

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590947

研究課題名 (和文) 新規糸球体特異的遺伝子の機能解析と糖尿病性腎症への治療応用に関する検討

研究課題名 (英文) Functional analysis of a novel glomerular specific gene and its application in the treatment of diabetic nephropathy.

研究代表者

竹本 稔 (TAKEMOTO MINORU)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60447307

研究成果の概要 (和文)：

我々は糸球体ポドサイト特異的遺伝子として同定した R3h domain containing like (以下 R3h と略す)に着目して研究を行った。R3h 遺伝子ノックアウトマウスを作成した所、ポドサイトの足突起や基底膜に構造変化を来すことを明らかにした。さらに R3h ノックアウトマウスにストレプトゾトシンを投与して糖尿病を惹起させると、野生型に比し尿アルブミン排泄が増加した。R3h 遺伝子がポドサイトの恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

We identified R3h-domain containing like (R3h) as a podocyte-specific transcripts. The R3h knockout mice were created in order to know the function of R3h in vivo. Light microscopic analysis revealed that the R3h null mice had no observable glomerular developmental defects. However, an electron microscopic study revealed thickening of the glomerular basement membrane (GBM) and effacement of the podocyte foot processes. When they are induced diabetes by the injection of streptozotocin, R3h null mice produced more albuminuria and decreased renal functions than the wild type controls. We identified R3h as a novel podocyte's specific gene which might have a role in the development of diabetic glomerular disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：内科、腎臓病学、糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病性腎症のみならず、腎糸球体の生理学的機構や病理学的変化における糸球

体上皮細胞 (以下ポドサイト) の重要性が注目されてきている。そこで我々は大規模な糸球体特異的遺伝子の同定と機能解析といっ

たプロジェクトを推進してきた。このプロジェクトはマイクロビーズ選流法を用いたマウス糸球体の開発 (Am J Pathol. 2002;161:799-805) から始まり、マウス糸球体特異的遺伝子データベースの構築やマウス糸球体特異的 cDNA マイクロアレーの開発、そしてこの2つのプラットフォームを用いて糸球体特異的遺伝子の同定を行い、現在まで凡そ300種類の糸球体特異的遺伝子を同定し、その中で特にポドサイト特異的遺伝子に関して報告すると共にその機能解析を行なっている。(EMBO J. 2006;25:1160-74, J Am Soc Nephrol. 2007;18:689-97, Kidney int: 2007;71: 889-900, Nephron Exp Nephrol. 2007;106:e32-6, J Am Soc Nephrol. 2008 ;19:260-8)。現在我々は、このプロジェクトを通してポドサイト特異的かつ糖尿病状態糸球体で発現上昇する遺伝子である R3hdm1 を同定した。

2. 研究の目的

ポドサイト特異的遺伝子 R3hdm1 遺伝子の機能解析。

3. 研究の方法

R3hdm1 遺伝子のマウス組織における遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。R3hdm1 タンパクの発現様式を検討する目的で抗 R3hdm1 抗体を作成し、ヒト腎組織における発現様式を免疫組織染色法にて検討した。

R3hdm1 の *in vivo* における役割を検討する目的で R3hdm1 ノックアウトマウスを作成すると共に、ストレプトゾトシン (STZ) を投与し、糖尿状態における R3hdm1 の機能解析を行なった。

4. 研究成果

R3hdm1 遺伝子はポドサイトに特異的であり、糖尿病状態において発現亢進する。

最初に R3hdm1 の組織における発現様式を検討した。マウスの脳組織、肺、心臓、肝臓、

脾臓、腎臓等の主要臓器から RNA を抽出し、R3hdm1 遺伝子発現様式を RT-PCR 法を用いて検討した結果、R3hdm1 は腎臓においてのみ発現が観察された。引き続き、R3hdm1 タンパクに特異的な抗体を作成しヒトの腎組織における発現様式を免疫組織染色で検討した結果、R3hdm1 タンパクは糸球体のポドサイトの核周囲に発現していることが明らかとなった (図1)。

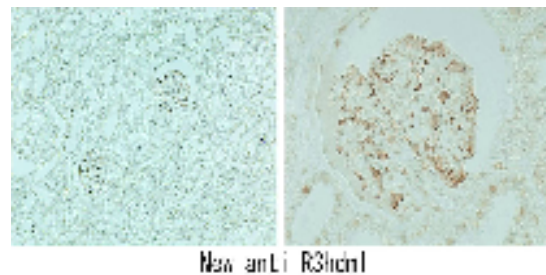


図1 抗 R3hdm1 特異的抗体を用いたヒト腎組織における R3hdm1 タンパクの発現。

さらに糖尿病状態の糸球体における R3hdm1 遺伝子の発現様式を観察する為、

1型糖尿病モデルマウスである Akita マウスより糸球体を採取し、野生型と比較した結果 Akita マウス糸球体では R3hdm1 発現が有意に上昇していた。(図2)

