

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2019

課題番号：19K23867

研究課題名（和文）糖尿病性腎症における系球体ポドサイト代謝変化のライブイメージングによる解析

研究課題名（英文）In vivo analysis of glomerular podocyte metabolism in diabetic nephropathy

研究代表者

菅野 雄耶（Sugano, Yuya）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90846982

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は平常時及び病気の状態における系球体ポドサイトの代謝変化のメカニズムを明らかにすることを目的とする。第一歩として細胞培養系に着目した。我々の選んだMDCK細胞は腎臓の表皮細胞の優れたモデルシステムとして知られる。CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を利用して、哺乳類のAjuba関連遺伝子をMDCK細胞においてノックアウトを試みた。関連遺伝子の一つLIMD1を欠損したMDCK細胞株の樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ajuba関連遺伝子は細胞間のイオン透過の調節に不可欠な接着結合に局在することが報告されている。接着結合は腎臓においても決定的な機能を担うことから、樹立された細胞株は腎臓による体液の恒常性の維持を研究する上で有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of the project was to decipher mechanisms underlying metabolic changes in glomerular podocytes in health and disease. To meet this aim, firstly, in vitro cell culture systems were exploited. We chose the MDCK cell as a model system since it is an excellent model for the renal epithelial cells. Utilizing CRISPR/Cas9 genome editing technology, genes encoding mammalian Ajuba family proteins were knocked out in MDCK cells. The stable MDCK line lacking LIMD1 has been successfully established.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎臓

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。

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は糖尿病の三大合併症の一つである。糖尿病患者における高血糖状態は、多くの臓器において細胞の代謝の異常を誘発し、糖尿病性腎症を含む合併症の発症につながる。しかし、代謝がいかに変化しどう病因へと繋がっていくのか不明な点が多い。糖尿病では、過剰な糖の供給がミトコンドリアにおける活性酸素の生成を増加させることによって細胞内シグナルが活性化され、合併症が惹起されると考えられている。しかしながら、ミトコンドリアでの活性酸素の異常生成は、結果であり原因ではない可能性もあり、それを明らかにするには活性酸素だけではなく、細胞の正常な機能に決定的に重要な他の代謝因子も同様に解析する必要がある。細胞代謝をより網羅的に検討できるようになれば、糖尿病性腎症のさらなる理解につながると考えたのが当初の背景である。

2. 研究の目的

活性酸素の異常産生が糖尿病合併症の原因となるという説はまだ確定的ではない。実際、糖尿病を模したモデル動物において、活性酸素の生成は逆に減少しているという報告もある。糖尿病状態の代謝変化に関するこの矛盾した実験報告は、適切な *in vivo* の解析システムがこれまでなかったことに起因する。これまでの多くの研究は、齧歯類から単離されたミトコンドリア、または、高濃度の糖に長い時間曝された培養細胞を用いており、どちらのアプローチも、適切な生理学的状態における *in vivo* での代謝を正確には反映しない。本研究は平常時及び病気の状態における腎臓系球体ポドサイトの代謝変化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

目的達成への第一歩として、実験システムの簡便さから細胞培養系に着目した。細胞培養系で得られる知見は、ゼブラフィッシュやマウス等のモデル生物を使った *in vivo* の研究への足掛かりとなる。本研究で選んだMDCK細胞は腎臓の表皮細胞の優れたモデルシステムとして知られる。そこで、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を利用して、哺乳類のAjuba関連遺伝子をMDCK細胞においてノックアウトを試みた。

4. 研究成果

Ajuba関連遺伝子の一つLIMD1を欠損したMDCK細胞株の樹立に成功した。Ajuba関連遺伝子は細胞間のイオン透過の調節に不可欠な接着結合に局在することが報告されている。いくつかの細胞間接着因子の免疫染色をした結果、LIMD1欠損株において細胞間接着の構造に明らかな表現型は認められなかった。Ajuba及びWtipといった他のファミリー遺伝子が失われたLIMD1の機能を補っている可能性が示唆される。今後、これら遺伝子を共に欠損させたダブル、トリプルノックアウト細胞株の樹立により詳細が明らかにされと考えられる。脊椎動物全てにわたって、異なる細胞間接着因子が、様々な細胞のそれぞれ異なった役割を定義している。また細胞接着装置の一つ、タイト結合は細胞骨格との接続を通して、それぞれの細胞に特有の形、極性の維持にも決定的な役割を担う。さらにタイト結合のリン酸化に始まり核内受容体へと繋がるシグナル伝達は上皮細胞の機能を制御していることが近年報告されている。zona occludens、膜貫通分子occludinsやclaudinsがタイト結合分子として知られ、これらタンパク質の細胞間のバリアとし

ての機能は腎臓の機能に不可欠であり、それら遺伝子における変異が、急性腎障害をはじめいくつかの腎臓病との関連していることがわかっている。樹立された細胞株は腎臓による体液の恒常性の維持を研究する上で有用なツールとなり、接着結合の腎臓における機能の分子レベルでのメカニズムの解明への一助となることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----