knockdown 実験を行い、AngII による KLHL2 減少の機序は p62 による選択的 autophagy が関与している事を示した。

以上により、マウス血管平滑筋において、AngII が選択的 autophagy を介し KLHL2 の発現量を低下させることで WNK3 の分解を抑制し、WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルを亢進させ血管を収縮させる機序を解明した。Autophagy を介した KLHL2-WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルの解明は、新たな血圧調節の分子機構の発見であり、新規降圧薬開発のターゲットとなりうる。

大島賞受賞講演 1

腎臓におけるミネラルコルチコイド受容体の制御機構の解明

帝京大学医学部内科学講座 腎臓内科

柴田 茂

腎臓における食塩再吸収機構は血圧の調節に中心的な役割を果たしているが、なかでもアルドステロン—鉱質コルチコイド受容体 (MR) 系による体液調節は強力であり、高血圧や食塩による腎障害の病態形成にも深く関与している (Shibata et al. *Hypertension* 2007, Shibata et al. *Mol Cell Endocrinol* 2012)。アルドステロン—MR 系の異常としてアルドステロンの分泌過剰については広く認知されているものの、受容体レベルでの活性異常の意義については未解明の部分が多い。我々はアルドステロン非依存性の MR 調節機構に着目して検討を行い、低分子量 G 蛋白質 Rac1 との相互作用により MR の転写活性が促進的に制御されることを見出した。*in vivo* の検討においても、アルドステロンレベルの上昇がなくとも Rac1 の活性化によって病的な MR シグナルの亢進が認められた (Shibata et al. *Nat Med* 2008)。興味深いことに食塩感受性高血圧の一群では、食塩の摂取により適切にアルドステロンが抑制されるにもかかわらず、MR が Rac1 を介して *paradoxical* に活性化されることで、血圧上昇や腎障害が惹起される可能性が明らかとなった (Shibata et al. *J Clin Invest* 2011)。

我々はまた翻訳後修飾による腎臓内 RAA 系のシグナル伝達機構についても詳細な解析を行い、MR とアルドステロンの結合を阻害する、MR リガンド結合領域上のリン酸化サイトを同定した (Shibata et al. *Cell Metab* 2013)。このサイトのリン酸化は腎臓の間在細胞に特異的に認められ、アンジオテンシン II と高カリウム血症により拮抗的に制御されており、状況依存的な MR の作用発現に関与しているものと考えられた。

以上のように、リガンドであるアルドステロンに加えて様々なメカニズムが MR シグナル活性を修飾しており、これらの異常も MR に関連した高血圧や腎機能障害の誘因になるものと考えられる。

大島賞受賞講演 2

CKD 全ステージにおけるCKD-MBD……基礎研究と臨床研究の融合

大阪大学大学院医学系研究科腎疾患統合医療学
濱野 高行

我々は質量分析を用いて、アデニン腎症モデルで血管石灰化が観察される以前に、カルシウムとリンと fetuin-A が結合したミセルコロイド様の fetuin mineral complex (FMC) が循環血清中に現れ、alendronate 投与によって血管石灰化発現を抑制すると FMC が形成されないことを見出した。このことは FMC が石灰化ストレスマーカーとして利用できることを示唆する。また世界で初めてヒト CKD 患者で FMC が存在することを証明し、CKD の進行とともに FMC の total fetuin-A に占める割合が増えること、透析患者において副甲状腺摘除術や cinacalcet 投与がわずか 1 ヶ月で FMC を低下させることから、これらの治療が血管石灰化進展を抑制することを予測した。我々の予測は 1 年後、大規模 RCT で証明された。

蛋白尿 2+以上で 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) が尿中に失われ、血中レベルが低くなる。25(OH)D は近位尿細管における 1α 水酸化酵素の基質であるため、結果的に蛋白尿が多いと $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は低くなる。また腎不全が進行しても線維芽細胞増殖因子 (FGF) 23 が上昇することで 1α 水酸化酵素活性が下がり、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は低くなる。一方で活性型ビタミン D は直接的に nephrin 発現を上昇させるなどの機序を介し蛋白尿を減じる。つまり CKD において蛋白尿と vitamin D は密接に関与し、活性型 vitamin D の間質線維化抑制作用を考えると、vicious cycle を形成していると言える。

