

令和元年6月17日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19643

研究課題名(和文) 体細胞からの誘導ポドサイト(iPod)による慢性腎臓病の細胞治療

研究課題名(英文) Cell Therapy on Chronic Kidney Diseases by Inducible Podocytes from Somatic Cells

研究代表者

横手 幸太郎(Yokote, koutaro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20312944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞からDirect reprogrammingにてポドサイトを作成し、新たな細胞治療とすることを目標としたが、評価系の問題があり困難であった。一方で、ポドサイト傷害と並び慢性腎臓病の重要な進展機転である腎間質の線維化について解析した。すると、ポドサイトと間質の共通の制御因子であるTcf21が、間質線維化の際には発現上昇し、この遺伝子を抑えることで、線維化を抑制できる可能性が示唆された。新たな慢性腎臓病の治療ターゲットとしてTcf21は有望であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎系球体の蛋白ろ過装置の主体である、ポドサイトを、皮膚や脂肪細胞から作成することを試みたが、いくつかの障壁があり困難であった。一方この検討の過程で、ポドサイトではなく腎臓髄質の線維化において重要な転写因子Tcf21の機能を見出した。この遺伝子の欠損により、腎臓の細胞外マトリクスの産生が低下することが判明した。多くの慢性腎臓病が終末像として組織の線維化を呈することから、これを抑制しうる機構が見出されたことは重要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Although we aimed to create podocytes from somatic cells by Direct reprogramming and to make new cell therapy, it was difficult due to problems with the evaluation system. On the other hand, we analyzed renal interstitial fibrosis, which is an important mechanism of chronic kidney disease. The results suggested that Tcf21, a common regulator of podocytes and stroma, is upregulated during interstitial fibrosis, and that suppression of this gene may lead to decreased fibrosis. Therefore, Tcf21 is considered promising as a new therapeutic target for chronic kidney disease.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト 慢性腎臓病 細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic kidney disease, CKD)は、蛋白尿と緩やかな腎機能低下をきたし、末期腎不全や心血管イベントにいたる予後不良の疾患であり、本邦では 1,330 万人の患者が存在する。(日本腎臓学会、2012)。根本的な治療法は存在せず、慢性透析患者数は 30 万人を越え、その負担は大きな社会問題となっている。ことに糖尿病腎症は透析導入患者の 44%を占め、その病態の解明と治療戦略の確立が急務である。

ポドサイトは精密に入り組んだ足突起とその Slit diaphragm (SD)により、糸球体濾過の中心的な役割を果たしている。CKD 疾患のうち、巣状糸球体硬化症(FSGS Focal segmental glomerulosclerosis)の一部は Podocin など SD 蛋白の変異により起こること、様々な尿蛋白モデルマウスが遺伝子のポドサイトのみにおける欠損で作成されること、糖尿病性腎症ではポドサイトがアポトーシスを起し脱落することなどから、ポドサイト傷害を CKD の中心と捉える見方が提唱されている (Wiggins, *Kidney Int* 2007)。ポドサイトは終末分化細胞で一度傷害されると再生しないため、傷害ポドサイトは脱落し、他のポドサイトはそれを代償すべく肥大し、細胞外マトリクスや活性酸素を産生することで糸球体硬化が進展する(Shankland et al, *Kidney Int* 2006)。従って、ポドサイトの傷害を防ぐ、あるいはポドサイトの再生や補充を試みることができれば、有用な治療法になりうると考えられる。一方で、近年、腎臓間質の線維化が、腎疾患の病型によらず末期腎不全に至る共通経路であると認識され、間質細胞の疾患状態における生物学的変化が注目されている。したがって、間質細胞における線維化制御の機構を詳細に検討することも重要な課題である。

