

令和元年5月21日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19530

研究課題名(和文) R3hdmlを用いたポドサイト特異的TGF-ベータ抑制機構の解明と治療応用の検討

研究課題名(英文) Elucidation of podocyte-specific TGF-beta suppression mechanism using R3hdml and examination of therapeutic application

研究代表者

石川 崇広 (Ishikawa, Takahiro)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00749426

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)：ポドサイト特異的遺伝子であるR3hdmlの糖尿病性腎症に対する役割を解明することを本研究の目的とした。培養ポドサイトを用いた検討において、R3hdmlはMAPKのうちp38MAPKのリン酸化抑制を介しポドサイトのアポトーシスを抑制していることが明らかとなった。またR3hdmlノックアウトマウスでは糖尿病腎症に特徴的な糸球体基底膜・ポドサイト足突起の変化が観察され、糖尿病を惹起するとアルブミン尿が増加した。さらにR3hdml過剰発現マウスは糖尿病状態において、同条件の野生型に比べて尿中アルブミン排泄が減少した。以上より、R3hdmlは糖尿病腎症の進展に保護的働く因子である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、将来的なR3hdmlを用いたポドサイト特異的な糖尿病性腎症の治療法を確立に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of podocyte-specific gene R3hdml in diabetic nephropathy.

In studies using cultured podocytes, R3hdml was found to suppress apoptosis of podocytes through suppression of p38 MAPK phosphorylation among MAPKs. In addition, changes in glomerular basement membrane and podocyte foot processes characteristic of diabetic nephropathy were observed in R3hdml knockout mice. In addition, albuminuria increased when diabetes was induced in R3hdml knockout mice.

Furthermore, it was revealed that in R3hdml overexpressing mice, albumin excretion in urine is reduced in diabetic state as compared to wild type under the same condition. Thus, R3hdml may be a protective factor in the development of diabetic nephropathy.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：ポドサイト 糖尿病性腎症 TGF- p38MAPK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では糖尿病患者は年々増加している。厚生労働省の平成 28 年(2016 年)「国民健康・栄養調査」においても、糖尿病有病者(HbA1c 6.5%)の割合は、男性で 16.3%、女性で 9.3% であり、我が国の総人口のうち約 1,000 万人は糖尿病を有していると推計されている。そして糖尿病の合併症の一つである**糖尿病性腎症**は、我が国の新規透析導入原因疾患の第 1 位であり、病態の解明および克服は医学のみならず医療経済学的にも大変重要な問題である。糖尿病性腎症の病態の主座は腎系球体であり、特に**ポドサイトという細胞の障害が糖尿病性腎症の発症・進展に深く関与する**ことが近年報告されてきた(J Clin Invest.1997)。そこで我々は糖尿病性腎症を含む慢性腎臓病の発症機序を探るべく、マウスの系球体を用いて cDNA ライブラリー/cDNA microarray という手法を用いて、系球体に特異的に発現している遺伝子の同定とその機能解析を行った(Am J Pathol 2002, EMBO J2006)。そして約 6000 種類の系球体発現遺伝子のうち、定常状態において主にポドサイトに発現し、かつ糖尿病状態で発現上昇している遺伝子として、R3hdml を同定した。R3hdml は近年報告されたゲノムワイド関連解析にて、**アジア人における 2 型糖尿病関連遺伝子の一つとして同定され、大きく注目されている**(NatGenet. 2011)。

そこで我々は R3hdml に注目して研究を開始した。その結果、R3hdml は生理的な条件下では眼球と腎系球体のポドサイトのみに特異的に発現することと、R3hdml は糖尿病性腎症の発症・進展に深く関わっている Transforming growth factor- β (TGF- β)により発現制御を受けることが明らかとなった。

しかしながら TGF- β により発現制御されている R3hdml がポドサイトにおいてどのような生理的な役割を果たしているのか、更に糖尿病状態で発現が上昇している R3hdml の病的な状態における役割については未だ明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

そこで我々は、R3hdmlの生物学的作用の解明を通して、R3hdmlの糖尿病性腎症に対する役割、およびR3hdmlを用いたポドサイト特異的な糖尿病性腎症の治療法を確立することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ポドサイトを用いた R3hdml の機能解析