活性型 vitamin D の podocyte 保護効果は podocyte EMT(epithelial-mesenchymal transition)の抑制である。この EMT 抑制は他の上皮細胞でも再現でき、この現象は転写因子 *Snail* の抑制が本質である。癌転移や癌細胞の stem cell 様の形質獲得には *Snail* が関わっていることが知られている。そこで我々は、癌発生率の高い腎移植患者において vitamin D 投与と癌発生の関与を調べた。その結果 vitamin D を投与された患者では癌の発生が有意に少なかった。

保存期コホートだけでなく移植後コホートにおいても $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は腎予後を予測せず、悪い腎予後を有意に予測したのは低い 25(OH)D と高い FGF23 であった。また、 1α 水酸化酵素を KO した一側尿管結紮モデルマウスにおいて 25(OH)D 過量投与は腎線維化をむしろ悪化させていた。FGF23 が腎外 1α 水酸化酵素を抑制することを勘案すると腎保護効果を in vivo で有するのは systemic な $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ではなく、local な $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ であることが示唆される。

第 2 部

特別講演 P10

シンポジウム-1 P11

シンポジウム-2 P12

シンポジウム-3 P13

特別講演

日本の科学研究における国際競争力の動向

文部科学省科学技術・学術政策研究所 科学技術・学術基盤調査研究室長
伊神 正貫

2015年度は、第4期科学技術基本計画(2011～2015年度の5年間)の最終年度であり、現在、第5期科学技術基本計画の策定に向けた議論が進められています。過去、第1～4期の20年にわたる科学技術基本計画の期間中に、日本の科学研究の状況や世界における相対的な位置付けは、どのように変化してきたのでしょうか。

本講演では、科学技術・学術政策研究所(NISTEP)から公表された2つの最新のレポート(科学技術指標2015、科学研究のベンチマーキング2015)に基づき、研究開発費や研究者数、論文分析からみえる科学研究の状況の国際比較及び長期的な変化について紹介します。

科学研究のベンチマーキングでは、研究活動結果の公表媒体である学術論文(以下、論文)に着目し、我が国の科学研究のベンチマーキングを行っています。個別指標(論文数、Top10%補正論文数、被引用数)と、複合指標(論文数に対するTop10%補正論文数の占める割合)により、日本の状況を分野ごとに、主要国との比較を実施しました。また、日本については、部門別・組織区分別での分析を加え、日本内部の論文産出構造の時系列変化を明らかにしました。

分析の結果、①日本全体の論文数が伸び悩みの状態であること、②日本国内でみると企業の論文数が低下し、論文に関する大学の役割が拡大しているが、国立大学の論文数は伸び悩んでいること、③研究の国際化に伴い世界で国際共著論文が急増しているが、日本はこの変化に充分対応出来ていないという問題点が浮かび上がってきています。

本講演では、論文データ分析により国際的に注目を集めている研究領域を定量的に抽出し、それらの関係を可視化したサイエンスマップから明らかになった日本の研究の特徴、日本や米国の研究者に対する調査から明らかになった、臨床医学研究における日米の研究チームの構成の違いなどについてもご紹介する予定です。

シンポジウム-1

IgA 腎症

順天堂大学大学院医学研究科腎臓内科

鈴木 仁

IgA 腎症は多因子疾患ゆえに、その病態は非常に複雑であり、遺伝・免疫系・腎臓における異常が複雑に絡み合い成り立っていることが想定される。Berger らによる IgA 腎症の報告から 47 年余り経過し、数多くの臨床研究と基礎的研究により、IgA 腎症の病態が明らかに解明されつつある。しかし、抗原の多様性や IgA の免疫ネットワークの複雑さなどから、その解明は容易ではない。これらの複雑性を読み解くには、臨床研究では限界があり、適切な動物モデルが必要不可欠である。IgA 分子構造の違いなど、現実的にヒトの IgA 腎症モデルとして完璧に条件を満たす動物モデルは存在しないが、我々は、そのなかでも有用性の高い自然発症モデルである ddY マウスに着目した。しかし、outbred ゆえの表現型のバラツキが問題であったが、経時的に腎生検を施行することで、早期発症群（20 週齢以前発症：30%）、晩期発症群（20～40 週齢：30%）、さらに未発症群（60 週でも発症しない：40%）に分類されることが明らかとなった。この 3 群モデルを活用して、遺伝因子、Toll-like receptor をはじめとする粘膜免疫系の応答異常、IgA 免疫系の異常などを解明してきた。さらに近年我々は、早期発症群を選択交配することで、早期発症モデルとして grouped-ddY マウスを確立した。IgA 腎症の病因は、粘膜、骨髄、腎臓それぞれの異常が複雑に絡みあい成り立っていることが考えられるが、マウス IgA はヒト IgA1 分子と構造が異なること、マウス IgA 腎症では血尿がみられないなど相違点はあるものの、種々の共通点を明確にし工夫することで、IgA 腎症の病態解明、さらには治療法を開発するうえで強力なツールになるとと思われる。

