様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６年　６月２１日現在

機関番号：８２６１０
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０８２４３

研究課題名（和文）PDK1-FoxOシグナルによる糸球体上皮細胞障害メカニズムの解明

研究課題名（英文）The role of PDK1-FoxO signaling pathway in the development of podocyte injury

研究代表者
伊藤　恵実（Ito, Emi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・臓器障害研究部　研究員

研究者番号：１０８８９４５５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糸球体上皮細胞特異的PDK1コンディショナルノックアウトマウス、ならびにタモキシフェン誘導型Creによる糸球体上皮細胞特異的PDK1コンディショナルノックアウトマウスを作製し糸球体上皮細胞におけるPDK1の役割を検討した。両マウスともに糸球体上皮細胞ではfoot process effacementが観察され、週齢が経過すると糸球体上皮細胞は尿中に脱落した。また、週齢の経過とともにアルブミン尿を呈し、多くの糸球体領域において糸球体硬化病変が観察された。本研究においてPDK1は糸球体上皮細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究成果により糸球体上皮細胞におけるPDK1欠失は糸球体上皮細胞障害や腎機能低下を引き起こすことが示され、PDK1が糸球体上皮細胞の機能維持に重要なシグナル分子であることが明らかとなった。さらなる詳細な検討によりPDK1欠失による糸球体上皮細胞障害の分子機序が解明されれば、糖尿病関連腎臓病の発症・進行予防に有用となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We generated podocyte-specific 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) conditional knockout mice (Pod-PDK1 cKO) and tamoxifen-induced podocyte-specific PDK1 conditional knockout mice (NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO) to investigate the role of PDK1 in podocytes. Podocyte foot process effacement was observed in both Pod-PDK1 cKO and NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO mice, and the podocytes were shed into the urine with age. Both Pod-PDK1 cKO and NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO mice also showed albuminuria and glomerulosclerosis in many glomerular regions with age. In conclusion, this study demonstrated that PDK1 plays an important role in maintaining podocyte function.

研究分野：分析化学

キーワード：糖尿病関連腎臓病

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

日本では末期腎不全から透析導入にいたる症例は年間 4 万人前後で、そのうち約 4 割が糖尿病性腎症による。近年、糖尿病性腎症による透析導入後の生命予後は次第に改善されつつあるものの、平均死亡年齢は約 75 歳であり日本の平均寿命よりも短い。したがって、糖尿病性腎症の成因を分子機序で解明し治療法や予防法を構築することは重要な課題である。

近年、糸球体上皮細胞特異的インスリン受容体（IR）ノックアウトマウスの解析において、糸球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系がろ過バリア機能維持に関与すること、さらに糸球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系障害が糖尿病性腎症発症の一因であることが報告された(Cell Metab. 12:329-340,2010)。なお、インスリンシグナル伝達系には IR をはじめ、インスリン受容体基質、IGF-1 受容体、PI3 キナーゼ（PI3K）と様々なシグナル仲介因子が存在する。これらの因子の膵β細胞特異的ノックアウトマウスの解析によると、インスリンシグナル仲介分子には様々なアイソフォームが存在するものもあり、それらの相互作用によりインスリンシグナル伝達系が複雑に制御されていることが報告されている(Cell 96:329-33,1999; Nat Genet. 31:111-115,2002; Cell Metab. 12;619-632,2010)。一方、インスリンシグナル伝達系分子の一つである 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1（PDK1）は単一遺伝子によりコードされアイソフォームが存在しない分子であるためインスリンシグナル伝達系との関連を評価しやすい。さらに PDK1 は生存・細胞増殖シグナルといった生命活動に必須な因子として生体内で多岐にわたり活性制御を行なっていることが報告されている。例えば膵β細胞特異的 PDK1 欠損マウスによる解析によると、PDK1 欠損により転写因子 FoxO1 が核内に蓄積することで膵島数や膵β細胞数が減少しインスリン抵抗性や高血糖を引き起こすことが報告されている(Nat Genet. 38(5):589-593,2006)。なお、フォークヘッド型転写因子 FoxO は細胞分化、細胞死、酸化ストレス応答などの細胞機能制御に関与することが報告されており、哺乳類の細胞においては FoxO1、FoxO3a、FoxO4 と 3 つのアイソフォームが存在する。生体においては FoxO1 が重要なアイソフォームと考えられ、PI3K 依存的な活性制御や PDK1 の直下にあたる Akt による直接的なリン酸化が報告されているものの(Proc Nat Acad Sci. 101:2975-2980,2004; Cell 117:421-426,2004)、糖尿病性腎症の病態における PDK1-FoxO シグナルの関与は これまで検討されてこなかった。