R3hdml の細胞内シグナルに与える影響についての検討

R3hdml が TGF- β の細胞内シグナルにどのような影響を与えるかを、R3hdml 過剰発現ポドサイトおよび R3hdml ノックアウトポドサイトを用い検討した。実験手法として RT-PCR、ウェスタンブロット法を使用した。

各種マウスを用いた R3hdml の機能解析

マウス腎系球体における R3hdml の発現様式の検討

単離したマウス腎系球体を用いて、定常状態および糖尿病を惹起した際の R3hdml の発現について、RT-PCR およびウェスタンブロット法にて検討を行った。

R3hdml KO マウスの表現型の解析

R3hdml KO を作成し、定常状態および糖尿病を惹起した際の表現型を、RT-PCR およびウェスタンブロット法、免疫染色法などを用いて検討した。

R3hdml 過剰発現マウスの作成

アデノウイルスベクターを用いて、R3hdml 過剰発現マウスを作成しその表現型を観察した。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

4. 研究成果

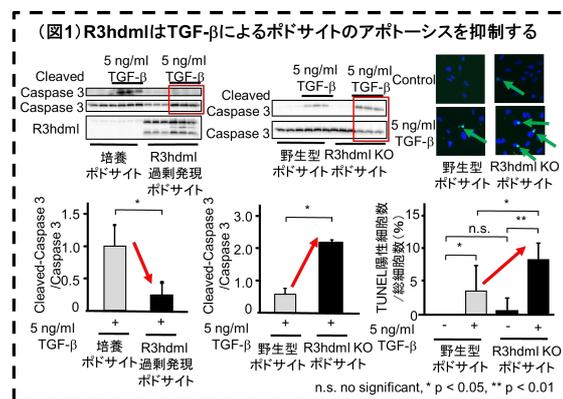
ポドサイトを用いた R3hdml の機能解析

R3hdml の細胞内シグナルに与える影響についての検討

続いて我々は TGF-β の細胞内シグナルに対する R3hdml の効果を検討した。その目的のために、まず、レトロウイルスベクターを用いた R3hdml 過剰発現ポドサイト、および単離系球体から R3hdml ノックアウトポドサイトを樹立した。TGF-β シグナルは、Smad や p38MAPK、Jnk、Erk などの種々の細胞内シグナルを活性化することが知られているが、検討の結果、R3hdml は Smad のリン酸化には影響を与えず、**p38MAPK のリン酸化のみを特異的に抑制する**ことを明らかとした。さらに In vitro Kinase Assay においても、実際に p38MAPK のリン酸化を抑制していることが明らかとなった。

続いて糖尿病性腎症と p38MAPK に関して文献検索を行ったところ、TGF-β 刺激による p38MAPK リン酸化の亢進はポドサイトのアポトーシスを誘導し、腎機能を悪化させる報告を認めた (J Clin Invest. 2001)。

そこでウェスタンブロット法を用いて検討したところ、R3hdml 過剰発現ポドサイトでは Caspase3 の活性が抑制され、一方 R3hdml ノックアウトポドサイトでは Caspase3 の活性化が抑制され、TUNEL 染色においてポドサイトのアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。さらに p38MAPK 阻害剤にて Caspase3 の活性化がキャンセルされたこと



から、**R3hdml は p38MAPK 活性に伴う Caspase3 活性化の抑制を介して、ポドサイトのアポトーシスを抑制している**ことが明らかとなった (図 1)。

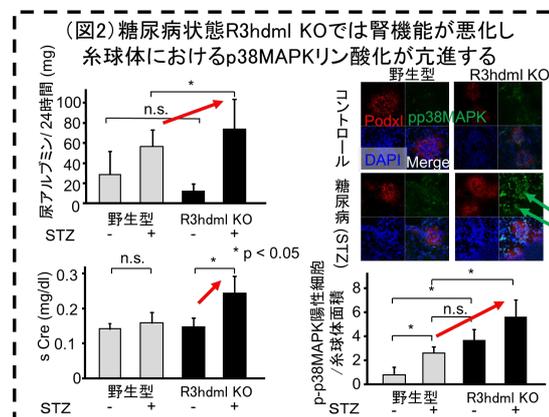
各種マウスを用いた R3hdml の機能解析

マウス腎系球体における R3hdml の発現様式の検討

続いて in vivo における R3hdml の病的な状態における役割を検討する目的で、野生型マウスにストレプトゾトシン (STZ) を投与し糖尿病状態における R3hdml の発現を観察した。その結果、投与後 2 週間において、腎系球体ポドサイトにおいて R3hdml の発現が上昇することが明らかとなった。

