

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461225

研究課題名(和文) 抗糸球体基底膜抗体腎炎におけるCTGFの役割の検討

研究課題名(英文) The role of CTGF in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis

研究代表者

横井 秀基 (YOKOI, HIDEKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90378779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ポドサイト特異的CTGF欠損マウスに抗GBM腎炎を惹起したところ、蛋白尿、半月体形成率、メサンギウム拡大、マクロファージ浸潤の改善を認めなかった。そのため次に、PDGFR- Creマウスを用いてメサンギウム細胞CTGF欠損マウスを作製し、抗GBM腎炎を惹起した。半月体形成率、メサンギウム基質拡大、蛋白尿、糸球体内TGF- β 1、SMA、fibronectin、MCP1の発現が減少し、マクロファージの糸球体内への浸潤が抑制された。また、メサンギウム細胞CTGF欠損マウスではマクロファージサブタイプM1/M2比の低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we induced anti-GBM glomerulonephritis in podocyte-specific CTGF knockout mice. These mice exhibited no improvement of proteinuria, crescentic formation, mesangial expansion and macrophage infiltration. Therefore, we generated mesangial cell-CTGF knockout mice (Mes-CTGF cKO mice) using PDGFR- α -Cre mice. Mes-CTGF cKO mice showed reduction of crescentic formation, mesangial expansion, proteinuria, TGF- β 1, α -SMA, fibronectin and MCP1 expression. Infiltration of macrophages was also inhibited and the ratio of M1 macrophage/M2 macrophage was significantly reduced.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糸球体腎炎 増殖因子 腎不全 タンパク尿 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

Connective tissue growth factor (CTGF)は Transforming growth factor-1 (TGF-1) や Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) と相互作用し、細胞外基質産生を促進する。研究代表者は腎疾患において CTGF 阻害が腎線維化を抑制することを報告してきた。通常の CTGF ノックアウトマウスは新生児期に死亡するため、研究代表者は CTGF floxed マウスを作製した。この CTGF floxed/floxed (fl/fl)マウスを全身性に Cre recombinase 誘導可能な RosaCreERT2 マウス (RCreERT2;Artemis 社より購入;変異エストロゲン受容体と Cre recombinase のキメラ蛋白を全身で発現するマウス)と交配し、4-hydroxytamoxifen を投与することで、誘導型全身性 CTGF ノックアウトマウス (Rosa-CTGF cKO)を作製し、そのマウスの CTGF 遺伝子発現は腎において 81%低下する。このマウスに抗糸球体基底膜腎炎を惹起すると、野生型に比して尿蛋白排泄量が day 7 で約 50%低下する。腎炎惹起 Rosa-CTGF cKO マウスでは、コントロールマウスに比してメサンギウム基質増加、半月体形成、MAC-2 陽性細胞数が軽減していた。また糸球体基底膜肥厚も軽減しており、ポドサイトにおける CTGF が重要な役割を果たしている可能性を想定し、ポドサイト特異的 CTGF ノックアウトマウスを作製した。

2. 研究の目的

本研究では、病態改善における責任細胞の同定ならびに機序解明を第一の目的としている。ポドサイト特異的 CTGF ノックアウトマウスに抗糸球体基底膜腎炎を惹起し、検討を行う。メサンギウム細胞における CTGF の意義を検討するために、メサンギウム細胞特異的ではないがメサンギウム細胞で Cre を発現する PDGFR β -Cre マウスと交配し、腎病変・蛋白尿、マクロファージ浸潤の解析を行

う。糸球体内の細胞のメサンギウム細胞や内皮細胞と炎症細胞とのクロストークについても検討を行う。研究代表者は、CTGF 欠損において腎炎が改善する機序として炎症の軽減・糸球体内マクロファージ浸潤の減少に着目している。CTGF 欠損が炎症性サイトカイン発現ならびに炎症細胞の遊走に及ぼす機序について解明する。

