

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790806

研究課題名(和文) 慢性腎臓病におけるポドサイト・間質病変のCTGFの意義の解明

研究課題名(英文) Role of CTGF on podocytes and tubulointerstitium in chronic kidney disease.

研究代表者 横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90378779

## 研究成果の概要(和文)：

慢性腎臓病におけるCTGFの意義を検討するために、CTGF floxedマウスを作製した。

- ①全身性タモキシフェン誘導型CTGFノックダウンマウスの解析では腎・肝・心においてCTGF発現が80-90%低下しているが、腎・肝・心において組織学的には明かな変化は認められなかった。
- ②糸球体上皮細胞特異的CTGF欠損マウスは組織学的変化を認めず、尿中アルブミンも変化を認めなかった。糖尿病を惹起しても同様であった。

研究成果の概要(英文)：CTGF is a growth factor strongly induced by TGF- $\beta$  and has a profibrotic effects. Neonatal death of CTGF knockout mice by the deformity of the ribs makes the evaluation of the role of CTGF in chronic kidney disease difficult. To solve these problems, we constructed CTGF floxed mice. We generated systemic inducible CTGF knockdown mice and podocyte-specific CTGF knockout mice to investigate the role of CTGF in chronic kidney disease.

## 1. Systemic tamoxifen inducible CTGF knockdown mice.

We crossed RosaCreER<sup>T2</sup> mice, which activate Cre recombinase by the stimulation of tamoxifen, with CTGF floxed mice to generate systemic inducible CTGF knockdown mice. Although expression of CTGF in the kidney, liver and heart of systemic inducible CTGF knockdown mice is reduced by 80-90%, histological examination showed normal phenotype. Gene array were performed to find candidate gene on the CTGF-downstream pathway.

## 2. Diabetic nephropathy in podocyte-specific CTGF knockout mice.

We generated podocyte-specific CTGF knockout mice. Although expression of CTGF mRNA in glomeruli was decreased by 87%, the kidney was normal and urinary albumin excretion was within normal range. Next, we generated type 1 diabetic mice by injection of streptozotocin in podocyte-specific CTGF knockout mice. There is no significant difference between diabetic wild-type mice and diabetic podocyte-specific CTGF knockout mice in urinary albumin excretion and renal histology.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

本研究は慢性腎臓病疾患における CTGF の意義を解明するために誘導型 CTGF ノックアウトマウスを用いて全身性もしくは糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 特異的に CTGF をノックアウトすることで、connective tissue growth factor (CTGF) の慢性腎臓病における意義を検討することを目的としている。

研究代表者は腎疾患において CTGF が TGF- $\beta$  の細胞外基質産生作用を媒介する因子であることを *in vitro* および *in vivo* で報告してきた (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, Yokoi et al. 他 11 名, 1 番目, *J Am Soc Nephrol* 2004)。 *In vivo* においては、線維芽細胞特異的に CTGF アンチセンスオリゴを導入し、CTGF を抑制することで、 $\alpha$ -SMA の発現および腎線維化が軽減することを報告した。これらことから、CTGF は細胞外基質産生に重要な因子であることを明らかにした。また、CTGF は TGF- $\beta$  と協調して、Epithelial mesenchymal transition (EMT) に関与する可能性を報告してきた。

現在、新規透析導入疾患の第一位であり早急な対策が望まれている糖尿病性腎症において、血漿 CTGF が腎不全の危険因子であることが報告されている (Nguyen et al. *Diabetes Care* 31:1177, 2008)。研究代表者は糖尿病性腎症における CTGF の病態生理学的意義を検討するために、ポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウス (CTGF-Tg) を作出し、ストレプトゾトシンにより糖尿病を惹起し、腎症の経過を検討した (Yokoi et al. 他 11 名, 1 番目, *Kidney Int* 2008)。CTGF-Tg は basal レベル

では、野生型と差を認めなかったが、糖尿病 CTGF-Tg マウスは糖尿病野生型マウスと比較して尿中アルブミンが 2.8 倍に亢進した。また著しいメサンギウム基質の増加を認め、この機序として、MMP-2 活性が糖尿病 CTGF-Tg マウスでは低下していることを示した。さらに、ポドサイト数の減少とポドサイト関連蛋白の podocin の減弱を認めた。これらことから、CTGF 過剰状態は糖尿病性腎症を増悪させることが明らかとなった。

