

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25461234

研究課題名(和文) Foxc転写因子と糸球体硬化症

研究課題名(英文) Foxc1/2 transcription factors and glomerulosclerosis

研究代表者

本島 英 (MOTOJIMA, Masaru)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80468636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：コンディショナルノックアウトマウスを作製してFoxc1とFoxc2 (Foxc1/2) の腎臓における役割を解析した。

Foxc2を腎発生の初期から欠損するマウスでは、腎形成が阻害される(低形成腎)と共に糸球体嚢胞が観察された。ポドサイト形成の初期からFoxc1/2の双方を欠損するマウスでは、生後2週目に高度なタンパク尿が認められた。誘導型Creにより、生後8週目からFoxc1/2を欠損するマウスでは、12週で高度なタンパク尿が認められ、16週には硬化糸球体が認められた。

以上のことからFoxc1/2は腎発生のみならず、ポドサイト機能の維持にも重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Foxc1 and Foxc2 (Foxc1/2) are transcription factors involved in many biological processes including kidney development. Roles of Foxc1/2 in kidney were examined by conditional knockout mice.

Deletion of Foxc2 from early kidney development by Pax2-Cre resulted in kidney hypoplasia accompanied by glomerular cysts. Mice with an innate podocyte-specific deletion of Foxc1/2 by Nephron-Cre developed massive proteinuria within 2 weeks after birth. Deletion of Foxc1/2 in adulthood by inducible-Cre resulted in development of massive proteinuria and glomerulosclerosis. Comprehensive gene expression analysis revealed that Foxc1/2 control genes necessary for podocyte function such as podocin and Cxcl12.

These results demonstrate critical roles for Foxc1/2 not only in kidney development but also podocyte maintenance.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糸球体硬化 転写因子 フォークヘッド ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

Foxc1 と Foxc2 はフォークヘッドボックス (FOX) 転写因子群のメンバーであるが、この転写因子群はすべて FOX あるいは Winged-helix と呼ばれるヘリックス-ループ-ヘリックス構造の DNA 結合ドメインを有している。FOX 転写因子群には 43 遺伝子が含まれるが、これらの遺伝子はさらに A から S まで 19 のサブファミリーに分類される。したがって、Foxc1 と Foxc2 が C サブファミリーを構成していることになる。Foxc1 と Foxc2 の FOX ドメインはアミノ酸 1 つの違いのみであり、しかも Foxc1 のアスパラギン酸が Foxc2 ではグルタミン酸という、いずれも酸性アミノ酸に分類される近縁の変化である。FOX 転写因子群が類似の DNA 配列を認識することと考え合わせると、Foxc1 と Foxc2 は共通の DNA 配列に結合すると考えられる。また、Foxc1 と Foxc2 の発現領域は発生過程で広く重なっており、これらの転写因子は様々な組織や器官の発生において機能的に重複していることが知られている。

ヒトでは、Foxc1 は小上顎症、瞳孔変位、歯牙欠損などの症状を呈するアクセンフェルド・リーガー症候群の、Foxc2 は先天性リンパ水腫 睫毛重生 (しょうもうじゅうせい) 症候群の原因遺伝子として知られている。

腎発生において、Foxc1 の ch 変異はウォルフ管から出芽する本来の尿管芽に加えて、異所性の尿管芽形成を伴うことが知られている。このため重複腎尿路系が形成され、また、異所性に形成された尿管が膀胱の異常な位置に連結するため水腎症や巨大尿管を引き起こす。一方、Foxc2 の欠損は糸球体係蹄形成の異常を引き起こすと報告されている。

以上を踏まえ研究を進めた結果、我々はこの研究を開始するまでに以下のことを明らかにしていた。

(1) Foxc1 も Foxc2 もポドサイトに限局して発現が認められる。

(2) Foxc1 KO マウス (Foxc1^{-/-}) の新生仔は、水腎症を伴った重複腎、重複尿管、巨大尿管などの腎尿路奇形を伴って出生するが、その腎実質には、野生型マウスとの違いが認められない。

