

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790930

研究課題名（和文） TGF-β1による糸球体上皮細胞障害とWT1の発現制御について

研究課題名（英文） Effect of TGF-β on WT1 expression in podocyte.

## 研究代表者

坂入 徹 (SAKAIRI TORU)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：20455976

## 研究成果の概要（和文）：

TGF-β1は糖尿病性腎症および巣状糸球体硬化症の進行に寄与していると考えられている。また、転写因子 Wilms tumor suppressor gene (WT1)は、正常糸球体上皮細胞の正常機能維持に必要なことが知られている。我々は、TGF-β1が、培養ヒト糸球体上皮細胞、及び、マウス腎の糸球体上皮細胞におけるWT1の発現を減少させることを発見した。培養ヒト糸球体上皮細胞を用いた研究により、1) TGF-β1は、部分的にはSmad4を介してWT1を減弱させること、2) TGF-β1は、WT1プロモーターのメチル化を促進すること、を見出した。TGF-β1が、これら複数の機序を介してWT1の発現を減弱させることにより、糸球体上皮細胞障害を引き起こすことが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

TGF-β1 is involved in diabetes nephropathy and focal segmental glomerulonephritis. Transcriptional factor Wilms tumor suppressor gene (WT1) is essential for normal function of podocytes. We found that TGF-β1 reduces WT1 expression in both cultured human podocytes and mouse podocytes. Using the cultured podocytes, we identified following mechanisms by which TGF-β1 suppress WT1 expression. First, Smad4 mediates a decrease in WT1 expression by TGF-β1. Second, TGF-β1 caused DNA methylation in promoter region of the podocytes. Our results indicate that diverse pathways contribute to the TGF-β1-induced WT1 reduction that may result in podocyte injury.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：腎臓病学

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：糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、糸球体上皮細胞、TGF-β1、WT1

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症および巣状糸球体硬化症は、どちらも末期腎不全へ至る進行性腎機能障害の代表的な原因疾患である。特に糖尿病性腎症は、わが国において、透析療法が必要な末期腎不全の原因疾患の約43%を占め（日本腎臓学会、CKD診療ガイド）、多くの患者の日

常生活を害する上に、治療に伴う医療費の増加は大きな社会問題である。アンギオテンシン受容体拮抗薬やACE阻害薬による進行抑制が知られているが、その効果は限定的であり、疾患の病態解明と治療法の確立が急務である。

TGF-β1は、糖尿病性腎症および巣状

糸球体硬化症患者の糸球体糸球体上皮細胞で発現が増強していることが報告されている(Kidney Int 2003;64(5):1715-21. Kidney Int 1997;51(5):1568-77. J Nephrol 2006;19(6):751-7.). また、Alubuminプロモーター依存性に TGF-beta1 を発現する、Alb/TGF-beta1 トランスジェニックマウスは、高 TGF-beta1 血症に伴い、進行性びまん性糸球体硬化症を呈する(Lab Invest 1996;74(6):991-1003.). TGF-beta による糸球体上皮細胞障害の機序として、アポトーシス(J Clin Invest 2001;108(6):807-16.)、上皮間葉転換(Am J Pathol 2008;172(2):299-308.)、ミトコンドリア機能障害などが挙げられる。TGF-beta による糸球体上皮細胞障害は、糖尿病性腎症および巣状糸球体硬化症の病態に関与していると考えられ、その機序を解明することは意義がある。