研究代表者は CTGF の腎疾患における意義をさらに明らかにするには、CTGF ノックアウトマウスによる解析が望ましいと考えているが、ノックアウトマウスは新生児期に肋骨の変形による呼吸困難にて死亡するため、誘導型 CTGF ノックアウトマウスを作製することとし、CTGF エクソンの両端に loxP を挿入した CTGF floxed マウスを作成した。現在 CTGF floxed マウスは F1 の heterozygous マウスまで誕生しており、今後 Cre 発現マウスとの交配により時期特異的なコンディショナル CTGF ノックアウトマウスの解析を行うことが可能である。誘導型 Cre-loxP システムを使用することとし、tamoxifen による誘導可能な CreER<sup>T2</sup> (変異エストロジェン受容体) システム (Proc Natl Acad Sci USA 94: 14559, 1997) を用いることとしている。CTGF floxed マウスと種々の Cre マウスとの交配を行う予定としている。

## 2. 研究の目的

本研究において、CTGF floxed マウスと全身性に CreER<sup>T2</sup> を発現する RosaCreER<sup>T2</sup> マウス (Artemis) を交配し、成体での CTGF 欠損の意義を観察する。糖尿病モデルマウスを作製し、CTGF を欠損による糖尿病性腎症に

及ぼす影響を検討する。またポドサイトでの CTGF の意義を明らかにするために、ポドサイト特異的 CTGF ノックアウトマウスを作製し、ストレプトゾトシンにより糖尿病性腎症を惹起し、腎症に及ぼす影響を検討することとしている。培養ポドサイトや線維芽細胞に CTGF を添加し、CTGF の細胞外基質産生に及ぼす影響を検討することとしている。

### 3. 研究の方法

#### ①成体における CTGF ノックダウンマウス (systemic inducible CTGF knockdown マウス)の作製

RosaCreER<sup>T2</sup>マウスと CTGF floxed マウスを交配することにより、時期特異的に CTGF を全身で欠損するマウスを作製する。研究代表者は、RosaCreER<sup>T2</sup>マウスとレポーターマウスである Rosa26R マウス (loxP-neo-stop-loxP-LacZ のノックインマウス)と交配すると、腎においてポドサイト、メサンギウム細胞、内皮細胞、尿細管細胞など大部分の細胞で組み換えを起こすことを確認した。

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するために、2週および6週齢で4-hydroxytamoxifen 0.05 mg/gBW の腹腔内投与を3日間連日で2クール行った。7週齢で屠殺し、遺伝子解析および組織学的検討を行った。

#### ②糸球体上皮細胞特異的 CTGF 欠損マウスの作製

ポドサイト特異的プロモーターであるネフリンプロモーターにより Cre recombinase を過剰発現マウス (nephrin-Cre) と CTGF floxed マウスの交配マウスでは、ポドサイト特異的に CTGF を欠損させることが可能であり、蛋白尿や腎機能に及ぼす影響についての検討を行った。また、成体におけるポドサイ

ト特異的 CTGF 欠損の意義についても、組織、蛋白発現、遺伝子発現、蛋白尿などから検討を行った。

#### ③1型糖尿病モデルにおける糸球体上皮細胞特異的 CTGF 欠損マウスおよび誘導型 CTGF ノックダウンマウスの糖尿病性腎症に及ぼす影響

全身性もしくはポドサイト特異的に CTGF を欠損させたマウスに、ストレプトゾトシンを用いて1型糖尿病性腎症を惹起し、病態に及ぼす影響について解析を行う。研究代表者はこれまで、ポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウスに糖尿病を惹起すると、メサンギウム基質の増大や podocin の減弱、MMP-2 活性の低下などを報告してきた。そのことと対比し、コンディショナル CTGF 欠損マウスで、メサンギウム基質の増加の抑制やポドサイト傷害の減弱、MMP-2 活性の変化などが認められるかについて検討を行う予定である。