(3) Foxc1 と Foxc2 の片方のアリルがそれぞれ欠失するコンパウンド KO マウス (Foxc1^{+/-}; Foxc2^{+/-}) では、単なる水腎症、重複腎から糸球体係蹄形成異常に至るまでの多様な奇形が発生する。

以上の結果は腎発生の初期において、Foxc1 と Foxc2 が協調的に働いていることに加え、Foxc1 や Foxc2 が正常なポドサイトの発生に不可欠である可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

ポドサイト傷害は糸球体硬化の進行において中心的な役割を担っており、ポドサイトを高度に分化した状態で維持することが、慢性腎不全の進行を抑制するためのカギであ

ることが近年の研究で明らかになっている。しかしながら、ポドサイトの機能分化と維持に関わる遺伝子群については不明な点が多い。また、局所的なポドサイト傷害が他のポドサイトや他の糸球体細胞の傷害へと伝搬していくメカニズムもまったくと言ってよいほど分かっていない。本研究では、ポドサイトに限局して高発現する転写因子 Foxc1 と Foxc2 に着目することで、ポドサイト発生の制御に関する知見を集積し、ポドサイト機能分化に関する考察を行う。さらに成体マウスポドサイトにおける Foxc1 と Foxc2 の役割を解析することによって、ポドサイト機能維持の機構と糸球体硬化症の発症および進展機序を明らかにする。

3. 研究の方法

コンベンショナルな Foxc1 KO マウス、Foxc2 KO マウスおよびコンパウンド KO マウスはいずれも胎生致死であるので、コンディショナル KO マウスを作製して、これを回避した。すなわち、以下の Cre マウスと Foxc1 loxP マウスおよび Foxc2 loxP マウスを掛け合わせて、コンディショナル KO マウスを作製した。

(1) Pax2-cre: 腎発生全体で遺伝子を欠損させる。

(2) Nephroin-Cre: ポドサイト特異的に欠損させる。発生過程でポドサイトが形成される時期も含む。

(3) ROSA26-CreERT2: 全身に誘導型 Cre を発現し、タモキシフェンの投与により Cre を活性化させる。

作製したコンディショナル KO マウスの腎機能、腎組織および各種遺伝子発現について検討した。

4. 研究成果

腎発生の初期から腎臓で Foxc2 を欠失させたマウスは、低い確率でしか出生せず、出生してもその直後に死亡した。このマウスでは新生仔の腎臓が低形成となっており、尿細管の伸長が遅れていることがその原因であると推察された。また、ボーマン嚢の拡張を伴ういわゆる嚢胞糸球体が散見された。

ポドサイトで Foxc1 と Foxc2 の双方を欠失させたマウスは離乳期まで生存するマウスがほとんどいなかった。生後 2 週目で、尿を採取し電気泳動を行うと、多量の非選択的蛋白尿が認められた。組織レベルでは、蛋白性の尿円柱や過剰な蛋白質再吸収によるとみられる尿細管の Protein droplets が認められ、ポドサイト傷害による大量の蛋白尿が発生したと考えられた。この時点で、わずかに糸球体硬化も認められた。

一方、生後 8 週でタモキシフェンを投与して、Cre 活性を誘導し、Foxc1 と Foxc2 を欠失させたマウスでは、タモキシフェン投与後 4 週までに明らかな蛋白尿が認められた。8 週では糸球体硬化が認められる個体も散見

された。高度の蛋白尿を呈する個体では、蛋白性の尿円柱（図 1. 矢じり）と尿細管の

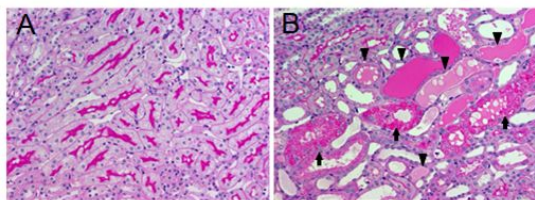


図1. 尿細管異常

Protein droplets (矢印) が認められた。また、ポドサイトの空胞変性が確認され、この細胞が激しく傷害されていることが確認された(図2)。どちらの図も A が野生型で B が

