

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790581
 研究課題名 (和文) 誘導型コンディショナルノックアウトマウスを用いた CTGF の腎疾患における役割
 研究課題名 (英文) Role of CTGF in renal diseases in conditional knockout mice

研究代表者 横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)
 京都大学・医学研究科・産学官連携助教
 研究者番号：90378779

研究成果の概要：CTGF コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。Targeting コンストラクト、組み換え ES 細胞、キメラマウスを作製し homozygous floxed CTGF マウスを確認した。Heterozygous floxed CTGF マウスと全身性の誘導性 Cre マウスとの交配により得られた変異マウスは、tamoxifen により組み換えが起こることを確認した。さらに tamoxifen による誘導型糸球体上皮細胞特異的 CreER^{T2} マウスを作製し、薬剤誘導性に上皮細胞特異的に組み換えが認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎線維化とCTGF

腎の線維化は糸球体硬化と尿細管の萎縮・間質の線維化であり、ほとんどすべての腎病変に共通の腎機能廃絶に至る病態である。この機序にはTGF- β が糸球体内および尿細管間質病変において細胞外基質産生を介して腎疾

患を増悪させると考えられ、その抑制により腎疾患の進展抑制が報告されている。しかしながら、TGF- β は免疫抑制および抗癌作用を持つなど、長期にわたる抑制にはいまだ議論の余地がある。申請者はconnective tissue growth factor (CTGF)が、TGF- β の細胞外基質産生作用を媒介する因子であることを報告

してきた (Yokoi et al. 他10名、1番目、*Am J Kidney Dis* 2001, Yokoi et al. 他10名、1番目、*Am J Physiol* 2002)。申請者は*in vivo*においてもCTGFアンチセンスDNAを経腎静脈的に腎特異的に遺伝子導入することで、腎線維化が軽減することを報告した(Yokoi et al. 他11名、1番目、*J Am Soc Nephrol* 2004)。しかしながら、アンチセンスDNAによる抑制は部分的であり、遺伝子導入できる部位は間質線維芽細胞、尿細管細胞など特定の部位に限られている。これらのことより、ノックアウトマウスによる解析が期待されるが、CTGFノックアウトマウスは生後すぐ、肋骨の変形による呼吸不全で死亡し(Ivkovic et al. 他7名、*Development* 130: 2779-2791, 2003)、成体での検討が困難であった。申請者はCTGFの腎臓での意義解明にはCTGFコンディショナルノックアウトマウス(floxed CTGF マウス)が必要であると考えた。さらに治療的な意義の検討を可能とするためにはtamoxifenにより誘導可能なCreER^{T2}(変異estrogen receptor)システム(Brocard et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14559-14563, 1997)による誘導型CTGFコンディショナルノックアウトマウスが望ましいと考え、本研究に着手した。Floxed CTGFマウスと全身でCreER^{T2}を発現するRos_aCreER^{T2}との交配で得られるマウスは、tamoxifen注射後CreER^{T2}が核内に移行し、loxP部位で挟まれたCTGF遺伝子を欠損させることが可能である。このマウスは成体後や疾患誘導後にCTGFを全身の細胞で欠損させることが可能となり、糸球体疾患や間質線維化モデルでの線維化誘導機序におけるCTGFの役割を明確にし、CTGF抑制の治療的意義解明にも貢献すると考えている。

(2) 糸球体上皮細胞における CTGF の役割

申請者は糸球体上皮細胞ポドサイトにおける CTGF の意義についても解析をすすめてき

た。ポドサイトはbasal状態でCTGFを発現しているがその機能については不明であった。申請者はネフリンプロモーターを用いてポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウス(CTGF-Tgマウス)を作製した。CTGF-Tgマウスはbasal状態ではnon-Tgマウスと明らかな差を認めなかったが、streptozotocinにより糖尿病を惹起すると、CTGF-Tgマウスは尿中アルブミン排泄が著明に増加した。また糖尿病CTGF-Tgマウスでは、WT1陽性細胞(ポドサイト)数の減少、電子顕微鏡でポドサイトの空胞変性、ポドシンの発現の減少が認められた。これらの研究より、ポドサイトにおけるCTGF過剰発現は糖尿病状態ではポドサイト傷害性に作用することが明らかとなったが、さらなる意義検討にはポドサイト特異的にCTGFを欠損させるモデルの確立が必要と考えた。そこでCreリコンビナーゼと変異エストロゲン受容体の融合蛋白(Cre-ER^{T2};Dr. Chambonより供与)をポドサイト特異的に発現するマウスを作製する。Doxycyclineにより誘導されるポドサイト特異的Cre過剰発現マウスは報告されているが(Juhila et al. 他4名、*J Am Soc Nephrol* 17: 648-654, 2006)、Cre-ER^{T2}系を用いたものはなく、今後のポドサイト研究においても重要なツールとなることが想定される。

