

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：32651  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26461241  
研究課題名(和文) ポーマン嚢上皮細胞のpodocyte化への試み  
  
研究課題名(英文) a trial for generation of parietal podocytes  
  
研究代表者  
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  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポーマン嚢上皮特異的発現ベクター(pPEC-rtTA)を構築後、マウス受精卵に注入。8匹のpPEC-rtTA founder mouseが得られたが、activator lineを確立できなかった。そこで成体Podocine-rtTA/Tet0-Nogginを使用し、PECsのポドサイト化に関し検討を試みた。Doxの長期投与においても、parietal podocytesは認められなかった。それに対して、近位尿細管障害と間質の浮腫性拡大はより顕著になった。以上より、胎生期と異なり、成体におけるBMPシグナルの阻害はparietal podocyteを誘導し得ないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：After the parietal epithelial cell-specific expression vector (pPEC-rtTA) was constructed and injected into mouse fertilized eggs, we obtained eight founder mice carrying pPEC-rtTA. However, we could not establish activator mouse lines from these mice. Therefore, we examined whether the parietal podocytes were formed in the adult Podocine-rtTA/Tet0-Noggin administered Dox for a long time. The results indicated that parietal podocytes were not observed with respect to morphology and expression of several podocyte-markers. In contrast, proximal tubular damages and interstitial edema were intensely seen in the mice. Hence, in contrast to the prenatal period, inhibition of BMP signal in glomeruli in adulthood cannot induce parietal podocytes.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：BMP

## 1. 研究開始当初の背景

Podocyte は終末分化細胞であり、特殊な病態を除きそれ自体に増殖能はなく、また自己複製能、再生能は認められないとされ、腎疾患の進展に伴い podocyte の数は徐々に減少し、残存 podocyte に更なる負荷がかかり、悪循環を形成しながら末期腎不全へと進展していく。したがって、少しでも podocyte を再生させる何らかの方法論の開発は糸球体硬化進展を遅らせる可能性がある。

近年、podocyte の再生に関する知見が徐々に蓄積されつつあり、骨髄由来幹細胞 (Stem Cells 2006; Proc Natl Acad Sci USA 2006)、新生児ポーマン嚢上皮細胞(PECs) (J Am Soc Nephrol 2009) やヒト PECs の subset (CD133<sup>+</sup>; CD24<sup>+</sup>) (J Am Soc Nephrol 2009) が、presumptive progenitor 細胞として podocyte の再生に寄与することが報告されている。しかしながら成体においても新生児と同様に PECs から podocyte への分化が認められるのか、CD133<sup>+</sup>;CD24<sup>+</sup>細胞が正常 podocyte への分化が糸球体硬化抑制にどの程度寄与するのかに関しては知見がない。申請者らは、podocyte 特異的な障害モデル (NEP25 モデル、J Am Soc Nephrol 2006) の再生過程において、progenitor 細胞からの podocyte の供給はほとんど寄与しないことを示唆した (Nephrol Dial Transplant 2014)。一方、申請者らは、BMP の阻害たんぱく質である *noggin* を podocyte 特異的に発現する transgenic mouse (*Nephrin-Noggin*) を作成、いくつかの形質のうち特筆すべきものとして "parietal podocyte" とよばれる細胞を高率に見出した (Biochem Biophys Res Commun 2006, J Am Soc Nephrol 2008)。parietal podocyte はポーマン嚢の内側に存在し、podocyte の各種細胞マーカーを発現し、足突起を認め、VEGF を高発現し、その作用によると考えられるポーマン嚢の外側に異所性の血管形成を伴った。以上の形態観察から、*Nephrin-Noggin* の "parietal podocyte" はポーマン嚢基底膜において血液濾過障壁を形成している可能性も考えられた。しかしながら、*Nephrin-Noggin* はそれ以外にも様々な異常形質を呈し、"parietal

podocyte" が BMP 阻害により PECs から誘導されるのか、あるいは他の形質に伴う二次的变化 (本来の podocyte の虚脱糸球体血管系跡からポーマン嚢への遊走、近位尿細管の発生以上によるポーマン嚢内圧上昇に伴う形質変化等) に由来するのか不明である。また発生段階だけでなく、成体においても "parietal podocyte" が誘導されるのか、さらに当該 "parietal podocyte" が本当に血液濾過に寄与するのか全く不明である。

## 2. 研究の目的

1. Doxycycline (Dox) によって PECs 特異的に reverse tetracycline-controlled transcriptional activator (rtTA) を発現するマウス (J Am Soc Nephrol 2009) と *Tet-O* と連結した BMP 受容体 dominant-negative form あるいは BMP7 loxP マウスを交配することにより、Dox 投与により PECs においてのみ上記シグナルが遮断されるマウスを作成する。2. 上記マウスに対して Dox を各発生段階あるいは成体に対して投与することにより、"parietal podocyte" が誘導されるか否かを検討する。3. 上記遺伝子改変マウスの作成が成功し得なかった場合は Podocin-rtTA/Tet on-noggin の解析に切り替え、長期間 Dox を投与し、"parietal podocyte" の誘導やポーマン嚢基底膜外側に血管が形成されるか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