シンポジウム-2

PKD

北海道大学病院内科 II

西尾妙織

多発性嚢胞腎は遺伝性腎疾患で最も多く、常染色体優性伝性 (Autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD) と常染色体劣性遺伝性 (Autosomal recessive polycystic kidney disease; ARPKD) とに大別される。多発性嚢胞腎の疾患モデル動物は 1990 年代後半から自然発症モデル、コンベンショナルノックアウトマウスが報告された。しかし、自然発症モデルは原因遺伝子がヒトの原因遺伝子と異なっていること、コンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であることなどから ADPKD の真のモデル動物とは異なっていた。2000 年に入り、コンディショナルノックアウトマウスが報告されるようになって以降、嚢胞形成メカニズムの解析が急速にすすみ、cilia の関与、MAPK 経路、mTOR 経路、cAMP の経路など様々な経路が明らかにされ、これらの動物に薬物投与を行った成果が報告されるようになった。2014 年に世界に先駆けてわが国でバソプレシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンが ADPKD 患者の進行を抑制する薬剤として承認された。PKD に対するバソプレシン V2 受容体拮抗薬の効果は 1999 年に cpk マウスで証明され、その後 PCK ラット (ARPKD モデル)、pkd2^{ws25/-}マウス (ADPKD モデル)、pcy マウス (ネフロン癆モデル) で更に効果が証明され、臨床試験を経て最初の報告から 15 年後にようやく承認に至っている。一方 mTOR 阻害薬は Cy ラット (ネフロン癆モデル)、PKD1 コンディショナルノックアウトマウス (ADPKD モデル) などで有効であるとされたが、臨床試験の結果ヒトでの有効性が示されず承認に至っていない。この様にモデル動物で有効であってもヒトでの有効性を示すのは容易ではない。

今回、PKD モデルマウスと現在解明されている嚢胞形成メカニズム、今後の展望について述べたい。

シンポジウム-3

糖尿病 eNOS 欠損マウスにおけるポドサイト障害の機序； ポドサイトにおけるエネルギー代謝と NO の関与

京都大学大学院医学研究科

メディカルイノベーションセンターTMK プロジェクト

仲川孝彦

糖尿病性腎症の発症進展に関与する因子の一つに内皮細胞障害がある。我々はこれまで内皮細胞障害マウスである eNOS 欠損マウスに糖尿病を発症させたモデルを解析して、糖尿病性腎症における内皮細胞 NO の役割を検討し報告してきた。野生型糖尿病マウスに比し、糖尿病を発症させた eNOS 欠損マウスは著明な腎障害を呈し、その糸球体ではヒト糖尿病性腎症に特徴的とされるメザンギウム融解や結節性病変が形成される。したがって、内皮細胞障害の存在が糖尿病性糸球体病変形成に強く関与していると考えられる。興味深いのは、病変の進行に平行してポドサイト障害も認められることである。つまり、糖尿病状態の糸球体では、内皮細胞障害が存在するとポドサイトも障害されるということであろう。では、そこにどのような機序が存在するのだろうか？我々は、培養ポドサイトや eNOS 欠損マウスを用いて、内皮細胞由来の NO がポドサイトの形態に与える影響についてポドサイトでのエネルギー代謝に注目した。今回は、ポドサイトにおける解糖系やミトコンドリアの役割と、それらに対する NO の影響について議論したい。

