

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591202

研究課題名(和文)慢性腎臓病系球体硬化におけるメサンギウム細胞での細胞伝達経路の解析

研究課題名(英文)Role of cell signaling pathway in mesangial cells in the progression of chronic kidney disease

研究代表者

長井 幸二郎(NAGAI, Kojiro)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：40542048

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):慢性腎臓病にて病変形成に大きく関わるメサンギウム細胞における細胞伝達経路の機能について、新しいメサンギウム細胞特異的に遺伝子をノックアウトできるシステムを使って検討した。Foxd1-Creマウス、タモキシフェン誘導型Foxd1-Creマウスを使用し、TSC1 floxed マウスと掛け合わせることで、メサンギウム細胞でTSC1をノックアウトし、TSC1が抑制しているmammalian target of rapamycin(mTOR)以下の経路を活性化させることにより細胞外基質の増加をみとめ、in vivoにてはじめてメサンギウム細胞における細胞伝達経路の活性化で病変が起こることを示した。

研究成果の概要(英文):Mesangial cells have been suggested to be related to the progression of chronic kidney disease in vitro. Therefore, an analysis of the role of mesangial cells by using a new site-specific gene knockout system was performed. Foxd1-Cre or tamoxifen induced Foxd1-Cre mice were mated with TSC1 floxed mice. Knockout of TSC1 caused mammalian target of rapamycin(mTOR) pathway activation in mesangial cells. Then, extracellular matrix in mesangial cells increased. It is the first finding which proves that mesangial-specific cell signal pathway activation can induce chronic kidney disease in vivo.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 細胞伝達経路 メサンギウム細胞

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体は細動脈とそれを取りまく血管内皮細胞、血管上皮細胞、メサンギウム細胞で構成され、複雑な環境にある。これまで、糸球体の中で血管上皮細胞特異的(Podocin-Cre マウス、Nephrin-Cre マウスなど)や血管内皮細胞特異的(Tie2-Cre マウスなど)Cre recombinase 発現マウスは存在したが、メサンギウム細胞特異的なものは存在しなかった。その中で Foxd1-Cre マウス(Am J Pathol. 2010;176:85-97)が報告され、Cre recombinase を糸球体では、メサンギウム細胞に発現することが明らかになった。よってこのマウスを用いて in vivo で糸球体メサンギウム細胞におけるタンパクの機能を解析することが初めて可能となった。

糸球体硬化、腎機能退廃に至る慢性腎臓病として、糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎が2大主要疾患であるが、申請者はすでに糖尿病性腎症において、その発症に mammalian target of rapamycin(mTOR) 経路がメサンギウム細胞肥大を介して関与することを明らかにした(Kidney Int. 2005 68:552-61)。しかし、糖尿病性腎症の発症後、進展増悪して糸球体硬化にまで mTOR 経路が関わるかどうか、また腎炎における mTOR 経路の役割は不明である。そこで予備実験として、ヒトの腎生検組織において mTOR 経路の surrogate marker であるリン酸化 rpS6 の染色をおこなった。糖尿病性腎症は通常腎生検は施行されないため検討しえなかったが、腎炎において、糸球体硬化への危険因子であるメサンギウム細胞増殖、基質増加のある領域のメサンギウム細胞が染まることが明らかとなった(Kidney Int.2009;76:534-545)。よってメサンギウム細胞特異的な mTOR 経路の役割をさらに in vivo も含めて明らかにすることを考えた。その手法として、ヒト難病の原因遺伝子である Tuberous sclerosis complex 1(TSC1)に着目した。

TSC1 は難病指定となっている Tuberous sclerosis(結節性硬化症)の原因遺伝子の一つとしてしられ、Hamartin を作り出す。もう一つの原因遺伝子である TSC2 の作り出す Tuberin との複合体を形成し、その下流の mTOR 経路に対して抑制的に働き、細胞増殖や肥大の制御を行っている。すなわち TSC1 の欠失により、mTOR のリン酸化 ribosomal protein S6(rpS6)、4EBP-1 のリン酸化 細胞増殖、肥大につながるということが知られている(Ann N Y Acad Sci. 2010;1184:87-105)。結節性硬化症は全身の過誤腫を特徴とし、腎臓では嚢胞、血管筋脂肪腫、癌が特徴的な病変

とされているが、腎不全を来すこともあり、10才以上では主な死因となっている。臨床症状の程度にはばらつきも多く、その発症進展増悪のメカニズムはいまだに不明な点も多い。この疾患の mTOR 経路の関連した進展増悪経路は、ヒト慢性腎臓病の病態とリンクしており、その過程を解き明かすことは結節性硬化症だけでなく慢性腎臓病の進行を理解する上でも重要と考えられた。

2. 研究の目的

(1)Foxd1-Cre マウスと TSC1 floxed マウスを掛け合わせ、メサンギウム細胞にて TSC1 の発現をノックアウトしたマウスを作成し、その糸球体メサンギウム細胞の増殖、肥大、硬化を検討する。

(2)上記で作成したメサンギウム特異的 TSC1 ノックアウトマウスからメサンギウム細胞を培養し、それをコントロールマウス由来のメサンギウム細胞と増殖、肥大、細胞外基質の産生(硬化)の面から比較することにより mTOR 経路のメサンギウム細胞における糸球体硬化に至る役割を検討する。

(3)メサンギウム特異的 TSC1 ノックアウトマウスにて mTOR 経路の活性化により増殖、肥大、硬化などがみられた場合、mTOR 経路の活性化阻害剤である Rapamycin にて治療介入を試みる。mTOR 経路の役割をさらに確認しうる。