Wilms tumor protein (WT1) 遺伝子は、腎悪性腫瘍である Wilms tumor の責任遺伝子として 11p13 に同定された。転写因子 WT1 は全発生期を通じて腎の様々な細胞に発現するが、成熟した腎では糸球体上皮細胞に限局して発現する。WT1 の zinc finger domain をコードする exon 8 の変異により、びまん性メサンギウム硬化症を特徴とする Denys-Drash syndrome を(Pediatr Nephrol 2006;21(11):1653-60.)、また、donor splice site である intron 9 の変異により、KTS+ splice variant の減少をきたし、仮性半陰陽と巣状糸球体硬化症を特徴とする Frasier 症候群を起こす(Pediatr Nephrol 2006;21(11):1653-60. Hum Mutat 1997;9(3):209-25.)。さらに、11p13 の、WT1 と PAX6 を含む領域の欠損により、WAGR 症候群を発症することが知られ、低頻度ながら巣状糸球体硬化症の合併が報告されている(Hum Mutat 1997;9(3):209-25. Pediatrics 2005;116(4):984-8.)。また、WT1 欠損マウスは腎形成障害を示し胎生致死であること(Development 1999;126(9):1845-57)、WT1 を低発現させたマウスにおいては、びまん性メサンギウム硬化症を呈することが報告されている(Hum Mol Genet 2002;11(6):651-9.)。WT1 が糸球体上皮細胞の正常機能維持に不可欠であることは、これらの知見より明確であるが、糸球体上皮細胞における WT1 の発現制御機構についての報告は限られている。我々は、これまでに、1) TGF-beta1 で刺激したヒト培養糸球体上皮細胞において、WT1 mRNA の発現が 3 時間後より、また、WT1 蛋白の発現が 24 時間後より有意に減少する(図 1, 2)。

2) Alb/TGF-beta1 トランスジェニックマウスの糸球体上皮細胞において、糸球体硬化症を発症する以前の生後 1 週より WT1 蛋白の発現が低下し始める、ことを証明してきた。

## 2. 研究の目的

まず、TGF-beta1 の、糸球体上皮細胞における WT1 発現低下作用の機序を解明することである。

## 3. 研究の方法

### 1) TGF-beta1 による WT1 発現減少のメカニズムの解析- Smad シグナルと転写因子 SNAIL の関与について

TGF-beta 受容体による R-Smad のリン酸化および R-Smad/Co-Smad 複合体の核内への移行は、TGF-beta シグナリングの主要経路である(Biochem Cell Biol 2002;80(5):605-22, Curr Opin Genet Dev 2002;12(1):22-9.)。本研究では、Smad シグナリングの TGF-beta による WT1 減少への関与の有無を明らかにする。そのために、レンチウイルスベクターを用い、Co-Smad である Smad4 に対する ShRNA を細胞に導入し、Smad4 をノックダウンし、R-Smad/Co-Smad 経路を遮断することで、TGF-beta1 による WT1 の発現減少が相殺されるかどうか解析する。また、転写因子の SNAIL は、TGF-beta による上皮間葉転換に関与していることが知られている(Nat Rev Cancer 2007;7(6):415-28.)。SNAIL が TGF-beta による WT1 減少に介在しているか解析するために、SNAIL に対する ShRNA を導入し、ノックダウンすることにより、TGF-beta による WT1 減少がレスキューされるかを調べる。更に、これらの結果で、Smad4 あるいは、SNAIL の関与が示唆された場合、ルシフェラーゼベクターを用いた WT1 プロモーターあるいは WT1 エンハンサーのレポーターアッセイを行い、Smad4 あるいは SNAIL が WT1 のプロモーターやエンハンサーに作用するかどうか明らかにする(WT1 プロモーターあるいはエンハンサーには、R-Smad/Co-Smad 複合体が結合し得る Smad binding element、およびは SNAIL が結合し得る E-box element の候補が存在する)。

### 2) TGF-beta1 による WT1 発現減少のメカニズムの解析-DNA のメチル化の関与について

TGF-beta1 による WT1 のエピジェネティックな制御の可能性について、培養細胞を用いて解析していく。まず、DNA のメチル化が、TGF-beta1 による WT 発現抑制に関与しているかどうかを調べるため、メチル化阻害薬を培養細胞に作用させ、TGF-beta1 による WT1 の発現抑制が回復するかどうかを確認する。次に、TGF-beta1 が、糸球体上皮細胞における

