

研究課題

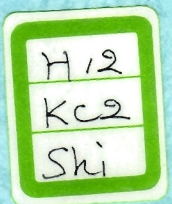
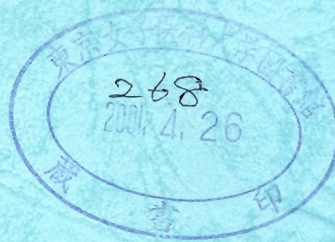
ネフローゼ症候群のステロイド薬感受性についての  
グルココルチコイド受容体遺伝子解析

課題番号

11671056

平成11年度～12年度科学研究費補助金（基盤研究C2）研究成果報告書

平成13年3月3日



研究代表者 白髪宏司  
東京女子医科大学医学部助教授



研究課題

ネフローゼ症候群のステロイド薬感受性についての  
グルココルチコイド受容体遺伝子解析

課題番号

11671056

平成11年度～12年度科学研究費補助金（基盤研究C2）研究成果報告書

平成13年3月3日

研究代表者 白髪宏司  
東京女子医科大学医学部助教授

## 研究組織

研究代表者：白髪宏司（東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者：伊藤克己（東京女子医科大学医学部教授）

研究分担者：吉岡俊正（東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者：秋岡祐子（東京女子医科大学医学部助手）

## 研究経費

平成11年度 1300千円

平成12年度 1200千円

計 2500千円

## 研究発表

### ア 学会誌等

1. M. Motojima, J. Kakuchi, T. Yoshioka. : Association of TGF- $\beta$  signaling in angiotensin II-induced PAI-1 mRNA upregulation in mesangial cells : role of PKC. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1449:217-226 1999.
2. Watanabe S, Shiraga H, Ito K, et al.: A peculiar vacuolization in the kidney transplant of a child treated with tacrolimus. *Clin Transplant* 14(Suppl. 3): 30-32, 2000.
3. Yoshioka T, Iwamoto N, et al.: Anti-NO action of calvediol in cell-free system and in vascular endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* 129:1530-1535, 2000.
4. Iwamoto N, Yoshioka T, Shiraga H, Ito K: Acetyl-seryl-sparyl-lysyl-proline is a novel natural cell cycle regulator of renal cells. *Life Sciences* 66(15):PL221-226, 2000.
5. Yoshioka T, et al.: Molecular and function characterization of HSC54, a novel variant of human heat-shock cognate protein 70. *Molecular Pharrmacology.* 58:1257-1263, 2000.
6. 吉岡俊正他：融合遺伝子発現系によるタンパク質可視化術の分子薬理的応用。日本薬理学会誌 116:36-42, 2000.

### イ 口頭発表

1. 岩本典子、吉岡俊正、白髪宏司、伊藤克己：造血細胞抑制因子、N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-prolineの腎細胞増殖抑制作用の検討、第8回腎とエリスロポエチン研究会、（東京）、1999.

学会プログラム・抄録集 p29, 1999.

2. 白髪宏司：小児肝移植とタクロリムス、ランチョンセミナー、小児臓器移植におけるタクロリムスの使用経験。第21回日本小児腎不全学会(兵庫県南淡町)、第21回日本小児腎不全学会プログラム・抄録集p13, 1999.
3. K. Ito, H. Chikamoto, T. Suzuki, A. Fukazawa, M. Hattori, H. Shiraga : Unsatisfactory final height of prepubertal kidney transplantation (P-KT) children. 28th International Symposium GH and Growth Factors in Endocrinology and Metabolism (Boston), 1999.
4. Akioka Y., Hattori M., Yamaguchi Y., Watanabe S., Shiraga H., Ito K.: Histological changes for corticosteroid therapy in children with IgA nephropathy. XVth International Congress of Nephrology (Buenos Aires, Argentina), Abstracts 259, 1999.
5. 岩本典子、吉岡俊正、白髪宏司、伊藤克己：造血細胞抑制因子、N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-prolineの腎細胞増殖抑制作用の検討、第8回腎とエリスロポエチン研究会、（東京）、1999.
6. Iwamoto N, Yoshioka T.: A two-step formation of nitric oxide from nitrite by oxyhemoglobin. Nitric Oxide in Biochemistry and Biology, Gordon Research Conference, (Ventura), 1999.
7. Iwamoto N, Ito K, Yoshioka T: Distinct difference between human and lamprey hemoglobins for their ability to reduce nitrite. 10Th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research, (Japan), 2000.
8. Hiroshi Shiraga, Kazunari Tanabe, Hiroshi Toma, Katsumi Ito: Steroid withdrawal by tacrolimus based immunosuppression in pediatric renal transplants. First Congress of the International Pediatric transplant association (Venice, Italy) *Pediatr Transpl* 4(Suppl 2): 66, 2000.

#### ウ 出版物

1. 白髪宏司, 伊藤克己：肝・腎同時移植。” Annual Review 腎臓 2000” 中外医薬社、東京 pp.179-186, 2000.
2. 白髪宏司：先天性ネフローゼ症候群。”小児科診療Q & A”、六法出版社、名古屋、pp.332-333、2000.
3. 白髪宏司, 伊藤克己：HSPNおよびTTP/HUS 急速な腎機能低下を呈する糸球体疾患群。特集糸球体疾患の病態の理解と治療の最前線、内科 86(1): 62-68、2000.