(3) CTGF と腹膜硬化症の関連

申請者は腹膜透析の合併症である腹膜硬化症に、CTGFが細胞外基質産生作用を介して重要な役割を果たしていると考え、マウス腹膜硬化症モデルにおいてCTGFの意義を検討する。

2. 研究の目的

(1) CTGF コンディショナルノックアウトマウスの作製と解析

本研究において、CTGF コンディショナルノックアウトマウス(floxed CTGF マウス)を作

製する。*Ctgf* 遺伝子は5つのエクソンよりなり、開始コドンの12塩基上流にloxP配列を挿入し、stopコドン下流にFRT-neo-FRT-loxP配列を挿入する構造とした。ターゲティングベクターを作製し、C57BL/6由来ES細胞にターゲティングベクターを導入し、相同組換えES細胞の選別を行い、キメラマウスを作製し、F1マウスを得ることとしている。その後FLPマウスと交配しFRT-neo-FRTを欠損させ、floxed CTGFマウスを作製する。

(2) ポドサイトにおけるCTGFの意義の検討

ポドサイト特異的プロモーターであるネフリンもしくはポドシンプロモーターをもちいて、Creリコンビナーゼと変異エストロジェン受容体の融合蛋白Cre-ER^{T2}を過剰発現するマウスを作製する。これらのマウスを用いてポドサイト特異的CTGF欠損マウスの胎生期および成体でのphenotypeの検討を行う。疾患モデルとしては、streptozotocinにより糖尿病を惹起しCTGFをポドサイト特異的に欠損させることで糖尿病性腎症の進展への影響を解析する。*db/db*マウスとも交配し2型糖尿病における検討も行う。

(3) 腎線維化・腹膜硬化症におけるCTGFの役割

尿細管間質の線維化においてもfloxed CTGFマウスを全身性にCreER^{T2}を発現するRosaCreER^{T2}マウスと交配することで、成体後にCTGFを欠損させることが可能であり、一側尿管結紮マウスや5/6腎摘マウスを作製し、尿細管間質線維化に及ぼす影響を解析する。腹膜硬化症におけるCTGFの意義についても遺伝子欠損マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) CTGFコンディショナルノックアウトマウス (floxed CTGFマウス) の作製

コンディショナルノックアウト作製は、開始コドン12塩基上流から終止コドン直後ま

でを欠失させる構造とし、それぞれにloxP配列を挿入することとした。また薬剤耐性遺伝子neoも最終的に欠失させる構造とするため終止コドン直後にFRT-neo-FRT-loxP配列の挿入を行った。C57BL/6由来BAC Clone: RP23-257E12およびRP23-229M24を用いてPCRによりlong arm 6.1 kb、short arm 2.7 kbおよびCTGF遺伝子領域を増幅し、pBSIISKプラスミドにサブクローニングを行い、sequenceを確認しターゲティングベクターの作製が完了した。C57BL/6由来ES細胞にターゲティングベクターを遺伝子導入し、相同組換えES細胞のselectionを行った。キメラマウス、F1ヘテロマウスを作製し、FLPマウスとの交配を行いneo遺伝子を欠失したfloxed alleleをもつマウスを作製し、最終的にhomozygousなfloxed CTGFマウスを作製する。

(2) Tamoxifenによる誘導型ポドサイト特異的CreER^{T2}マウスの作製

Creリコンビナーゼと変異エストロジェン受容体の融合蛋白CreER^{T2}をヒトネフリンもしくはポドシンプロモーターを用いてポドサイト特異的に発現させる。F1マウス誕生の後、ROSA26Rレポーターマウスと交配し、胎生期および成体におけるtamoxifen誘導によるCreリコンビナーゼの作用についての解析を行う。

(3) 成体におけるCTGF欠損マウスの作製

RosaCreER^{T2}マウスとfloxed CTGFマウスを交配することにより、tamoxifenによりCTGFを全身で欠損するマウスが作製できる。成体においてCTGF欠損がどのようなphenotypeにつながるかを検討していく。