Parietal epithelial cells (PECs) において特異的に BMP シグナルを抑制するために、後述する *pPEC-rtTA;TetO-BMPR2<sup>R899X</sup>* あるいは、*pPEC-rtTA;LC1;BMPR-II<sup>loxP/loxP</sup>* を作成。Dox 投与にて PECs の podocyte への分化を中心に観察する。Parietal podocyte が認められた場合は、ポーマン嚢基底膜外側の異所性血管形成や当該部位における血液濾過機能の有無について検討する。Parietal podocyte が認められない場合は、*Nephrin-Noggin* でみられたそれは二次的な要因によって形成された可能性が考えられ、podocyte 特異的 (*Nephrin-Cre;BMPR-II<sup>loxP/loxP</sup>*) あるいは近位尿細管特異的 (*KAP-Cre;BMPR-II<sup>loxP/loxP</sup>*) な BMP シグナルの遮断により、その要因を検

討する。

#### 4. 研究成果

初年度、PECs 特異的 promoter として、既知の~3kb human podocalyxin 5'flanking region とそれに続く ~0.3 kb rabbit podocalyxin 5'-untranslated region を cloning し、これを rtTA 遺伝子に連結し、発現ベクター (*pPEC-rtTA*) を構築した。このベクターを rtTA の responsive element である *TetO-lacZ* 発現ベクターとともに株化 PEC に transfection したところ、doxycyclin 存在下でのみ lacZ の発現が認められた。

この *pPEC-rtTA* を委託にてマウス受精卵に注入。得られた計 116 匹の mouse の Tail DNA 解析にて、8 匹が *pPEC-rtTA* を有している事が確認された。そこで 8 匹それぞれの mouse について、既に樹立済の TetO-Cre (responder line) と交配。得られた *pPEC-rtTA*/TetO-Cre F1 mouse に対して Dox を投与することにより、ボーマン囊上皮特異的な Cre の発現の有無を検討した。結果、8 匹の *pPEC-rtTA* founder mouse に由来するすべての F1 mouse において PECs における Cre の特異的発現は認められず、今回作成した transgenic mouse の今後の活用は不可と結論せざるを得なかった。

更に、*pPEC-rtTA*、TetO-BMP2<sup>R899X</sup>、BMP2-II<sup>loxP/loxP</sup> の遺伝子改変マウスに関して供与依頼を繰り返し行うも、当該施設からの供与承諾の返答は受けられなかった。そこで成体 Podocine-rtTA/TetO-Noggin を使用し、PECs のポドサイト化に関する詳細な検討を試みた。pilot 研究において一部の PECs に podocyte マーカーの発現を認めたが、DOX 投与を数カ月と長期継続しても podocyte マーカー発現 PECs の割合はほとんど増加せず、むしろほとんど認められなくなり 電顕における foot process も形成されず、VEGF の異所性発現やボーマン囊外側における異所性血管係蹄形成も観察されなかった。それに対して、DOX 投与を長期継続することにより、短期投与に比較し、近位尿細管障害と間質の浮腫性拡大がより顕著になった。

以上より、胎生期と異なり、成体におけ

る糸球体での BMP シグナルの阻害は parietal podocyte を誘導しないこと、胎児期と同様、糸球体における BMP は近位尿細管の正常構造の維持に必須である事が明らかとなった。

#### 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1件)

Okabe M, Miyazaki Y, Niimura F, Pastan I, Nishiyama A, Yokoo T, Ichikawa I, Matsusaka T. Unilateral ureteral obstruction attenuates intrarenal angiotensin II generation induced by podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015; 15; F932-937.

[学会発表](計3件)

Okabe M, Motojima M, Miyazaki Y, Yokoo T, Fukagawa M, Ichikawa I, Matsusaka T. A new mouse model of segmental podocyte ablation. Annual Meeting of American Society of Nephrology October 2014, Philadelphia, PA

Okabe M, Miyazaki Y, Yokoo T, Fukagawa M, Matsusaka T. Comprehensive polysome analysis in injured podocytes. Annual Meeting of American Society of Nephrology October 2015, San Diego, CA

Okabe M, Motojima M, Miyazaki Y, Yokoo T, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes more severely in male mice. American Society of Nephrology October 2016, Chicago, IL

[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〕

なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

宮崎 陽一 (Yoichi Miyazaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60266690

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

松阪 泰二 (Taiji Matsusaka)

東海大学医学部・総合医学研究所・教授

研究者番号：50317749

### (4)研究協力者

なし