2. 研究の目的

近年、線維芽細胞などの体細胞から、遺伝子導入により iPS 細胞を経由せず、神経、心筋などに分化させるという Direct reprogramming の手法が報告され、再生医療の新たなストラテジーとして注目されている。そこで我々は、線維芽細胞や脂肪細胞から、iPS 細胞を経由せずにポドサイトを誘導し、この誘導ポドサイトを用いて慢性腎臓病に細胞治療を試みることを本研究の目的とした。さらにまた、腎臓間質細胞において線維化を制御する機序を解明することを、本研究の第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子のスクリーニング

分化過程のポドサイトに高発現する遺伝子群をスクリーニングした。我々はポドシンプロモータの下で Green fluorescent protein (GFP)を発するマウスから得た単離ポドサイトのデータベースを有しており (Takemoto et al. *EMBO. J* 2006)、公共のデータベースのデータと組み合わせるポドサイト分化に重要である候補遺伝子、特に転写因子をターゲットにスクリーニングを行った。

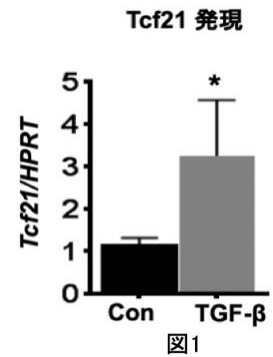
(2) ポドサイトレポーターマウスの作成

PodocinrtTA, tetOCre, mTmG マウスを交配し、これら全てのトランスジーンを有するマウスを作成した。このマウスは通常全身が赤色蛍光を発している。テトラサイクリン誘導により、Podocin プロモータの制御の下、ポドサイトにおいてのみ Cre recombinase が発現し、mTmG ローカスの LoxP サイトが切断され、直前の STOP シグナルが除去されると、GFP が発現される。したがって、ポドサイトが分化誘導されると GFP が発現する仕組みとなっている。さらに、この GFP は lineage tag として使用されポドサイトがのちに脱分化したとしてもその発現が残存する。このマウスからまず、ポドサイトを単離し、GFP の発現を確認し、線維芽細胞を用いたポドサイトの分化を行う際にスクリーニングシステムとして有用であるか否かを検討した。

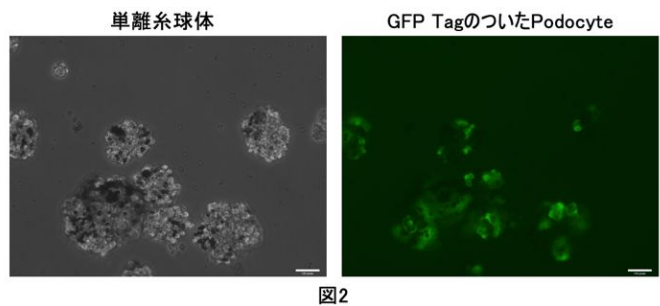
(3) 第二の課題と考えた、腎臓の線維化における、腎間質細胞の役割について検討した。