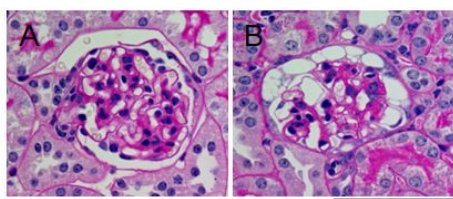


図2. ポドサイト空胞変性

コンディショナル KO であり、スケールバーはそれぞれ 50 μ m である。これらの図は雑誌論文 より引用した。電顕では、光顕で正常に見えるポドサイトにおいても、足突起の消失や Microvillous transformation といった傷害が起こっていることが明らかとなった。また、いずれの Cre マウスとの交配においても、ポドサイト傷害の程度は、Foxc1 loxP/loxP: Foxc2 loxP/loxP > Foxc1 loxP/+ : Foxc2 loxP/loxP > Foxc1 loxP/loxP: Foxc2 loxP/+ であった。これらの結果は、ポドサイト傷害が Foxc1 と Foxc2 の濃度に依存することと、ポドサイトの機能維持には Foxc2 がより重要であることをしめている。

タモキシフェン投与後 4 日目の単離糸球体における網羅的遺伝子発現プロファイルと比較した結果、Foxc1 と Foxc2 が Podocin や Cxcl12 などのポドサイトの機能発現に重要な因子の発現を担っていることが示唆された。

以上の研究により、Foxc1 と Foxc2 が腎発生のみならず、ポドサイトの成熟と維持において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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 3 件)

Foxc1 and Foxc2 are necessary to maintain glomerular podocytes.

Motojima M, Kume T, Matsusaka T. Exp Cell Res. 2017 352:265-272. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.016.

Peer-reviewed

Motojima M, Tanimoto S, Ohtsuka M, Matsusaka T, Kume T, Abe K. Characterization of Kidney and Skeleton Phenotypes of Mice Double Heterozygous for Foxc1 and Foxc2. Cells Tissues Organs 201:380-389, 2016. doi: 10.1159/000445027. Peer-reviewed

Motojima M, Ogiwara S, Matsusaka T, Kim SY, Sagawa N, Abe K, Ohtsuka M. Conditional knockout of Foxc2 gene in kidney: efficient generation of conditional alleles of single-exon gene by double-selection system. Mamm Genome. 27:62-69, 2016. doi: 10.1007/s00335-015-9610-y. Peer-reviewed

〔学会発表〕(計 7 件)

Motojima M, Kume T, Matsusaka T. Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, regulate podocyte gene expression. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.

本島英, 松阪泰二. Foxc1 と Foxc2 はポドサイトの成熟と維持に必須である. 第 25 回発達腎研究会. 2016.

Motojima M, Kume T, Matsusaka T. Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required to maintain glomerular architecture. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会. 2015.

Motojima M, Kume T, Matsusaka T. Foxc1 and Foxc2 cooperate in maintaining glomerular podocytes. Experimental Biology (EB) 2015. 2015.

Motojima M, Kinomura M, Matsusaka T, Ichikawa I. Expression of nephrin, a podocyte specific protein, depends on MafB and ligands of nuclear receptors. Experimental Biology (EB) 2015. 2015.

Motojima M, Matsusaka T, Ichikawa I, Ohtsuka M. Efficient generation of conditional alleles in a single-exon gene locus by a double-selection system in mice. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014.

本島英, 市川家國 Foxc1 と Foxc2 の腎発生における役割、第 36 回日本分子生物学会年会、2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本島 英 (MOTOJIMA, Masaru)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80468636

(2) 研究分担者

松阪 泰二 (MATSUSAKA, Taiji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50317749

(3)連携研究者

市川 家國 (ICHIKAWA, Iekuni)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：80317768

宮崎 陽一 (MIYAZAKI, Yoichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60266690

(4)研究協力者

大塚 正人 (OHTSUKA, Masato)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90372945