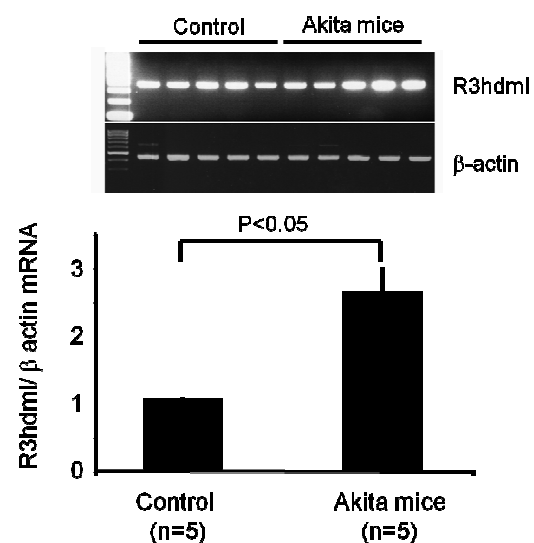


図2 Akita マウスと野生型マウスの糸球体における R3hdm1 遺伝子の発現比較

R3hdm1 遺伝子ノックアウトマウスの作成

このポドサイトに特異的に発現し糖尿病状態において発現が亢進する R3hdm1 という遺伝子は、植物から哺乳類まで保存された遺伝子であるが、その機能に関しては全く不明である。そこで R3hdm1 遺伝子の機能解析目的に、通常のコホモロガスリコンビネーション法を用いてノックアウトマウス (R3hKO) を作成した。R3hKO マウスは R3h ヘテロマウス同士の交配ではメンデルの法則に従って生まれ、その成長過程において野生型と比し差を認めなかった。生後 2 カ月の検討では、体空腹時血糖値、血圧においても野生型と比し差を認めず、BUN、クレアチンを指標に検討した腎機能に関しても異常を認めなかった。組織学的な検討では H&E 染色、PAS 染色を施行するも野生型と R3hKO マウスを区別することができなかった。しかしながら電子顕微鏡下に観察した所、ポドサイトの足突起の癒合や扁平化、糸球体基底膜の肥厚や構造変化、特に内皮細胞側において基底膜の構築変化が生じていた。(図 3)。

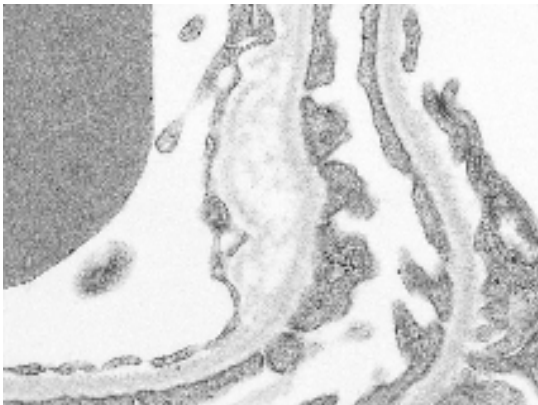


図 3 R3hKO マウス糸球体の構造変化

基底膜の構造変化を認めた為、基底膜構成成分の一つであるフィブロネクチンの発現を RT-PCR 法を用いて検討した所、フィブロネクチン遺伝子の発現亢進を認めた。

定常状態において R3hKO は目立った表現型を

示さなかったため、R3hdm1 ノックアウトマウスに抗糸球体基底膜抗体を投与し炎症を惹起したり、ストレプトゾトシンを投与して糖尿病を惹起させると R3hdm1 ノックアウトマウスでは野生型に比し尿アルブミン排泄が増加した。

R3hKO マウス糸球体の遺伝子プロファイリング

続いて、R3hKO におけるポドサイトや糸球体基底膜の変化が何故生じるのかを検討する目的で R3hKO マウス並びに野生型から糸球体を採取し、Affymetrix 社の Genechip を用いて遺伝子プロファイリングを行った。その結果、R3hKO マウス糸球体では vascular growth factor C (VEGF-C) 遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。VEGF-C はリンパ管の発生に重要な役割を果たすことが知られている増殖因子であり、腎臓においてはポドサイトから分泌されることが報告されていた。しかしながら VEGF-C の変異マウスにおける糸球体の超微細構造に関しては報告がなかったため、フィンランド、ヘルシンキ大学の Kari Alitalo 教授より VEGF-C ヘテロマウス (VEGF-C ノックアウトは胎生致死の為) の腎臓を享受し、解析した所、VEGF-C ヘテロマウスの糸球体では R3hKO で観察されたものと同様の糸球体基底膜の肥厚が観察された。この結果は R3h 遺伝子がポドサイト特異的に VEGF-C の発現調整を介してポドサイトの構造や糸球体基底膜の恒常性の維持に関与している可能性が示唆される。現在、遺伝子プロファイリングによって得られた他の遺伝子についても検討を行っており、この R3hdm1 遺伝子の機能解析を通して糖尿病性腎症をはじめとした腎疾患の発症メカニズムの理解へと繋げてゆきたい。