4. 研究成果

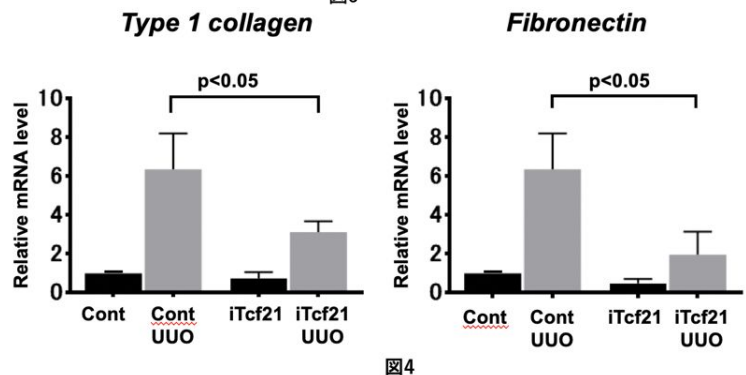
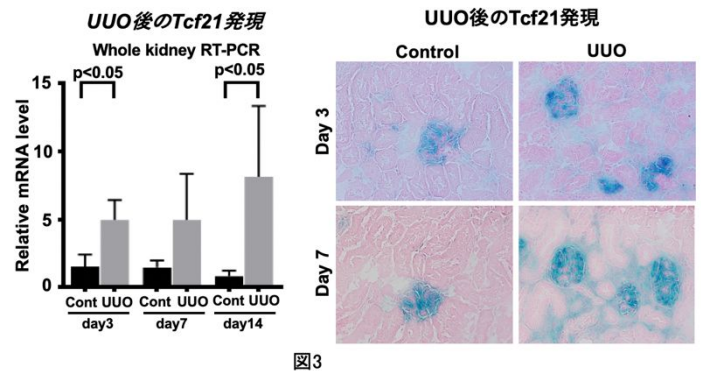
(1) 分化過程のポドサイトに高発現する遺伝子群をスクリーニングした。まず、公共のデータベースならびに過去の文献検索から、ポドサイトに特異的に発現しその分化に関連すると考えられる転写因子として Wt1, Lmx1b, Foxc2, Mafk, Tcf21, Foxd1, Hoxc1, Eya4, Arnt2, Foxd2, Pbx2, Hoxc5, Scx, Sall1, Sox5 をピックアップした。ヒト培養ポドサイトに、まずこれらのうち Tcf21 を遺伝子導入し、ネフリン、ポドシンの発現について realtime PCR 法を用いて検討した。しかしながら、in vitro のポドサイトでは、ポドシン、ネフリンなどのポドサイトマーカーは発現抑制されており、ほとんど発現が見られず、分化促進のパイロットスタディとしてはあまり適当ではないと考えられた。一方、この Tcf21 は高糖質条件や線維化促進因子で Tgfb 刺激により発現増加が見られ、糖尿病や腎臓の線維化において何らかの役割を果たしている可能性が示唆された (図 1)。



(2) 一方、ポドシンプロモーターによりポドサイトに分化すると GFP で蛍光を発するマウスの予備実験を行なった。系球体の培養においては、ポドサイトに蛍光が認められたが (図 2)、一方、explant により、ポドサイトの GFP 発現は消失してしまうことがわかった。ポドサイトの primary culture においてすら、lineage tag がうまく作動しないという状況であり、残念ながらこのマウスの由来細胞を用いてポドサイト分化を評価することは困難であると考えた。



(3) 次に、ポドサイトの傷害と並んで、CKD の発症進展に深く関与していると言われている、腎臓の間質の線維化機序について、併せて検討を行った。前述の Tcf21 は、ポドサイトマーカーの中では、間質の線維芽細胞やペリサイトにも発現が認められる。そこで、申請者らは、Tcf21 の間質線維化における役割について検討した。まず、マウスに片側尿管結紮 (Unilateral ureteral obstruction, UUO) にて線維化を惹起したところ、Tcf21 発現は 5-8 倍程度と、著明に増加していた。さらに Tcf21 プロモータ領域に LacZ リポーターを搭載したマウスに UUO を負荷すると、Tcf21 プロモータの活性を示す青く染色される領域のうち UUO にて誘導される領域は、間質であることがわかった (図 3)。



一方、Tcf21 の通常のノックアウトマウスは、心奇形と肺の低形成のため出生直後に致死である。

このため、出生後に誘導システムを用いて Tcf21 を KO したマウスで、長期生存する Tcf21KO マウスを得た。すると、この誘導性 Tcf21KO マウスは、UUO による線維化誘導後、7 日目に評価すると、線維化関連遺伝子である 1 型コラーゲンやフィブロネクチンの発現が有意に減弱していた（前ページ 図 4）すなわち Tcf21 は腎臓の間質においては線維化促進的に作用する可能性が示唆された。

（4）さらに、これら線維化の主役をなす、腎臓の線維芽細胞の発生過程における Tcf21 の役割を検討するために、Tcf21 を発生過程の腎臓線維芽細胞において KO した。すると、腎臓が著明に萎縮し、その萎縮は集合管と尿管芽の形成不全によることがわかった（図 5）。加えて、Tcf21KO マウスの胎児から腎臓を摘出し、explant 法にて 48 時間培養、尿管芽の分岐を calbindin, 将来ネフロンになる progenitor を Jagg1 で免疫染色したところ、Tcf21 KO においては尿管芽の分岐ならびにネフロン原器の数が著名に減少していることがわかった（図 6）。