WT1 のプロモーター領域をメチル化するかどうかを調べるため、TGF-beta1 を作用させた細胞から抽出した DNA を bisulfate 処理した後、WT1 のプロモーター領域について、メチル化特異的あるいは非メチル化特異的定量的 PCR を行う。また、bisulfate 処理した DNA をクローニングベクターに導入し、複数のクローンについてプロモーター領域のシーケンシングを行い、それぞれの CG 配列についてメチル化の頻度を測定する。さらに、上記の結果、TGF-beta1 によるメチル化が強く疑われる領域について、定量的シーケンシング法である pyrosequencing を行い、同領域のメチル化を確認する。

#### 4. 研究成果

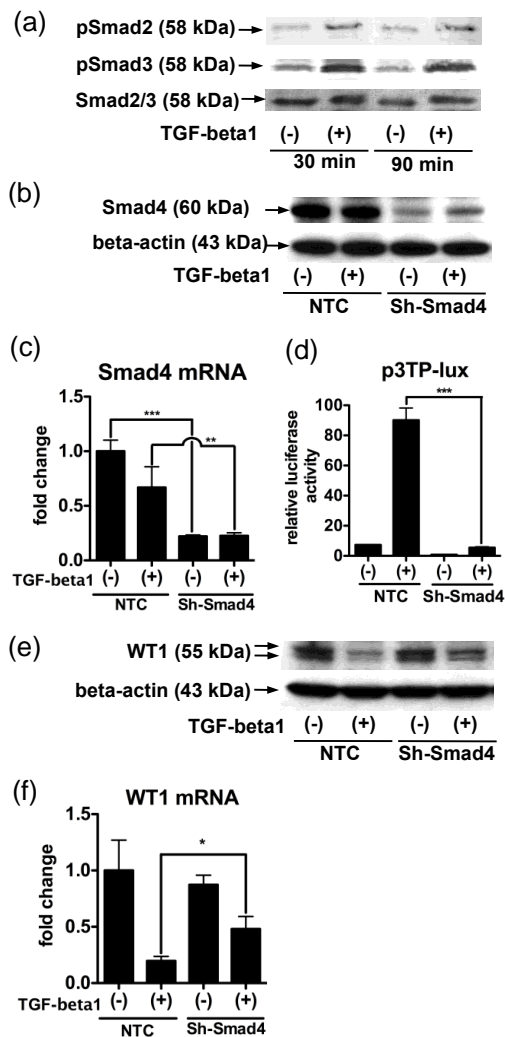


Figure 1 \*\*

#### 1) TGF-beta1によるWT1発現減少のメカニズムの解析- Smadシグナルと転写因子SNAILの関与について

まず、培養糸球体上皮細胞に、5 ng/ml の TGF-beta1 を作用させたところ、予想どおり、Smad2/3 のリン酸化が促進された (figure

1a). 次に、培養糸球体上皮細胞にレンチウイルスを用いて Samd4 の shRNA を導入し、Smad4 の蛋白 (figure 1b), mRNA (figure 1c), および、Smad binding element のレポーターアッセイで測定した、Smad の転写活性 (figure 1d) が抑制されることを確認した。続いて、Smad4 をノックダウンした細胞に、TGF-beta1 を作用させたところ、Smad4 をノックダウンしていない細胞 (NTC) で、以前、我々が確認したとおり、WT1 の発現が低下したが、Smad4 をノックダウンした細胞では、WT1 の発現が部分的にレスキューされることを蛋白レベル (figure 1e) および、mRNA レベル (figure 1f) で確認した。以上の結果より、TGF-beta1 の WT1 発現低下作用は、少なくとも部分的には、Smad4 が仲介していると考えられた。

