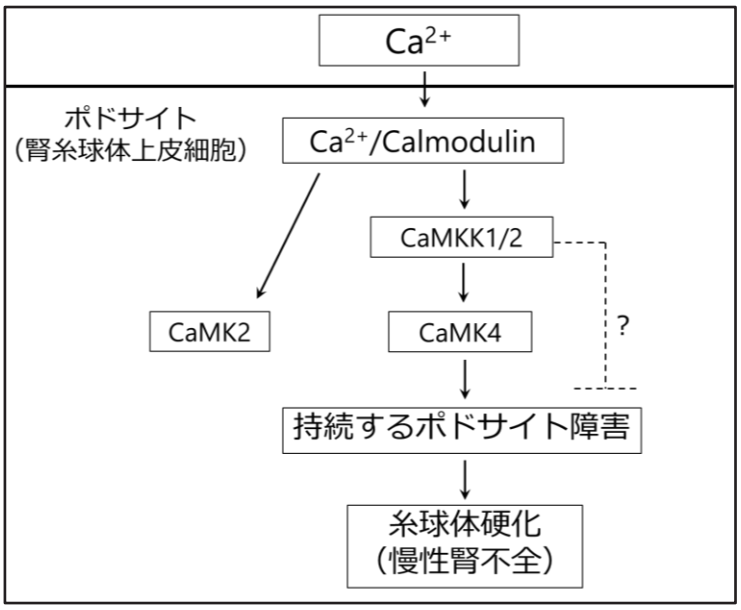
70　慢性腎臓病の進展を抑制するポドサイト標的治療の開発	丸山　彰一

【目的】近年、世界的に増加する慢性腎臓病（CKD）は、心血管疾患の独立したリスク因子であり、透析治療を含め大きな問題となっている。持続するポドサイト障害は、糸球体硬化そして慢性腎不全へと進行する CKD の共通のメカニズムであり、ポドサイトを標的とした治療開発が望まれている。今回、ポドサイト障害に重要な役割を担っているカルシウム（Ca）シグナルの中でも Ca／カルモジュリン依存性キナーゼに着目し、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群などの難治性腎疾患におけるその役割と、治療ターゲットとなり得るか否かについて検証した。また、治療有効性の向上や副作用の軽減を目的に、ドラッグデリバリーシステムを使用した細胞標的治療の開発や腎疾患への臨床応用も望まれているが、現在までのところ実現に至っていない。我々は、ループス腎炎における有効性を報告したポドサイト標的治療としてのネフリン抗体コートナノ粒子につき、難治性ネフローゼ症候群における有用性を検討した。

【方法】ヒト巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）患者における Ca／カルモジュリン依存性キナーゼ（CaMK）各分子の発現の評価を、腎生検検体を用いて行った。また、ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウス、*CaMKK*（CaMK キナーゼ）欠損マウス、野生型マウスに、FSGS マウスモデルであるアドリアマイシン誘導性腎障害モデルを作製し、CaMK 各分子の発現の変化、尿蛋白の程度の評価を行った。同 FSGS マウスモデルに対して、CaMK4 阻害薬を封入したナノ粒子に抗ネフリン抗体をコートし、腹腔内投与を行った。

【結果】ヒト FSGS 患者では、ポドサイト上における CaMKK、CaMK4 発現は上昇していたが、CaMK2 の発現上昇を認めなかった。ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウスにおいてアドリアマイシンにて腎障害を誘導したが、野生型に比して尿蛋白を認めなかった。CaMK4 の活性化に必須の *CaMKK* を欠損させたマウスにおいては、有意差はないものの逆に悪化する傾向がみられた。ネフリン抗体をコートしたナノ粒子に CaMK4 阻害薬を封入したものをアドリアマイシン誘導性のマウスモデルに投与すると、同量のフリーの CaMK4 阻害薬を投与した群に比して有意に蛋白尿を減少させた。

ポドサイトにおける CaMKK－CaMK4 シグナル



70. 慢性腎臓病の進展を抑制するポドサイト標的治療の開発

丸山　彰一

名古屋大学 大学院医学系研究科 腎臓内科学

Key words：ポドサイト，難治性ネフローゼ症候群，カルシウム／カルモジュリン依存性キナーゼ

緒　言

近年、世界的に増加する慢性腎臓病（CKD）は、心血管疾患の独立したリスク因子であり、透析治療を含め医療経済上大きな問題となっている。ポドサイト（腎糸球体上皮細胞）は、糸球体の濾過機能や恒常性の維持に重要な役割をもつ。持続するポドサイト障害は、糸球体硬化そして慢性腎不全へと進行する CKD の共通のメカニズムであり、ポドサイトを直接標的とした治療は国際的に望まれる。