２．研究の目的

本研究では、糸球体上皮細胞特異的 PDK1 コンディショナルノックアウトマウスを作製し糸球体上皮細胞における PDK1 の役割を検討した。

３．研究の方法

（１）糸球体上皮細胞特異的 PDK1 コンディショナルノックアウトマウスの作製

NPHS2-Cre トランスジェニックマウスと PDK1-flox マウスとを交配し、糸球体上皮細胞特異的 PDK1 コンディショナルノックアウトマウス（Pod-PDK1 cKO）を作製した。Pod-PDK1 cKO マウスの表現型解析では 3 週齢時に尿中アルブミン・クレアチニン比（ACR)、BUN、血清クレアチニンを測定した。また、3 週齢時に腎臓を摘出し腎組織変化を病理学的に解析した。

（２）タモキシフェン誘導型 Cre による糸球体上皮細胞特異的 PDK1 コンディショナルノックアウトマウスの作製

タモキシフェン誘導型 Cre による糸球体上皮細胞特異的 PDK1 コンディショナルノックアウトマウス（NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO）の作製は、糸球体上皮細胞特異的にタモキシフェン誘導型 Cre を発現する NPHS2-CreERT2 トランスジェニックマウスを PDK1-flox マウスと交配し作製した。NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO の表現型解析ではタモキシフェン誘導後 24 週目に尿中アルブミン・クレアチニン比、BUN、血清クレアチニンを測定し、併せて腎組織障害の評価を行った。

４．研究成果

（１）Pod-PDK1 cKO マウスの表現型解析

Pod-PDK1　cKO は生後 3 週齢頃よりアルブミン尿を呈し 5 週齢前後で全例死亡した（図１）。なお、3 週齢 Pod-PDK1　cKO の BUN、血清クレアチニン、K 値は対照群に比べ有意に高いこと、4 週齢 Pod-PDK1 cKO では腹水の貯留を認めたことから Pod-PDK1　cKO の死因は腎機能低下によるものと考えられた。

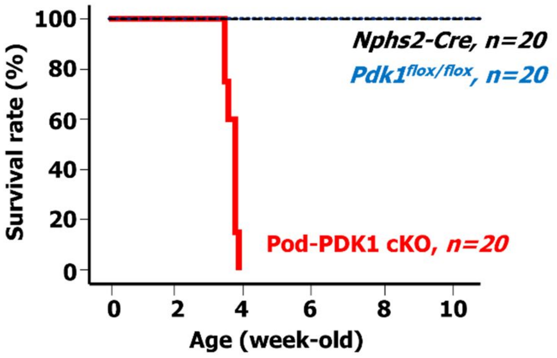

図1. Pod-PDK1 cKOマウス、および対照マウス（*Nphs2-Cre, Pdk1$^{flox/flox}$*）の生存期間解析

3 週齢 Pod-PDK1　cKO の腎組織学的解析で

は多くの糸球体領域で糸球体硬化病変が観察され、さらに間質領域では尿円柱を細胞内に含む尿細管や集合管が多数観察された（図２）。糸球体上皮細胞マーカーであるWT1を用いてPod-PDK1 cKOにおける糸球体上皮細胞の局在を免疫組織化学染色にて検討したところ、Pod-PDK1 cKOの１糸球体領域あたりの平均WT1陽性細胞数は対照マウスに比べて有意に少なかった。一方、Pod-PDK1 cKO、対照マウスのそれぞれから尿沈渣を調製し WT1 の発現をウエスタンブロット法にて検討したところ、Pod-PDK1 cKOの尿沈渣中にのみWT1の発現を認めた。これらの結果から、Pod-PDK1 cKO の糸球体上皮細胞は週齢の経過に伴い尿中に脱落することが推測された。