続いて、TGF-beta1 の下流で誘導されることが報告されている転写因子 SNAIL の、WT1 発現調節への関与の有無を解析した。まず、TGF-beta1 を作用させた糸球体上皮細胞において、SNAIL mRNA (figure 2a) および SNAIL 蛋白 (figure 2b) がともに増加することを確認した。また、SNAIL の mRNA は、shRNA で Smad4 をノックダウンした細胞では、TGF-beta1 による増加が部分的に抑制されたことから (figure 2c), SNAIL の発現増強は部分的には Smad4 に依存していると考えられた。次に、SNAIL が WT1 発現を制御しているかどうかを調べるため、エストロゲン受容体を付加した SNAIL を、レトロウイルスベクターを用いて細胞に恒常的に発現させた (figure 2d)。

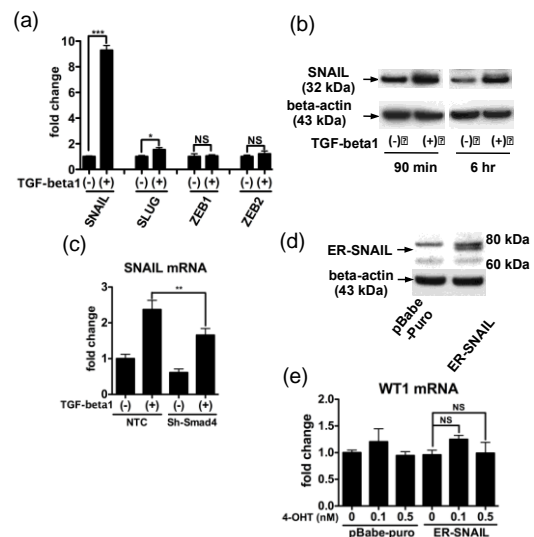


Figure 2 \*\*

その細胞に、エストロゲン受容体のリガンドである 4-OHT を作用させ、SNAIL とともに核内に移行させ、WT1 の発現を mRNA で解析した (figure 2e)。WT1 の発現は 4-OHT の付加前後で変化がなかったことから、SNAIL は WT1 の発現を制御していないと考えられた。

TGF-beta1 による WT1 発現制御について更に詳しく調べるため、WT1 の promoter と、5' エンハンサーそれぞれのレポーターベクターを糸球体上皮細胞にトランスフェクションし、TGF-beta1 を作用させてそのレポーター活性を調べた。figure 3 に示したとおり、TGF-beta1 は、WT1 promoter のレポーター活性を低下させなかったが、WT1 5' エンハンサーのレポーター活性を減弱させた。以上より、TGF-beta1 が WT1 の発現を減少させる機序のひとつとして、5' エンハンサーの活性を減弱させることが示唆された。

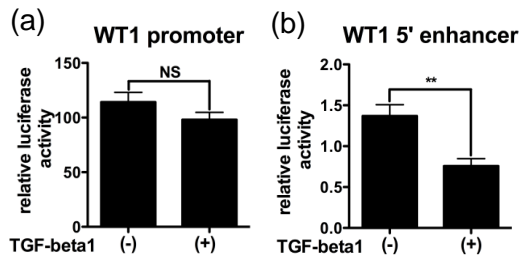


Figure 3 \*\*

2) TGF-beta1 による WT1 発現減少のメカニズムの解析-DNA のメチル化の関与について。

TGF-beta1 の、糸球体上皮細胞における WT1 減少作用において、WT1 promoter のメチル化が関与しているかどうかを解析した。まず、TGF-beta1 とメチルトランスフェラーゼ阻害薬の 5-AZA を同時に作用させると、TGF-beta1 単独の場合に比べ、WT1 蛋白および mRNA の発現が保持された。TGF-beta1 の WT1 減弱作用にメチル化が関与することが示唆された (figure 4)。

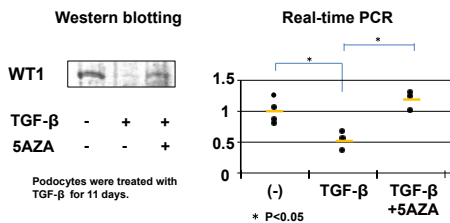


Figure 4 \*\*

次に、WT1 のプロモーター領域が、TGF-beta1 によって、実際にメチル化されるかどうかを調べた。Figure 5a に示すとおり、WT1 プロモーター領域には 19ヶ所の CG 配列がある。このうち 5 番目の CG を含む配列と、17-19 番目の CG を含む配列に、それぞれメチル化特異的および非メチル化特異的プライマーを作成し、bisulfite 処理した DNA を用いて定量的 PCR を施行し、メチル化の割合を測定した (figure 5b)。TGF-beta1 を作用させた糸球体上皮細胞では、同部位のメチル化の割合が上昇する傾向がみられた (有意差は