持続性のカルシウム（Ca）依存性シグナルは、ポドサイト障害において重要な役割を担っている。この分野の研究としては、ポドサイトの Ca チャネルの一つ transient receptor potential channel 6（TRPC6）の変異が難治性ネフローゼ症候群との関連を示唆されており、TRPC6 の変異に伴うメカニズムの解析がすすんでいる。また、最近では TRPC6 のみならずそのファミリー分子である TRPC5 の関与も指摘され［1］、その新規の阻害薬の開発［2］も加わり、注目を集めている。その下流に目を向けると、Ca／カルモジュリン依存性ホスファターゼであるカルシニューリン阻害薬は広く使用されているが、治療抵抗例もあり十分とはいえない。そのため、治療有効性の向上や副作用の軽減を目的に、ドラッグデリバリーシステムを使用した細胞標的治療の開発、腎疾患への臨床応用が望まれているが、現在までのところ実現に至っていない。

本研究では、新たな治療標的として Ca 依存性のシグナルである CaMK4（Ca／カルモジュリン依存性キナーゼⅣ）とその活性化に必須である CaMKK（CaMK キナーゼ）に着目する。研究代表者らは、ループス腎炎において、CaMK4 シグナル経路がポドサイト内で重要な役割を担い、運動能亢進・アクチン細胞骨格の再構成を介してポドサイト障害に関与する知見を得ている［3］。そして、ポドサイト特異的分子のネフリンに対する抗体をコートしたナノ粒子によるデリバリーシステムを作製し、自然発症ループスマウスにおけるその有効性について報告した。これらの知見を発展させ、本研究では難治性ネフローゼ症候群（巣状分節性糸球体硬化症等）に対して、CaMKK－CaMK4 シグナル経路は有効な新規治療標的となりうるかにつき検証をすすめた。

本研究において、我々は CaMKK－CaMK4 経路がヒト難治性ネフローゼ症候群の一つである巣状糸球体硬化症（FSGS）において活性化していることを見出した。ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウスにアドリアマイシン誘導性腎障害を起こしたところ、野生型に比し有意に蛋白尿の減少を認め、ポドサイト上の CaMK4 を標的とした抗ネフリン抗体コート CaMK4 阻害薬封入ナノ粒子においてもアドリアマイシン腎障害の蛋白尿を有意に改善した。これらのことから CaMKK－CaMK4 経路は難治性ネフローゼ症候群の良い治療標的となること、抗ネフリン抗体コートナノ粒子の有用性が示された。

方　法

1. 蛍光免疫染色

ヒト腎生検検体の凍結切片を 4 μm に薄切し、アセトンにて固定したあと抗ヒト CaMKK 抗体、抗ヒト CaMK4 抗体、抗ヒトネフリン抗体を反応させ、各種 2 次抗体にて染色。最後に DAPI 染色を行い封入した。

2.　アドリアマイシン誘導性マウスモデル

アドリアマイシンを Balb/c マウスに対しては 10 mg/kg、C57BL/6J マウスに対しては 18 mg/kg 尾静注にて投与し、7、14、28 日後に尿サンプルを採取し、14、28、42 日目に屠殺し、腎臓を採取した。

3.　抗ネフリン抗体コートナノ粒子による治療

CaMK4 阻害薬（KN-93）を封入したナノ粒子に抗ヒトネフリンウサギ IgG をコートし、アドリアマイシン誘導性腎障害マウスに腹腔内投与を行った。比較群としては抗ヒトネフリンウサギ IgG のコートのみを行った空のナノ粒子もしくは同量のフリーの CaMK4 阻害薬の投与を行った。

結　果

1.　ヒト FSGS 患者のポドサイトにおいて CaMKK と CaMK4 の発現上昇がみられた

ヒト FSGS 症例の腎生検検体を CaMKK、CaMK4 とポドサイトの特異的なマーカーであるネフリンにて染色を行った。ヒト FSGS ではポドサイト上の CaMKK と CaMK4 の発現上昇を認めた（図 1）。また Ca／カルモジュリン依存性キナーゼファミリーである CaMK2 の糸球体での発現はみられなかった。