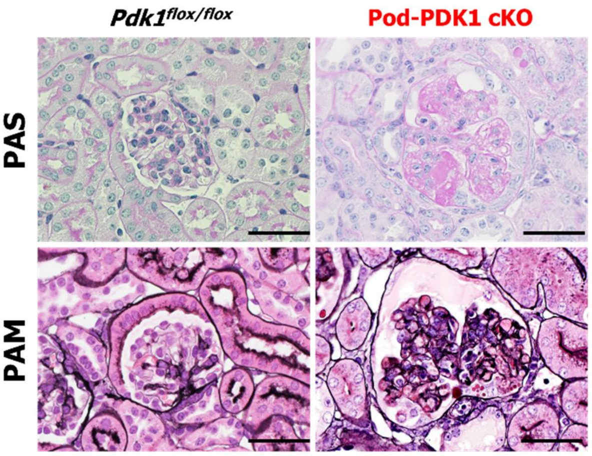

図2. Pod-PDK1 cKOマウス、および対照マウス（*Pdk1*$^{flox/flox}$）の腎組織像

次にPod-PDK1 cKOの糸球体上皮細胞機能異常にFoxO1が関与していることを想定し、糸球体上皮細胞におけるFoxO１の発現を検討した。対照マウスの糸球体領域内では FoxO1 の発現はほとんど観察されないのに対し、Pod-PDK1 cKOの糸球体領域内では糸球体上皮細胞のマーカーであるsynaptopodinで囲まれる細胞の一部においてFoxO1の発現が観察された。そこで糸球体上皮細胞特異的にPDK1とFoxO１を欠損するコンディショナルダブルノックアウトマウス（Pod-PDK1/FoxO1 cDKO）を作製し、PDK1欠失により引き起こされた糸球体状細胞機能異常が FoxO1 の欠失により改善するかを検討した。Pod-PDK1/FoxO1 cDKOのACR、BUN値はPod-PDK1 cKOに比べて低値傾向を示したものの対照マウスに比べ有意に高い値を示した。また、Pod-PDK1/FoxO1 cDKOの生存期間もPod-PDK1 cKOに比べて１～２週間ほど延びたものの、Pod-PDK1/FoxO1 cDKOは腎機能低下により全例死亡した。したがってFoxO1はPDK1欠失により引き起こされた糸球体上皮細胞の機能異常に一部関与しているものの、FoxO1以外の因子もこの病態に関与していると考えられた。

（２）NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO マウスの表現型解析

NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKOの表現型解析を行うにあたり、効率的な遺伝子欠失誘導方法を検討した。まず糸球体上皮細胞特異的にタモキシフェン誘導型Creを発現するNPHS2-CreERT2トランスジェニックマウスと CAG-floxSTOP-EGFP トランスジェニックマウスを交配し、タモキシフェン誘導型 Cre により糸球体上皮細胞特異的に EGFP を発現するレポーターマウス（NPHS2-CreERT2/Pod-EGFP Rep）を作製した。その後、10週齢、あるいは20週齢時にタモキシフェンを投与し糸球体上皮細胞におけるEGFP陽性率を解析した。タモキシフェン投与ではコーンオイルに溶かして0（コーンオイルのみ）、75, 100、150 mg/kg body weightの投与量で4群に分けて1、3、あるいは 5 日間連続で投与した。タモキシフェン非投与群ではWT-1陽性細胞におけるEGFP発現は確認されない一方で、タモキシフェン投与群ではWT-1陽性細胞のうち最大で約70%の細胞でEGFP発現が観察された。