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 6 件)

- ① The roles of transforming growth factor- β and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Irisuna H, Koshizaka M, Onishi S, Ishikawa T, Mezawa M, He P, Honjo S, Maezawa Y, Saito Y, Yokote K. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、2011 Feb 26.
- ② Differential endothelial transcriptomics identifies semaphorin 3G as a vascular class 3 semaphorin. Kutschera S, Weber H, Weick A, De Smet F, Genove G, Takemoto M, Prahst C, Riedel M, Mikelis C, Baulande S, Champseix C, Kummerer P, Conseiller E, Multon MC, Heroult M, Bicknell R, Carmeliet P, Betsholtz C, Augustin HG. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有、2011;1:151-9.
- ③ Hypoglycemia due to Ectopic Secretion of Insulin-Like Growth Factor-I in a Patient with an Isolated Sarcoidosis of the Spleen. Ogiwara Y, Mori S, Iwama M, Sawabe M, Takemoto M, Kanazawa N, Furuta K, Fukuda I, Kondo Y, Kimbara Y, Tamura Y, Chiba Y, Araki A, Yokote K, Maruyama N and Ito H. *Endocrine Journal*, 査読有、2010; 57:325 -30
- ④ CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. Shimoyama T, Hiraoka S, Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Watanabe A, Fujimoto M, Kawamura K, Sato S, Tsurutani Y, Saito Y, Perbal B, Koseki H and Yokote K. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有、2010;30:675-82.
- ⑤ Glomerular Podocytes Express Type 1 Adenylate Cyclase: Inactivation Results in Susceptibility to Proteinuria. Xiao Z, He L, Takemoto M, Jalanko H, Chan GC, Storm DR, Betsholtz C, Tryggvason K, Patrakka J. *Nephron Exp Nephrol*. 査読有、2010;24:118:e39 -e48
- ⑥ Primary lung cancer associated with Werner syndrome. Ohnishi S, Fujimoto M, Oide T, Nakatani Y, Tsurutani Y, Koshizaka M, Mezawa M, Ishikawa T, Takemoto M, Yokote K. *Geriatr Gerontol Int*. 査読有、2010;10:319-23.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Yokote K. The role of TGF- β /Smad3 signaling in the pathogenesis of obese fat tissue. 46th European association the study of diabetes annual meeting. Stockholm, Sweden, September 2011
- ② 石川崇広、竹本稔、秋元義弘、楊國昌、横手幸太郎「ポドサイト特異的遺伝子 R3hdml の機能に関する検討」第 22 回日本糖尿病性腎症研究会 東京 2010 年 12 月
- ③ 鶴谷悠也、藤本昌紀、竹本稔、横手幸太郎「TGF- β /Smad3 シグナルの肥満脂肪組織における役割について」、『第 31 回日本肥満学会学術集会』、前橋、2010 年 10 月
- ④ 北原綾、野口尚子、藤本昌紀、鶴谷悠也、石川崇広、大西俊一郎、目澤守人、竹本稔、武城英明、横手幸太郎「フォーミュラ食を用いた入院 VLCD 療法前後の運動療法の重要性」第 3 回日本肥満症治療学会学術集会 東京 2010 年 9 月
- ⑤ 鶴谷悠也、藤本昌紀、竹本稔、横手幸太郎「The role of TGF- β /Smad3 signaling in the pathogenesis of obese fat tissue」、『第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会』、岐阜、2010 年 7 月
- ⑥ 石川崇広、竹本稔、藤本昌紀、葛谷雅文、森聖二郎、横手幸太郎 ウェルナー症候群の病態把握、診療指針作成と新規治療法の開発を目的とした全国研究 第 52 回日本老年病医学会学術集会 2010 年 6 月 25 日、神戸。
- ⑦ 鶴谷悠也、藤本昌紀、竹本稔、横手幸太郎「TGF- β /Smad3 シグナルの肥満脂肪組織における役割について」、『第 52 回日本老年病医学会学術集会』、神戸、2010 年 6 月
- ⑧ 鶴谷悠也、藤本昌紀、竹本稔、横手幸太郎「肥満脂肪組織における TGF- β /Smad3 シグナルの役割について。」、『第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会』、岡山、2010 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 稔 (TAKEMOTO MINORU)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：6 0 4 4 7 3 0 7

(2) 研究分担者

横手 幸太郎 (YOKOTE KOUTARO)

千葉大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：2 0 3 1 2 9 4 4

(3) 連携研究者

該当者なし