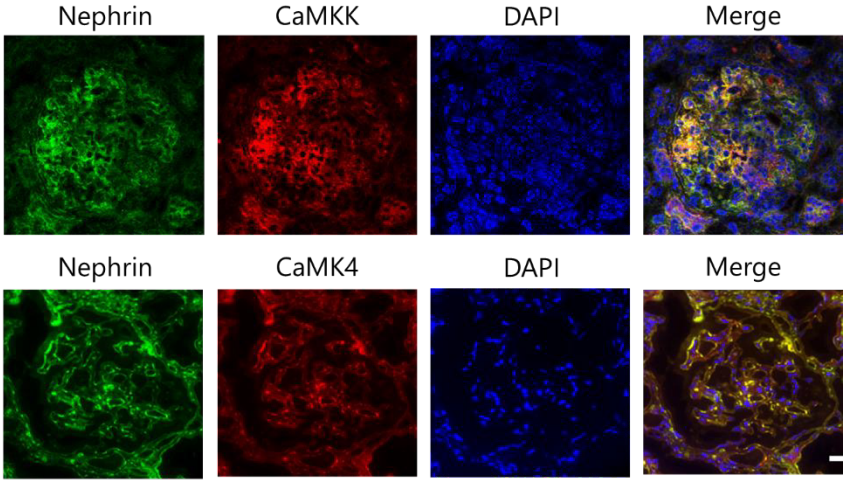


図 1.　FSGS における CaMKK、CaMK4 の発現
緑：ネフリン（ポドサイトマーカー）、赤：CaMKK（上段）、CaMK4（下段）、
青：DAPI（核染色）。スケールバー：100 μm。

2.　ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウスにおいてはアドリアマイシン腎症の改善が認められた

CaMK4flox マウスと NPHS2-Cre マウスを掛け合わせ、ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウスを作製した。同マウス（*Camk4* $^{flox/flox}$ *NPHS2 cre*$^{+}$）にアドリアマイシンを尾静注し 14 日後の尿蛋白を評価したところ、コントロール群（*Camk4* $^{flox/flox}$ *NPHS2 cre*$^{-}$）に比して有意に蛋白尿の改善を認めた（図 2）。

3.　CaMKK 欠損マウスにおいてはアドリアマイシン腎症の改善が認められなかった

CaMKK は CaMK4 の活性化に必須のキナーゼである。その役割を確認するために CaMKK 欠損マウスを使用して同様にアドリアマイシン腎症を作製し蛋白尿を経時的に評価した。CaMKK 欠損マウスでは予想に反し、どの時点においても野生型に比し明らかな蛋白尿の改善を認めなかった（図 3）。

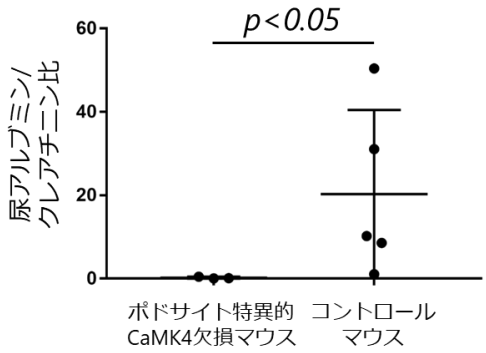


図 2. 尿中アルブミン／クレアチニン比

ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウス（*Camk4* $^{flox/flox}$ *NPHS2 cre* $^{+/-}$）、コントロールマウス（*Camk4* $^{flox/flox}$ *NPHS2 cre* $^{-/-}$）にアドリアマイシン投与後 14 日目の蛋白尿。unpaired t test、$p<0.05$。

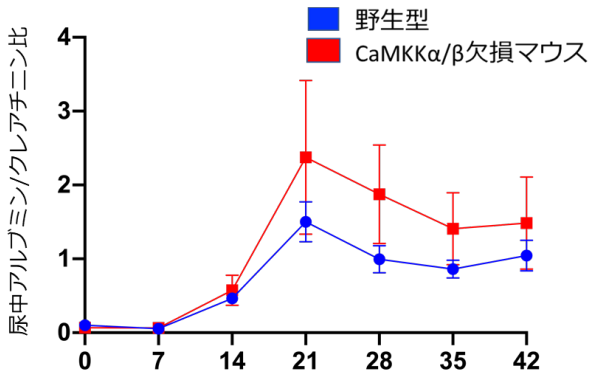


図 3. 尿中アルブミン／クレアチニン比

野生型（青線）、*CaMKK* 欠損マウス（赤線）にアドリアマイシン投与後の各日数における蛋白尿。

4. 抗ネフリン抗体コート CaMK4 阻害薬（KN-93）封入ナノ粒子は有意に蛋白尿を減少させた

抗ネフリン抗体コート KN93 封入ナノ粒子（KN93：10μg／週）をアドリアマイシン投与後 7 日目に投与を開始して 14 日目の尿蛋白を評価した。コントロールとして、空の抗ネフリン抗体コートナノ粒子、同量のフリーの KN93（10μg／週）の投与を行ったが、有意に KN93 封入ナノ粒子群で有意に蛋白尿の改善を認めた（図 4）。