### 4. 研究成果

#### ①全身性タモキシフェン誘導型 CTGF ノックダウンマウスの解析

タモキシフェンにより全身性に Cre 蛋白の活性化がおこる RosaCreER<sup>T2</sup> マウスと CTGF floxed マウスの交配により得られたマウスに、2週および6週齢で4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 0.05 mg/gBW の腹腔内投与を3日間連日で2クール行った。野生型に4-OHT投与群 (野生型群: +/+ , RosaCreER<sup>T2</sup>/+) , ホモマウスに4-OHT投与群 (ノックダウン群: fx/fx, RosaCreER<sup>T2</sup>) の2群を作製した。7週齢で屠殺し、遺伝子解析および組織学的検討を行った。まず、腎、肝、膵、脾、心、肺の組織より genomic DNA を抽出し、制限酵素 SmaI で切断し、Southern blot を行い、組換えを確認したところ、いずれの組織においてもノックダウン群では90-100%の組換え効率を認めた。次に real-time PCR を用いて、CTGF

mRNA 発現を検討した。腎臓で81%、肝臓で90%、心臓で86%、脾臓で88%、肺で88%の低下を認めた。次に PAS 染色ならびに HE 染色を行い腎・肝・心の形態的变化を観察したところ、組織学的には明かな変化は認められなかった。腎における糸球体上皮細胞、糸球体基底膜、内皮細胞、メサンギウム細胞の検討のため、電子顕微鏡による評価を行ったが、変化は認められなかった。Gene chip を施行し変化の大きい遺伝子に着目し解析を行っている。

#### ②糸球体上皮細胞特異的 CTGF 欠損マウスの解析

糸球体上皮細胞特異的 Cre recombinase 発現マウスと CTGF floxed マウスの交配により、糸球体上皮細胞特異的 CTGF 欠損マウスを作製し解析を行った。糸球体内の CTGF mRNA 発現は 87%減少し、糸球体上皮細胞における CTGF 発現が低下したが、組織学的変化を認めず、尿中アルブミンも変化を認めなかった。電子顕微鏡検査においても、糸球体上皮細胞の形態および糸球体基底膜に変化を認めなかった。

#### ③1型糖尿病モデルにおける糸球体上皮細胞特異的 CTGF 欠損マウスおよび全身性誘導型 CTGF ノックダウンマウスの糖尿病性腎症に及ぼす影響

ストレプトゾトシンを用いて1型糖尿病性腎症を惹起し、病態に及ぼす影響について解析を行った。糖尿病糸球体上皮細胞特異的 CTGF 欠損マウスと糖尿病野生型マウスにおいて、体重、血圧、糖代謝において、両群で差を認めなかった。尿中アルブミン排泄および電子顕微鏡を含む腎組織においては、差を認めなかった。そのため、全身性誘導型 CTGF ノックダウンマウスを用いて、検討を行っている。現在までのところ体重、血圧、糖代謝に関して差を認めていない。腎病変について

は解析を継続中である。

#### 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2件)

1. Kasahara M, Mori K, Satoh N, Kuwabara T, Yokoi H, Shimatsu A, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Reduction in urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin by angiotensin receptor blockers in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 24:2608-2609, 2009 (査読有)
2. Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, Mori K, Kuwahara K, Fujikura J, Arai Y, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. *Nephrol Dial Transplant* 25:2120-2124, 2010 (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, Mori K, Kuwahara T, Fujikura J, Arai Y, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Nakao K. Podocyte-Specific Expression of Tamoxifen-inducible Cre Recombinase in Mice. 国際腎臓病学会 Nexus Symposium 2010, 2010年4月16日、京都
2. Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, Mori K, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Podocyte-Specific Expression of Tamoxifen-inducible Cre Recombinase in Mice. 2010年米国腎臓病学会学術集会、2010年11月19日、デンバー、アメリカ

3. 横井秀基、笠原正登、森 潔、小川喜久、  
栞原孝成、齋藤陽子、今牧博貴、川西智子、  
古賀健一、石井輝、菅原照、向山政志、中  
尾一和。タモキシフェン誘導性糸球体上皮  
細胞特異的 Cre 過剰発現マウスの作成、第  
53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月  
17 日、神戸

[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・特定助教

研究者番号：90378779