3. 研究の方法

(1) ポドサイト特異的 CTGF 欠損マウスを用いた抗 GBM 腎炎におけるポドサイトの CTGF の意義

ポドサイト特異的に Cre リコンビナーゼを発現する nephrin-Cre マウスを CTGF floxed マウスと掛け合わせることにより、ポドサイト特異的 CTGF 欠損 (pod-CTGF cKO) マウスを作製する。Pod-CTGF cKO マウスに抗 GBM 腎炎を惹起することにより、ポドサイトの CTGF の意義を検討する。CTGF と podocin の二重蛍光免疫染色を行ったところ、コントロールマウスにおいて抗 GBM 腎炎にて発現増加する CTGF はポドサイトおよびメサンギウム細胞に多く、pod-CTGF cKO マウスではポドサイトにおける CTGF が減少していた。Rosa CTGF cKO マウスで検討した尿蛋白・病理組織・電子顕微鏡・mRNA 発現・炎症細胞浸潤について評価を行う。

(2) メサンギウム CTGF 欠損マウスを用いた抗 GBM 腎炎におけるメサンギウムの CTGF の意義

抗 GBM 腎炎において発現が増加するメサンギウム細胞の CTGF の意義を明らかとするために、PDGFR β -Cre マウスと CTGF floxed マウスを掛け合わせたマウス (PDGFR β -CTGF cKO マウス)を作製する。PDGFR β は定常状態において、糸球体内ではメサンギウム細胞とポドサイトに発現しており、抗 GBM 腎炎ではさらに発現が増強する。このマウスに抗 GBM 腎炎を発症させ、腎臓における病理学的・機

能的变化についての検討を行う。Pod-CTGF cKO マウスにおける結果と対比し、メサンギウム細胞における CTGF の意義の解明が可能となる。

(3) メサンギウム細胞および内皮細胞とマクロファージの CTGF を介したクロストーク

抗 GBM 腎炎において、Rosa-CTGF cKO マウスではマクロファージの浸潤が減少しており、CTGF とマクロファージ浸潤には関連があることが想定できる。

また CTGF はメサンギウム細胞や尿細管細胞に作用し、MCP1、IL-1、TNF- α などの炎症性サイトカインを増加させることが報告されている。単球系の細胞である RAW264.7 細胞にリコンビナント CTGF を添加し、M1/M2 比と TNF- α 発現を検討する。メサンギウム細胞に CTGF 添加もしくは si-CTGF を用いた CTGF 抑制による MCP1 発現変化ならび接着因子の ICAM-1, VCAM-1, Fibronectin, Integrin α 5 β 1 発現を検討し、メサンギウム細胞と蛍光ラベルした RAW264.7 細胞の接着を検討する。

4. 研究成果

(1) ポドサイト特異的 CTGF 欠損マウスを用いた抗 GBM 腎炎におけるポドサイトの CTGF の意義

ポドサイト特異的 CTGF 欠損マウスに抗 GBM 腎炎を惹起したところ、ポドサイトの CTGF は欠失するが、経過中の蛋白尿、半月体形成率、メサンギウム拡大、マクロファージ浸潤については、抗 GBM 腎炎コントロールマウス群と差を認めなかった。

(2) メサンギウム CTGF 欠損 (cKO) マウスを用いた抗 GBM 腎炎におけるメサンギウムの CTGF の意義

PDGFR- α Cre マウスを用いてメサンギウム細胞 CTGF 欠損マウスを作製し、抗 GBM 腎炎を惹起した。その結果、半月体形成率、メサンギウム基質拡大、尿蛋白、糸球体内 TGF-

1、SMA、fibronectin、MCP1 の発現が減

少し、マクロファージの糸球体内への浸潤が抑制された。また、このマクロファージの M1 と M2 サブタイプの割合を検討したところ、メサンギウム細胞 CTGF cKO マウスでは M1/M2 比の低下を認めた。

さらに、PDGFR- α Cre 細胞の Cre リコンビナーゼ活性をどの細胞が示しているのか検討するために、PDGFR- α Cre マウスと ZsGreen マウスを交配し、ZsGreen 陽性細胞を検討したところ、主にメサンギウム細胞に陽性であった。さらに骨髄由来細胞の検討を行うために、骨髄の ZsGreen 陽性細胞を検討したところ、CTGF 発現は検出できず、骨髄由来細胞の関与は限定的であることを示した。