なかった)。次に、bisulfite 処理した DNA について、figure 5a で示した全領域の配列を同定し、メチル化の有無を調べた (figure 5c)。TGF-beta1 を作用させない細胞では、解析された DNA クローン全てにおいて、1ヶ所のメチル化も認められなかったが、TGF-beta1 を作用させた細胞においては、6, 9, 10, 11, 14 番目の CG において、10 個中、1-2 個のクローンでメチル化が観察された。最後に、figure 5a で示された領域に含まれる 10 から 13 番目の CG 配列について、定量的配列同定法である、pyrosequencing を施行した (figure 5d)。TGF-beta1 を作用させた糸球体上皮細胞において、10 番目の CG 配列で有意なメチル化の増加がみられた。しかし、11 番目から 13 番目の CG 配列では有意なメチル化はみられなかった。以上より、TGF-beta1 の、糸球体上皮細胞における WT1 低下作用の機序の一部として、WT1 プロモーターの DNA メチル化の関与が示唆された。

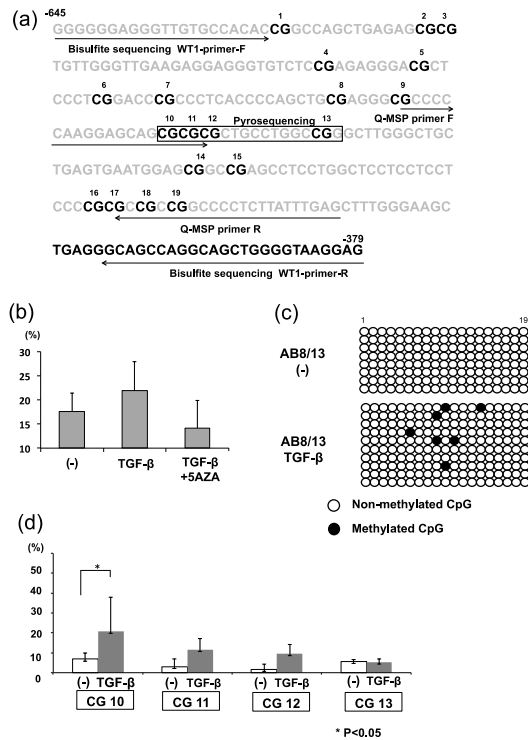


Figure 5

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Sakairi T, Abe Y, Kopp JB. TGF-beta1 reduces Wilms' tumor suppressor gene expression in podocytes. Nephrol Dial Transplant. 2011 Sep;26 (9):2746-52. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

1) Sakairi T, Abe Y, Hiromura K, Takahashi S, Hamatani H, Nojima Y, and Kopp JB. miR-143 contributes to podocyte injury induced by TGF-beta1. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, USA, 2011

2) Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahashi S, Ikeuchi H, Maeshima A, and Nojima Y. Transforming Growth Factor (TGF)-beta1 Induced DNA Methylation of Wilms' Tumor Suppressor Gene (WT1) Promoter in Human Podocytes. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, USA, 2011

3) Sakairi T, Abe Y, and Kopp JB. TGF-beta reduces Wilms tumor 1 expression in podocytes *in vitro and in vivo*. The 43th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Denver, USA, 2010

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

群馬大学生体統御内科学ホームページ：  
<https://sites.google.com/a/gunma-u.ac.jp/mcs/stuff>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂入 徹 (SAKAIRI TORU)  
群馬大学・医学部・助教  
研究者番号：20455976

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし