

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461220

研究課題名(和文)系球体構成細胞の遺伝子発現変化の網羅的解析による慢性腎臓病の分子機構解明

研究課題名(英文) Gene expression profiling of glomerular component cells to understand molecular mechanisms of progression of chronic kidney diseases

研究代表者

土田 潤一 (Tsuchida, Junichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10643570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎は新規透析導入の65%を占める主要な原因であるが、治療薬の開発は進んでいない。これらの慢性腎臓病を引き起こすメカニズムを解明するために、腎糸球体構成細胞を蛍光標識したマウスを作製した。また腎糸球体の遺伝子発現解析を行い、糸球体の足細胞で特異的に発現し、糖尿病性腎症で発現が低下する分泌タンパクAを同定した。Aは培養メサンギウム細胞の増殖を抑制させ、糖尿病性腎症において観察されるメサンギウム細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although approximately 65% of new patients entering dialysis in Japan are diabetic nephropathy and chronic glomerular nephritis, there are few therapeutic medication. To elucidate the mechanisms of progression of chronic kidney disease, we generate transgenic mice expressing glomerular targeted fluorescent protein. We identified the secreted protein A, which is expressed specifically in podocytes, by gene expression profiling of the diabetic mice. Its expression was reduced in diabetic nephropathy, and it inhibited the proliferation of cultured mesangial cells.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糸球体 セルソーター ポドサイト 糖尿病性腎症 網羅的解析 メサンギウム細胞 内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症・慢性糸球体腎炎などの慢性腎臓病は、新規透析導入患者の約 65%を占める原因である。透析導入となった患者は QOL が低下し、心不全のリスク増大などで余命が半分になり、また医療経済的にも透析導入を減少させることが求められている。

糖尿病・高血圧症の治療薬は次々と開発されているものの、慢性腎臓病そのものを対象とした治療薬開発はほとんど成功しておらず、その病態解明と新規治療法の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の進行過程でどのような遺伝子発現の変化が起こっているかを把握し、その中から治療ターゲットとなる可能性のある遺伝子を抽出し、機能解析を行う。

糖尿病のタイプ(1型, 2型) 動物種(マウス, ラット)を 2 種類解析し、共通に変動する遺伝子を選択することで、より確度を高めることを期待する。

ターゲット組織としては腎臓の中でも糸球体に着目した。whole kidney の RNA 解析を行った場合、含有量の少ない糸球体の遺伝子変化を捉えるのは困難なため、whole kidney の中から糸球体を単離して同時に解析を行う。

候補遺伝子の培養細胞系での強制発現、ノックダウンにより、糖尿病性腎症発症への影響を推定する。将来的には、ノックアウトマウスによる機能解析、創薬への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 1型(streptozotocin 投与マウス)および 2型(Koletsky ラット)糖尿病モデル動物を作製し、whole kidney および単離した腎糸球体のマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイは SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ(アジレント・テクノロジー社)使用し、データ解析は GeneSpring(アジレント・テクノロジー社)を使用した。

(2)機能解析のツールとして、腎糸球体構成細胞である足細胞、メサンギウム細胞を、それぞれ蛍光標識したマウスを作製した。

内在性の nephrin よりも強い発現量で、かつ永久に足細胞をラベルするために ROSA-CAG-stop-ZsGreen1 マウス[Medisen et al. Nat Neurosci 2010; Jax Mice #7906]と nephrin-Cre マウス[Asano, Matsusaka et al. J Am Soc Nephrol 2005]を交配し、nephrin プロモーター支配下の細胞で Cre が発現し、stop コドンが脱落して CAG プロモーター支配下で ZsGreen1 蛍光タンパクが永久的に発現するマウスを作製した。

メサンギウム細胞をラベルするために、で用いた ROSA-CAG-stop-ZsGreen1 マウスと Sm22-Cre マウス[Zhang et al. Jax Mice #6878]を交配し、Sm22 プロモーター支配下の細胞で Cre が発現し、stop コドンが脱落して CAG プロモーター支配下で ZsGreen1 蛍光タンパクが永久的に発現するマウスを作製した。

4. 研究成果

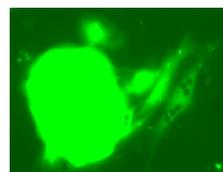
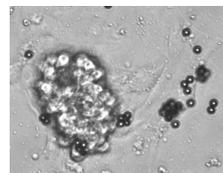
(1)2 種類の糖尿病性腎症モデル動物を作製し、血糖の上昇、タンパク尿の増加、病理像などを指標に、糖尿病性腎症の解析に適した条件を検討し、解剖、腎臓の摘出、糸球体の単離を行い、RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

2 種類のモデルで同様の変動パターンを示す遺伝子、Whole kidney よりも糸球体で発現が高く、かつ全身の中でも腎臓に特異性のある遺伝子を検索したところ、文献情報の少ない分泌タンパク A を見い出した。

A は糖尿病性腎症になると減少し、糸球体の中でも足細胞に特異的な発現パターンを示した。アデノウイルスベクターを用いて、培養メサンギウム細胞で A を発現させると、細胞増殖が抑制された。培養メサンギウム細胞では、A の受容体が豊富に発現していた。

糖尿病性腎症では、糸球体のメサンギウム領域が拡大することが知られているが、足細胞から分泌される A はメサンギウム細胞表面の受容体に作用してその増殖をコントロールし、病態時には A が減少して、コントロールを失ったメサンギウム細胞が増殖する可能性が示唆された。A の組み換えタンパクを作製し、糖尿病モデル動物に投与した時の作用を検討中である。

(2) のマウスでは糸球体において強く ZsGreen1 が発現していた。ピーズ法で単離した糸球体をプレートで培養すると、プレート底面に outgrowth してくる足細胞様の細胞も ZsGreen1 を発現していた(下図)。



のマウスでは糸球体のメサンギウム細胞で ZsGreen1 が発現し、メサンギウム細胞マーカーである PDGF receptor β と局在が一致していたが、一部の上皮細胞で発現のリー

ク(漏れ)を認めた。

これらのマウスを用いて、免疫染色による発現部位解析、足細胞、メサンギウムをセルソーターで単離し、アデノウイルスを感染させた機能解析などを行い、(1)で見出された分泌タンパクAの機能解析を継続する予定である。

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 6 件)

Tsuchida J, Matsusaka T, Ohtsuka M, Miura H, Okuno Y, Asanuma K, Nakagawa T, Yanagita M, Mori K. Establishment of Nephron Reporter Mice and Use for Chemical Screening. PLoS One. 2016 Jun 30;11(6):e0157497. doi: 10.1371/journal.pone.0157497. 査読有, オープンアクセス

Ueda S, Ozawa S, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Uchida S, Nakagawa T. ENOS deficiency causes podocyte injury with mitochondrial abnormality. Free Radic Biol Med. 2015 Oct;87:181-92. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.028. 査読有, オープンアクセスではない

Ozawa S, Ueda S, Imamura H, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Nakagawa T. Glycolysis, but not Mitochondria, responsible for intracellular ATP distribution in cortical area of podocytes. Sci Rep. 2015 Dec 18;5:18575. doi: 10.1038/srep18575. 査読有, オープンアクセスではない

Imamaki H, Ishii A, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Mori KP, Kato Y, Kuwahara T, Satoh M, Nakatani K, Saito Y, Tomosugi N, Sugawara A, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Mori K. Low Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Level as a Marker of Malnutrition in Maintenance Hemodialysis Patients. PLoS One. 2015 Jul 10;10(7):e0132539. doi: 10.1371/journal.pone.0132539. 2015. 査読有, オープンアクセス

Koga K, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Mori KP, Kato Y, Ohno S, Toda N, Saleem MA, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. MicroRNA-26a inhibits TGF- β -induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in

diabetic nephropathy.

Diabetologia.58(9):2169-80. doi: 10.1007/s00125-015-3642-4. 2015. 査読有, オープンアクセスではない

森潔, 土田潤一, 栗原孝成, 横井秀基, 笠原正登, 向山政志, 柳田素子. 循環器疾患における各種バイオマーカーの意義: TLR4 と関連因子. Heart View, 19, 168-171, 2015. Doi: なし, 査読無, オープンアクセスではない

〔学会発表〕(計 6 件)

中村仁, 小口綾貴子, 内野詠一郎, 土田潤一, 井口卓, 山本格, 柳田素子. 慢性腎臓病における腎性貧血および線維化を担う神経堤由来線維芽細胞の機能解析. 日本腎臓学会学術総会, 2013/05/10-13, 東京

中村仁, 小口綾貴子, 山田龍, 土田潤一, 柳田素子. 慢性腎臓病における上皮-線維芽細胞相互作用の解明. 日本腎臓学会学術総会, 2014/07/4-6, 横浜

森慶太, 横井秀基, 栗原孝成, 今牧博貴, 中尾一和, 遠藤知美, 柳田素子, 向山政志, 森潔. 薬剤誘導性遺伝子改変システムを用いた糖尿病性腎症におけるアルブミンの糸球体濾過量の評価. 日本腎臓学会学術総会, 2015/6/5~7, 名古屋

横井秀基, 加藤有希子, 大野祥子, 森潔, 中尾一和, 柳田素子, 向山政志. 高血圧・糖尿病による腎障害進展におけるポドサイトの重要性. 日本高血圧学会総会, 2015/10/9~11, 松山

Mori KP, Yokoi H, Kasahara m, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Nakao K, Endo T, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Novel drug-inducible megalin knockout mice reveal marked increase of both total nephron glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in early diabetic nephropathy. Annual meeting of American Society of Nephrology, 2015/11/05~08, San Diego, USA

Ueda S, Ozawa S, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Uchida S, Nakagawa T. A Lack of eNOS Leads to Mitochondrial Injury in the Podocytes. Annual meeting of American Society of Nephrology, 2015/11/05~08, San Diego, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmk.med.kyoto-u.ac.jp/member.html>

<http://www.tmk.med.kyoto-u.ac.jp/mori.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田 潤一 (TSUCHIDA, Junichi)

京都大学大学院医学研究科・メディカルイノベーションセンター・プロジェクト研究員
研究者番号 1 0 6 4 3 5 7 0

(2) 研究分担者

森 潔 (MORI, Kiyoshi)

京都大学大学院医学研究科・メディカルイノベーションセンター・特定准教授

静岡県立大学薬学研究科・分子臨床薬理学・特任教授

研究者番号 6 0 3 4 3 2 3 2