(3) メサンギウム細胞および内皮細胞とマクロファージの CTGF を介したクロストーク

単球系の細胞である RAW264.7 細胞にリコンビナント CTGF を添加したところ M1/M2 比と TNF- α の増加を認めた。また、蛍光ラベルした RAW264.7 細胞と TNF- α 刺激したメサンギウム細胞の接着を検討したところ、リコンビナント CTGF で増加し、si-CTGF で CTGF を抑制すると低下した。また、si-CTGF でメサンギウム細胞の CTGF を抑制すると、fibronectin と integrin α 5 β 1 が低下し、この低下を介してマクロファージ接着が抑制することが示唆された。さらには内皮細胞由来 CTGF も同様にマクロファージの接着に関与することを示した。

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 8 件)

1. Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M.

Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases.

PLoS One 9:e88942, 2014.

2. 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. 58:2169-2180.2015

3. 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. 10:e0132539. 2015.

4. Ohno S, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwahara K, Fujikura J, Naito M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Saleem MA, Numata T, Mori Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M.

Ablation of the N-type calcium channel ameliorates diabetic nephropathy with improved glycemic control and reduced blood pressure.

Sci Rep. 6:27192, 2016.

5. Yokoi H, Yanagita M.

Targeting the fatty acid transport protein CD36, a class B scavenger receptor, in the treatment of renal disease.

Kidney Int. 89(4):740-742, 2016.

6. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, Kuwabara T, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Kuwahara K, Endo T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K.

Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy.

J Am Soc Nephrol. 28(1):278-289, 2017.

7. Toda N, Mori K, Kasahara M, Ishii A, Koga K, Ohno S, Mori KP, Kato Y, Osaki K, Kuwabara T, Kojima K, Taura D, Sone M, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H.

Crucial role of mesangial cell-derived connective tissue growth factor in a mouse model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis.

Sci Rep.7:42114, 2017.

8. Kato Y, Mori K, Kasahara M, Osaki K, Ishii A, Mori KP, Toda N, Ohno S, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Saleem MA, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H.

Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition.

Sci Rep. 7:46624, 2017.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Toda N, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Imamaki T, Sugawara A, Matsusaka T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M.

The Role of Mesangial Cell-Derived CTGF in Anti-Glomerular membrane nephritis

American Society of Nephrology 2014

November 13, 2014 Philadelphia, USA.

2. Ohno S, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara K, Moin Saleem, Nakao K, Y, Yanagita M, Mukoyama M.

Role of N-type Calcium Channel in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy

American Society of Nephrology ASN 2015

November 5, 2015 San Diego, USA

3. 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、
栗原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、
菅原照、松阪泰二、中尾一和、柳田素子、向
山政志

メサンギウム細胞由来 CTGF のマクロファージに対する役割

第 58 回日本腎臓学会学術総会

2015 年 6 月 7 日 名古屋

4. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori M.

Microalbuminuric stage of diabetic nephropathy is characterized with enhancement of total nephron albumin filtration and reabsorption

2016 Asian Pacific Congress of Nephrology (APCN)

September 17-21, 2016, Perth, Australia

5. Toda N, Kasahara M, Mori K, Ishii A, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H.

Role of CTGF in Peritoneal Fibrosis in Mice

American Society of Nephrology 2016

November 17th, 2016 Chicago, USA.

6. 戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、
栗原孝成、石井輝、古賀健一、松阪泰二、中
尾一和、柳田素子、向山政志

抗糸球体基底膜抗体腎炎における CTGF の役割

第 53 回日本臨床分子医学会総会学術集会

2016 年 4 月 15 日 東京

〔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〕
ホームページ等
京都大学大学院医学研究科腎臓内科学ホームページ
<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/yokoi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：90378779

(2) 研究分担者

笠原 正登 (KASAHARA MASATO)
奈良県立医科大学・医学部・病院教授
研究者番号：50393351

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()