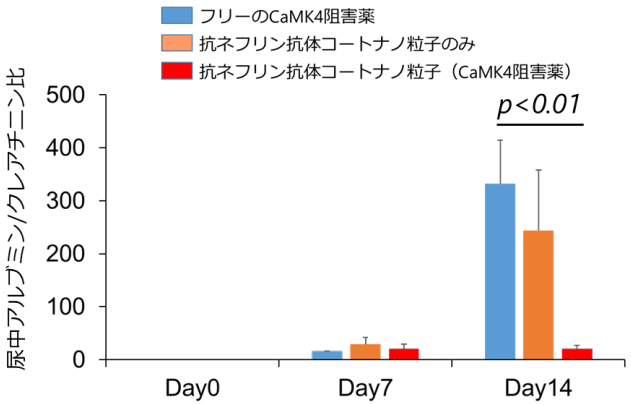


図 4. 尿中アルブミン／クレアチンニン比

アドリアマイシン投与後 7 日目に CaMK4（KN-93）封入ナノ粒子、空のナノ粒子、同量のフリーの KN93 投与を行い、アドリアマイシン投与後 14 日目における蛋白尿。one-way ANOVA（post hoc：Tukey test）。

考　察

我々はポドサイト上の CaMK4 がヒト難治性ネフローゼ症候群の一つである FSGS において発現が上昇していることを見出した。一方、Ca／カルモジュリン依存性キナーゼファミリーである CaMK2 の発現は認められなかった。同じ Ca／カルモジュリン依存性キナーゼファミリーにおいても CaMK2 は活性化に CaMKK を必要としない一方、CaMK4 には CaMKK による活性化が必須である。これは FSGS 症例のポドサイトでは Ca／カルモジュリン－CaMKK－CaMK4 経路が有意に活性化している可能性を示している。その確認のため CaMKK を同様に FSGS の腎生検検体で染色をしたところ CaMK4 と同様に発現上昇が認められた。

マウスにおける検討においても、FSGS マウスモデルであるアドリアマイシン腎症の糸球体において有意に CaMKK α、CaMKK β の発現上昇を認めていたことから、ヒト FSGS と同様に CaMKK－CaMK4 経路が重要であると考えられる。実際、*CaMK4* をポドサイト特異的に欠損したマウスにおいては有意に蛋白尿の改善を認めた。それに加え、ポドサイト上の CaMK4 を標的とした抗ネフリン抗体コート KN-93 封入ナノ粒子はアドリアマイシン腎障害の蛋白尿を有意に改善した。同量のフリーの KN-93 では蛋白尿を改善できなかったことから、抗ネフリン抗体コートナノ粒子の治療有用性が示された。加えて、治療薬剤投与量の減量が可能であるため、副作用の軽減にもつながるものと考えられる。

一方、CaMK4 の活性化に必須な CaMKK の遺伝子欠損マウスにおいては予想に反し有意差はないものの蛋白尿の悪化傾向を認めた。CaMKK には α と β の 2 つのアイソフォームがあるが、ポドサイトにおける各々のアイソフォームの作用は不明な部分が多く、ポドサイトに保護的な作用がある可能性もある。今回使用した *CaMKK* 欠損マウスに関しては全身欠損マウスであり、ポドサイト以外の細胞における CaMKK の影響も否定できないが、ポドサイトを標的とした CaMK4 阻害薬の治療応用に向け、CaMKK の各アイソフォームにおけるポドサイト内での役割の解明も今後の課題としたい。

共同研究者・謝辞

CaMKK 欠損マウスは、東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻基礎神経医学講座の尾藤晴彦教授のご厚意により供与いただきました。心より感謝申し上げます。

文　献

1) Schaldecker T, Kim S, Greka A et al. Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter. J Clin Invest. 2013 Dec;123(12):5298-309. PMID: 24231357. DOI: 10.1172/JCI71165

2) Zhou Y, Castonguay P, Greka A et al. Science. 2017 Dec 8;358(6368):1332-1336. PMID: 29217578. DOI: 10.1126/science.aal4178.

3) Maeda K, Otomo K, Maruyama S, Tsokos GC et al. J Clin Invest. 2018 Aug 1;128(8):3445-3459. PMID: 29985166 DOI: 10.1172/JCI99507.