R3hdml KO マウスの表現型の解析

続いて in vivo における機能解析を更に進める目的で、R3hdml ノックアウトマウス (R3hdml KO) を作成した。12 週までに於いて、野生型と比べて R3hdml KO は成長・発達に大きな変化を認めず、腎系球体の光学顕微鏡下における観察でも特に大きな変化を認めなかった。しかしながら電子顕微鏡下で観察したところ、**R3hdml KO では糖尿病腎症に特徴的な系球体基底膜・ポドサイト足突起の変化が観察された**



(図 2)。さらに定常状態においては野生型と比べて尿中アルブミン排泄に変化は認められな

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

ったものの、STZ を用いて糖尿病を惹起した R3hdml KO は、同条件の野生型に比べて尿中アルブミン増加と腎機能の悪化を認めた。さらに面積染色において、糸球体における p38MAPK のリン酸化も亢進していた (図 2)。以上より **R3hdml は糖尿病性腎症の進展に抑制的な因子である**可能性を見出した。

R3hdml 過剰発現マウスの作成

最後に in vivo における R3hdml 過剰発現モデルの作成を実施した。まずアデノウイルスベクターを作成、増殖し感染力があり、かつ安定して R3hdml を発現していることを確認した。続いて尾静脈からアデノウイルスを投与し、肝臓に発現していることを確認した。そして R3hdml 過剰発現マウスに STZ を用いて糖尿病を惹起したところ、同条件の野生型に比べて尿中のアルブミン排泄が減少することが明らかとなった。以上より、**R3hdml は糖尿病腎症の進展に保護的働く可能性が示唆された。**

以上より R3hdml は、ポドサイトにおいては TGF- β シグナルの一つである p38MAPK の活性化を抑制することでポドサイトのアポトーシスの抑制に関与することが明らかとなった。またマウスを用いた検討により、R3hdml の欠損は糖尿病状態におけるアルブミン尿の増加に寄与し、R3hdml を発現上昇させることでアルブミン尿は減少することから、**R3hdml は糖尿病性腎症の進展に抑制的な因子である**可能性が示された。今後更にその機能を解明することは、将来的に R3hdml を用いたポドサイト特異的な糖尿病性腎症の治療法の確立に寄与すると期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1) Comparing the effects of ipragliflozin versus metformin on visceral fat reduction and metabolic dysfunction in Japanese patients with type 2 diabetes treated with sitagliptin: A prospective, multicentre, open-label, blinded-endpoint, randomized controlled study (PRIME-V study). Koshizaka M, Ishikawa K, Ishibashi R, Maezawa Y, Sakamoto K, Uchida D, Nakamura S, Yamaga M, Yokoh H, Kobayashi A, Onishi S, Kobayashi K, Ogino J, Hashimoto N, Tokuyama H, Shimada F, Ohara E, Ishikawa T, Shoji M, Ide S, Ide K, Baba Y, Hattori A, Kitamoto T, Horikoshi T, Shimofusa R, Takahashi S, Nagashima K, Sato Y, Takemoto M, Newby LK, Yokote K; PRIME-V Study Group. Diabetes Obes Metab. 2019 Apr 17. doi: 10.1111/dom.13750.

2) Biallelic WRN Mutations in Newly Identified Japanese Werner Syndrome Patients. Maezawa Y, Kato H, Takemoto M, Watanabe A, Koshizaka M, Ishikawa T, Sargolzaeiaval F, Kuzuya M, Wakabayashi H, Kusaka T, Yokote K, Oshima J. Mol Syndromol. 2018 Jul;9(4):214-218. doi: 10.1159/000489055. Epub 2018 May 15.