NPHS2-CreERT2/Pod-EGFP RepマウスにてタモキシフェンPod誘導性にCre-loxPシステムが正常に作動することが確認できたため、次に NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO の表現型解析を行った。NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKOマウスに対してタモキシフェン誘導を行い、4週ごとに24週間後までACRを経時的に測定した。対照にはNPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKOマウスに対してコーンオイルのみを投与したマウスを用いた。対照マウスではコーンオイル投与 24 週後までに顕著な異常が観察されなかったのに対し、NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKOマウスではタモキシフェン投与8週後よりアルブミン尿が観察された。また、ACRはタモキシフェン投与8週後から24週後にかけて持続的に上昇した。タモキシフェン投与 24 週後に行った NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKOマウスの腎組織病理学的解析では多くの糸球体領域で糸球体硬化病変が観察された（図３）。さらに ACR の高いNPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKOマウスでは間質領域の線維化や蛋白円柱の形成も観察された。透過電子顕微鏡による観察では糸球体上皮細胞における foot process effacement や糸球体基底膜肥厚が認められ、一部の糸球体内皮細胞ではfenestraの消失が認められた。これらの解析結果よりタモキシフェンを投与した NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO マウスで

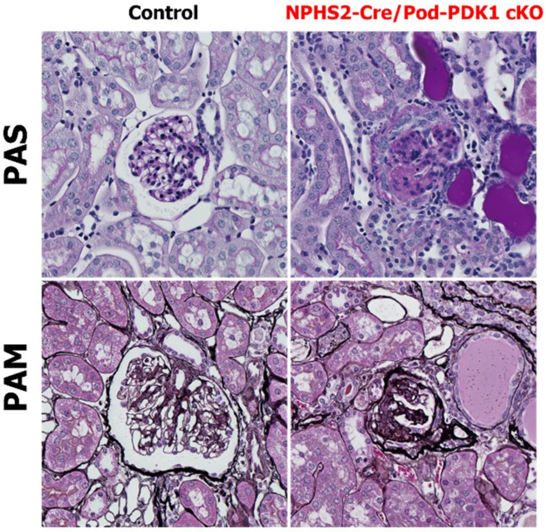

図3. Pod-PDK1 cKOマウス、および対照マウス（Control）の腎組織像

は週齢の経過に伴い腎機能が低下していることが推測されたが、糸球体上皮細胞における PDK1 欠失の作用と腎機能への影響を解明するためには引き続き詳細な解析を行う必要があると考えている。