(4) 腹膜硬化症におけるCTGFの意義の検討

長期腹膜透析の合併症である腹膜硬化症は、腹膜中皮下線維組織が増加し、その線維化亢進にCTGFが関連している可能性を想定している。マウスにおいてchlorhexidine

gluconate (CG)を週3回注射することで、腹膜硬化症モデルが作製できることが報告されている (Ishii et al. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1262-1266, 2001)。RosaCreER^{T2}マウスと floxed CTGFマウスの交配することで得られる成体でCTGFを欠損させたマウスにCG投与による腹膜硬化症を惹起し、その進展についての検討を行う。

4. 研究成果

(1) CTGF コンディショナルノックアウトマウスの作製

マウス CTGF 遺伝子の開始コドンの 12 塩基上流から終始コドン直後までを欠失させる構造とし、targeting vector 構築、組み換え ES 細胞の作製、キメラマウスを作出し heterozygous floxed CTGF マウスの確認をおこなった。CTGF 遺伝子の欠失効率を検討するために、全身性にタモキシフェン誘導性 Cre リコンビナーゼを発現する RosaCreERT2 マウスとの交配を行い、heterozygous floxed CTGF マウス/RosaCreER^{T2} マウスにおいてタモキシフェン投与により、tail, 肝臓、腎臓より抽出した genomic DNA において、CTGF 遺伝子の欠失が確認できた。また、homozygous floxed CTGF マウスを作出した。

(2) Tamoxifen による誘導型糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 特異的 CreER^{T2} マウスの作成。

Cre リコンビナーゼと変異エストロゲン受容体の融合蛋白 CreER^{T2} をヒトポドシンおよびネフリンプロモーターを用いてポドサイト特異的に発現するマウスを作成した。このマウスと Rosa26R レポーターマウスと交配を行い、6 週齢の double mutant マウスに 4-hydroxytamoxifen を投与したところ、podocyte において beta-galactosidase 陽性となり、podocyte 特異的に誘導型 Cre による

floxed 部位の欠失が確認された。また、妊娠中の母親に 4-hydroxytamoxifen を投与することにより、double mutant の仔に podocyte 特異的に組み換えが認められた。Tamoxifen による誘導型ポドサイト特異的 CreER^{T2} マウスと floxed CTGF マウスとの交配を行っており、double mutant マウスが誕生した。

(3) 腹膜硬化症マウスと CTGF の関連

週に 3 回の CG 投与を 4 週間行った腹膜硬化症マウスにおいて、CTGF mRNA 発現が増加することを確認した。*In situ* hybridization において、中皮下線維組織に CTGF mRNA 発現が増加することを認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage in glomeruli, proximal and distal nephrons. *Kidney Int* 75:285-294, 2009. (査読有)
2. Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Overexpression of connective tissue growth factor worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int* 73:446-455, 2008. (査読有)
3. Nagae T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Tanaka I, Sugawara A,

Kuwahara T, Nakao K. Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. *Kidney Int* 74:70-80, 2008. (査読有)

4. Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Koshikawa M, Yokoi H, Yoshioka T, Ogawa Y, Sugawara A, Nishiyama H, Yamada S, Kuwahara T, Saleem MA, Shiota K, Ogawa O, Miyazato M, Kangawa K, Nakao K. Expression of CCN1 (CYR61) in developing, normal, and diseased human kidney. *Am J Physiol* 293: F1363-F1372, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 横井秀基ら、ネフリンプロモーターによるタモキシフェン誘導性 Cre 過剰発現マウスの解析、第 51 回日本腎臓学会学術総会、2008 年 5 月 30 日、福岡
2. Yokoi H *et al.* Overexpression of connective tissue growth factor (CTGF) in podocytes deteriorates diabetic nephropathy in mice, XLIV Congress of the European Renal Association, 24th June. 2007, Barcelona, Spain.
3. 横井秀基ら、糸球体上皮細胞特異的 CTGF 過剰発現マウスを用いた糖尿病性腎症進展機序の検討、第 50 回日本腎臓学会学術総会、2007 年 5 月 26 日、浜松
4. 横井秀基ら、糖尿病性腎症進展における CTGF の意義 -糸球体上皮細胞特異的トランスジェニックマウスを用いた解析- 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月 24 日、仙台

[その他]
ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)
京都大学・医学研究科・産学官連携助教
研究者番号：90378779

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：