3) N-3 polyunsaturated fatty acids improve lipoprotein particle size and concentration in Japanese patients with type 2 diabetes and hypertriglyceridemia: a pilot study. Ide K, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Ishikawa T, Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Lipids Health Dis. 2018 Mar 15;17(1):51. doi: 10.1186/s12944-018-0706-8.

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

4) Physician-initiated clinical study of limb ulcers treated with a functional peptide, SR-0379: from discovery to a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

Hironori Nakagami, Ken Sugimoto, Takahiro Ishikawa, Taku Fujimoto, Toshifumi Yamaoka, Misa Hayashi, Eiji Kiyohara, Hiroshi Ando, Yuta Terabe, Yoichi Takami, Koichi Yamamoto, Yasushi Takeya, Minoru Takemoto, Masaya Koshizaka, Tamotsu Ebihara, Ayumi Nakamura, Mitsunori Nishikawa, Xiang Jing Yao, Hideki Hanaoka, Ichiro Katayama, Koutaro Yokote and Hiromi Rakugi. NPJ Aging Mech Dis. 2018 Feb 13;4:2. doi: 10.1038/s41514-018-0021-7. eCollection 2018.

5) Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis. Shoji M, Takemoto M, Kobayashi K, Shoji T, Mori S, Sagara JI, Kurosawa H, Hirayama Y, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Sci Rep. 2018 Jan 10;8(1):245.

6) Continuous glucose monitoring reveals hypoglycemia risk in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Takemoto M, Tokuyama Y, Saito T, Yokote K. J Diabetes Investig. 2018 Jan;9(1):69-74. doi: 10.1111/jdi.12676.

7) Werner syndrome: a model for sarcopenia due to accelerated aging:

Masaya Yamaga, Minoru Takemoto, Mayumi Shoji, Kenichi Sakamoto, Masashi Yamamoto, Takahiro Ishikawa, Masaya Koshizaka, Yoshiro Maezawa, Kazuki Kobayashi, Koutaro Yokote. Aging 2017 Jul 19.

8) Efficacy and safety of ipragliflozin and metformin for visceral fat reduction in patients with type 2 diabetes receiving treatment with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in Japan: a study protocol for a prospective, multicentre, blinded-endpoint phase IV randomized controlled trial (PRIME-V study). Koshizaka M, Ishikawa K, Ishikawa T, Kobayashi K, Takemoto M, Horikoshi T, Shimofusa R, Takahashi S, Nagashima K, Sato Y, Tatsuno I, Terano T, Hashimoto N, Kuribayashi N, Uchida D, Yokote K; PRIME-V Study Investigators. BMJ Open. 2017 May 9;7(5):e015766.

9) Recent Trends in WRN Gene Mutation Patterns in Individuals with Werner Syndrome. Yamaga M, Takemoto M, Takada-Watanabe A, Koizumi N, Kitamoto T, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. J Am Geriatr Soc. 2017 Apr 10.

10) Combination of cilostazol and probucol protected podocytes from lipopolysaccharide-induced injury by both anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. He P, Kawamura H, Takemoto M, Maezawa Y, Ishikawa T, Ishibashi R, Sakamoto K, Shoji M, Hattori A, Yamaga M, Ide S, Ide K, Hayashi A, Tokuyama H, Kobayashi K, Yokote K. J Nephrol. 2016 Dec 22.

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

11) A novel podocyte gene, semaphorin 3G, protects glomerular podocyte from lipopolysaccharide-induced inflammation. Ishibashi R, Takemoto M, Akimoto Y, Ishikawa T, He P, Maezawa Y, Sakamoto K, Tsurutani Y, Ide S, Ide K, Kawamura H, Kobayashi K, Tokuyama H, Tryggvason K, Betsholtz C, Yokote K. Sci Rep. 2016 May 16;6:25955

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 新規 TGF- β シグナル抑制因子である R3hdm1 のポドサイトにおける機能解析: 石川崇広、竹本稔、秋元義弘、楊國昌、坂本憲一、正司真弓、山賀政弥、井出真太郎、井出佳奈、前澤善朗、小林一貴、横手幸太郎, 第 59 回糖尿病学会年次学術集会 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。