Pod-PDK1 cKO マウスと同様に NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO マウスでも PDK1 欠失による糸球体上皮細胞機能異常が観察されたため、NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO マウスから培養糸球体上皮細胞を調製し、その分子機序を検討することにした。まず、調製する培養糸球体上皮細胞の純度をモニタリングする目的で NPHS2-CreERT2/Pod-EGFP Rep マウスを用いた検討を行った。10 週齢 NPHS2-CreERT2/Pod-EGFP Rep マウスに磁気ビーズを還流することにより腎糸球体を単離し、さらに単離腎糸球体を培養することで explant 法により培養糸球体上皮細胞を調製した。その後、培養糸球体上皮細胞に 4-OH-タモキシフェンを添加し全培養細胞中の EGFP 陽性率を評価したところ、EGFP 陽性率は最大で全培養細胞中の 10%以下と極めて低い結果となった。培養液への 4-OH-タモキシフェン添加量、暴露時間、4-OH-タモキシフェン添加後の解析タイミングなど複数の条件を設定し EGFP 陽性率を高めるための検討を行ったものの、タモキシフェン誘導性を高める条件下では死細胞が増えてしまい EGFP 陽性率をさらに上げることは出来なかった。そのため、NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO マウスの糸球体上皮細胞を用いて PDK1 欠失の影響を検討するためには、NPHS2-CreERT2/Pod-PDK1 cKO マウスに対してタモキシフェン誘導を行った後にフローサイトメトリーにより糸球体上皮細胞を単離し解析するなど、別の解析方法を構築し検討する必要があると判断した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Matsukawa T,Yagi T,Uchida T,Sakai M,Mitsushima M,Naganuma T,Yano H,Inaba Y,Inoue H,Yanagida K,Uematsu M,Nakao K,Nakao H,Aiba A,Nagashima Y,Kubota T,Kubota N,Izumida Y,Yahagi N,Unoki-Kubota H,Kaburagi Y,Asahara S,Kido Y,Shindou H,Itoh M,Ogawa Y,Minami S,Terauchi Y,Tobe K,Ueki K,Kasuga M,Matsumoto M	４．巻 8
２．論文標題 Hepatic FASN deficiency differentially affects nonalcoholic fatty liver disease and diabetes in mouse obesity models	５．発行年 2023年
３．雑誌名 JCI Insight	６．最初と最後の頁 e161282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.161282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Hirano Daishi、Unoki‐Kubota Hiroyuki、Imasawa Toshiyuki、Yamamoto‐Honda Ritsuko、Kajio Hiroshi、Yamashita Shigeo、Fukazawa Yuka、Seki Naoto、Noda Mitsuhiko、Kaburagi Yasushi	４．巻 14
２．論文標題 Independent risk factors of rapid glomerular filtration rate decline in patients with type?2 diabetes with preserved kidney function and normoalbuminuria: A multicenter cohort study	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	６．最初と最後の頁 874～882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.14011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Ishikane Masahiro、Unoki-Kubota Hiroyuki、Moriya Ataru、Kutsuna Satoshi、Ando Honami、Kaburagi Yasushi、Suzuki Tetsuya、Iwamoto Noriko、Kimura Moto、Ohmagari Norio	４．巻 28
２．論文標題 Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 panel, a rapid multiplex PCR method for the diagnosis of COVID-19	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	６．最初と最後の頁 729～734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2022.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 Hiroyuki Unoki-Kubota, Daishi Hirano, Toshiyuki Imasawa, Ritsuko Yamamoto-Honda, Hiroshi Kajio, Shigeo Yamashita, Yuka Fukazawa, Naoto Seki, Mitsuhiko Noda, Yasushi Kaburagi
２．発表標題 Independent risk factors of rapid renal function decline in patients with type 2 diabetes with preserved kidney function
３．学会等名 International Diabetes Federation Western Pacific Congress 2023 / 15th Asian Association for the Study of Diabetes Scientific Meeting（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 Toshiyuki Imasawa, Hiroyuki Unoki-Kubota, Daishi Hirano, Hiroshi Kitamura, Yasushi Kaburagi
２．発表標題 EXPLORATION OF PROGNOSTIC FACTORS IN DIABETIC NEPHROPATHY WITH NODULAR LESION USING TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF HUMAN KIDNEY TISSUES
３．学会等名 60th European Renal Association Congress European Renal Association（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 M. Ishikane, Hiroyuki Unoki-Kubota, Ataru Moriya, Honami Ando, Yasushi Kaburagi, Noriko Iwamoto, Moto Kimura, Norio Ohmagari
２．発表標題 Evaluation of artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit for SARS-CoV-2 Detection, a rapid direct PCR method for the diagnosis of COVID-19
３．学会等名 33rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 久保田浩之，伊藤恵実，平野大志，今澤俊之，梶尾裕，山下滋雄，深澤由香，関直人，鏑木康志
２．発表標題 2型糖尿病患者における推算糸球体濾過量（eGFR）漸減関連因子の探索
３．学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
４．発表年 2022年

１．発表者名 久保田浩之，岩田和希子，加藤秀樹，松本道宏，南学正臣，春日雅人，鏑木康志
２．発表標題 Phosphoinositide-dependent kinase-1 の糸球体上皮細胞における役割の検討
３．学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター 研究所 糖尿病研究センター 臓器障害研究部 http://www.ncgm-dmcomp.umin.jp/index.html

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
研究分担者	鏑木　康志 (Kaburagi Yasushi) (40342927)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・臓器障害研究部長 (82610)	
研究分担者	久保田　浩之（卯木浩之） (Kubota Hiroyuki) (40323290)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長 (82610)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関