4. 岩本典子、吉岡俊正、伊藤克己：ヘモグロビンによるNO産生機序についての検討。伊藤克己、玄番宗一監修、”腎とフリーラジカル第5集”東京医学社、東京 pp.29-32、2000.
5. 白髪宏司：急性腎不全 16. 腎・泌尿器疾患。矢田純一、柳澤正義、山口規容子、大関武彦編、”今日の小児治療指針”、第12版 医学書院、東京、pp 405-406、2000.

## 研究成果

1. 本研究は、ネフローゼ症候群のグルココルチコイド応答性の多様性の分子薬理的機序を明らかにすることを目標とした。

### 1) 健常者におけるグルココルチコイドレセプター遺伝子多型の解析

グルココルチコイド受容体（GCR）遺伝子は、10個のエクソンからなる遺伝子である。本研究では、健常者の末梢血よりゲノムを抽出し既報に従ってそれぞれのエクソン（機能的GCRをコードするGCR $\alpha$ のコード領域）についてPCR法で遺伝子断片を増幅し、増幅された遺伝子断片を一本鎖コンフォーメーション多型解析（SSCP）法で遺伝子変異の有無をスクリーニングした。SSCPにより遺伝子配列の異常を疑った場合にはダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定する。これまでの報告では人口の約8%に何らかの配列異常が見いだされているので、最低100名の健常者について遺伝子多型を解析した。

### 2) 小児特発性ネフローゼ症候群患者のグルココルチコイドレセプター遺伝子多型解析

グルココルチコイド感受性の異なる小児ネフローゼ症候群患者（3から12歳；国際分類によるステロイド反応群；ステロイド依存群；およびステロイド抵抗群各最低20名）についてGCR遺伝子多型解析を行った。得られた遺伝子型と臨床所見、腎組織学的分類について解析した。

### 3) グルココルチコイド受容体の核移行についての解析

グルココルチコイド分子作用は、リガンドと結合した受容体が核内に移行し転写調節を行うことによる。ステロイド感受性低下症例では受容体核内移行が低下することが予想される。そこで、標識受容体を患者リンパ球に導入しグルココルチコイド刺激による核移行を解析する。この目的のためにGCR融合Green Fluorescent Protein (GFP)発現ベクターを研究分担者は既に作製し、動物細胞に遺伝子導入しその核移行を解析した。本研究ではこのGCR-GFP発現ベクターを健常者およびグルココルチコイド感受性の異なる小児ネフローゼ症候群患者末梢血単核球に導入し、GCR（蛍光蛋白として発現）の核移動によりステロイド作用を定量した

4) グルココルチコイド受容体四次構造を規定する細胞内蛋白について明らかにする。

GCRの四次構造は、熱ショック蛋白 (hsp90, hsp70, hsp27)、イムノフィリン (cyclophilin40, FKBP52)、p56などとの相互作用 (会合) により保たれている。これらの蛋白の発現異常が、GCRのリガンドとの結合、核移行を阻害する可能性が考えられる。そこで健常者およびグルココルチコイド感受性の異なる小児ネフローゼ症候群患者末梢血単核球におけるこれらの蛋白発現と臨床所見、腎組織学的分類について解析した。

5) グルココルチコイド受容体機能を抑制する転写因子について明らかにする。

GCRは他の転写因子とも相互作用し、互いの転写活性を制御する。GCRと相互作用を持つ転写因子としてFOS/JUN, NF- $\kappa$ Bが知られ、研究分担者はダイオキシン受容体 (AhR) との相互作用を見いだした (未公開)。本研究においては健常者およびグルココルチコイド感受性の異なる小児ネフローゼ症候群患者末梢血単核球を用いて、これらの蛋白の発現、導入GCR (前述のGCR-GFP) との相互作用を、イメージ解析および表面プラズモン共鳴解析 (IASys) により解析した。

2. Carvedilol, an adrenoceptor blocker with antioxidant activity, was studied for its ability to interact with NO in a cell-free condition and in an endothelial cell line (ECV304). In a cell-free system, carvedilol attenuated NO-dependent reduction of carboxy-2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide induced by a NO donor, ( $\pm$ )-(E)-4-methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide, which was determined by electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry. The EPR study also showed that nitrosylhemoglobin formation in rat red blood cells by the addition of NO-saturated solution was attenuated by prior incubation with 0.1 to 10  $\mu$ M carvedilol. NO-induced fluorescence in 4,5-diaminofluorescein-2 diacetyl (DAF-2DA)-loaded ECV304 cells was attenuated by carvedilol but not by labetalol. The IC<sub>50</sub> of carvedilol for NO donor (1-hydroxy-2-oxo-3-(aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene or sodium nitroprusside)-induced fluorescence of DAF-2DA in ECV304 cells was  $\approx 1.0 \times 10^{-7}$  M, which was similar to the reported IC<sub>50</sub> of carvedilol for the antioxidant effect. Cell toxicity induced by a NO donor determined by the number of viable cells after 24 hour treatment with 2-2'-(hydroxynitrosohydrazino)bis-ethanamine was significantly attenuated by pretreatment with 1  $\mu$ M carvedilol. Both free and

cell-associated carvedilol quenched NO. Because NO mediates both physiological and pathophysiological processes, NO quenching by the drug may have diverse clinical implications depending upon specific functions of local NO in tissues where carvedilol is distributed.

3. Other findings of the project

Reprint of published manuscripts are attached.