3. 研究の方法

(1)メサンギウム細胞特異的 TSC1 ノックアウトマウスの解析

腎組織の経時的な解析 Foxd1 は腎形成時 metanephric mesenchyme に発現し、腎臓の stromal cell となる細胞に発現する。生後は正常の腎臓での発現は、RT-PCR にて day10 でごく軽度、以後はほぼ認められなくなる(Am J Pathol. 2010;176:85-97)。よって胎生期の腎発生の E10.5 から、TSC1 がノックアウトされているか、そしてその下流である mTOR 経路が活性化されているかどうかを TSC1 や mTOR 経路の surrogate marker であるリン酸化 rpS6 の染色にて確認する。次に糸球体メサンギウム細胞の増殖はメサンギウム細胞の細胞数や細胞増殖 marker である Ki67 の染色で、肥大はメサンギウム細胞領域を PAS 染色にて計測することにより、その有無を確認する。糸球体硬化が観察されれば、PASM 染色や collagen IV 染色により定量化する。なお、生後、TSC1 がノックアウトされることによる何らかの病変形成によって、正常ではみられない Foxd1 の発現

が見られる場合はタモキシフェン 6mg を E10.5 の時点で母体に腹腔内注射することにより、一時的に Foxd1 発現部位に Cre recombinase を誘導できるマウス(タモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウス)を掛け合わせるにより同様の解析を行う。この誘導によりメサンギウム細胞にて目的分子のノックアウトが可能であることはすでに示されている (Am J Pathol. 2010;176:85-97)。

(2)メサンギウム細胞の単離とその培養による形質の解析 メサンギウム特異的 TSC1 ノックアウトマウスからマグネティックビーズ環流や Sieving method で糸球体を採取し、その後、混入する尿細管をさけるため、クローニングリングでさらに糸球体のみを採取し、そこから生じるメサンギウム細胞を培養する。まずコントロールマウス由来のメサンギウム細胞と比較して TSC1 の発現の欠失や mTOR 経路の活性化(rpS6 や 4E-BP1 のリン酸化)を Westernblotting にて確認する。次に細胞増殖を MTT assay や BrdU 取り込み実験にて、肥大を蛋白合成/DNA 合成の比にて、細胞外基質の産生(硬化)は collagen IV などの発現にて比較することにより、mTOR 経路のメサンギウム細胞における糸球体硬化に至る役割を検討する。

(3)メサンギウム特異的 TSC1 ノックアウトマウスにて mTOR 経路の活性化により増殖、肥大、硬化などがみられた場合、mTOR 経路の活性化阻害剤である Rapamycin にて治療介入し、mTOR 経路の役割をさらに確認する。単離メサンギウム細胞でも Rapamycin を使い、治療効果を評価する。

4. 研究成果

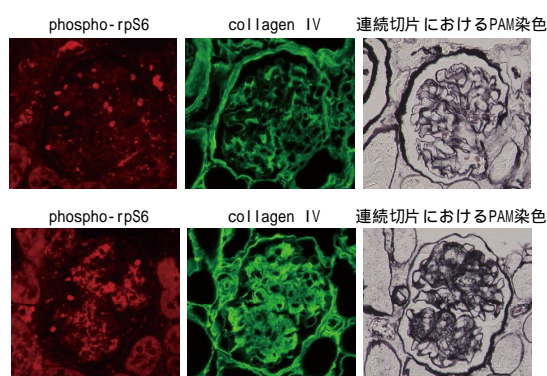
Foxd1 発現部位に Cre recombinase を誘導できるマウスと TSC1 floxed マウスを掛けあわせることによりメサンギウム細胞での TSC1 ノックアウトマウスを作成した。その結果生後 4 週には明らかな腎病変を形成した。その表現型を生後 12 週で解析した。また半年以内に衰弱し、死亡するためその解析も施行した。しかし Foxd1-Cre マウスの Cre recombinase の発現がメサンギウム細胞以外の部位にもおこることが beta-galactosidase 発色マウスとの掛け合わせで確認された。

そのため、タモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウスを使ったシステムに移行した。その誘導方法は e10.5 の時点でタモキシフェンを母体に腹腔内注射をすることによるものでそのシステムを確立できた(次図)。



(左図)beta-galactosidase の発色(青)とメサンギウム細胞に染まる PDGF 受容体の染色(茶)が糸球体内で重なっている。

タモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウスでは糸球体ではメサンギウム細胞に特異的に Cre recombinase を発現することがわかったため、TSC1 floxed マウスと掛け合わせ、メサンギウム細胞特異的 TSC1 ノックアウトマウスを作成した。すると、生後 3 ヶ月ころには細胞外基質の有意な増加をみとめ、生後 1 年の時にはその領域が拡大していた。この結果 in vivo にてはじめてメサンギウム細胞における細胞伝達経路の活性化で病変が起こることを示した(次図)。



(上図)生後 1 年における Control マウスでの mTOR 経路の surrogate marker, phospho-ribosomal protein S6(rpS6)の発現と collagen IV 染色、PASM 染色

(下図)生後 1 年におけるタモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre 陽性の TSC1 double floxed マウス。メサンギウム細胞領域の phospho-rpS6 の発現を認め、collagen IV の発現増加、PASM 染色で細胞外基質の増加がみられる。

現在 Rapamycin にて治療介入し、その効果を確認しており、その結果も含めて論文投稿予定としている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 幸二郎 (NAGAI, Kojiro)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：40542048

(2) 研究分担者

松浦 元一 (MATSUURA, Motokazu)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：10403734

富永 辰也 (TOMINAGA, Tatsuya)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・助教
研究者番号：80425446