すなわち、腎臓の線維芽細胞は病態としての線維化に関与するのみならず、腎臓の臓器発生においても、隣のコンパートメントである集合管や尿管芽の発生の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。

このような結果から、Tcf21 を押さえておくような治療が、腎臓の線維化には有用である可能性がある。ポドサイトを補充する治療の開発には至らなかったものの、末期腎不全に至る共通病態である腎臓の線維化について、今までなかった治療ターゲットを見いだすことができたと考えている。

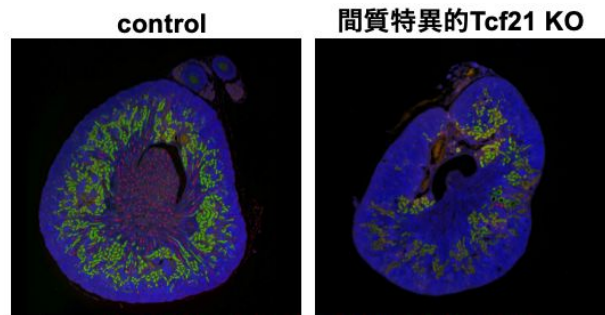


図5 LTL:近位尿管芽マーカー-AQP2: 集合管マーカー

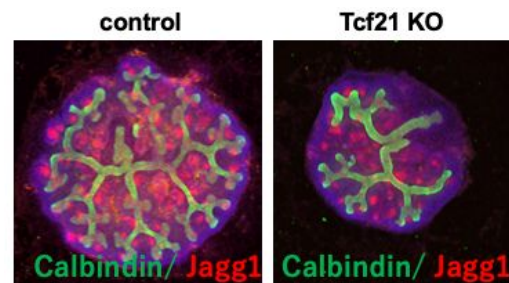


図6

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Koshizaka M, Ishikawa K, Ishibashi R, Maezawa Y, Sakamoto K, Uchida D, Nakamura S, Yamaga M, Yokoh H, Kobayashi A, Onishi S, Kobayashi K, Ogino J, Hashimoto N, Tokuyama H, Shimada F, Ohara E, Ishikawa T, Shoji M, Ide S, Ide K, Baba Y, Hattori A, Kitamoto T, Horikoshi T, Shimofusa R, Takahashi S, Nagashima K, Sato Y, Takemoto M, Newby LK, Yokote K, Comparing the effects of ipragliflozin versus metformin on visceral fat reduction and metabolic dysfunction in Japanese patients with type 2 diabetes treated with sitagliptin: A prospective, multicentre, open-label, blinded-endpoint, randomized controlled study (PRIME-V study).; PRIME-V Study Group. *Diabetes Obes Metab*. 査読有. 2019 Apr 17. doi: 10.1111/dom.13750. [Epub ahead of print] PMID:30993861

Yokote K, Yamashita S, Arai H, Araki E, Suganami H, Ishibashi S, Of The K-Study Group OB. Long-Term Efficacy and Safety of Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Modulator (SPPARM α), in Dyslipidemic Patients with Renal Impairment. *Int J Mol Sci*. 査読有. 2019 Feb 6;20(3). pii: E706. doi: 10.3390/ijms20030706. PMID: 30736366

Danne T, Garg S, Peters AL, Buse JB, Mathieu C, Pettus JH, Alexander CM, Battelino T, Ampudia-Blasco FJ, Bode BW, Cariou B, Close KL, Dandona P, Dutta S, Ferrannini E, Fourlanos S, Grunberger G, Heller SR, Henry RR, Kurian MJ, Kushner JA, Oron T, Parkin CG, Pieber TR, Rodbard HW, Schatz D, Skyler JS, Tamborlane WV, Yokote K, Phillip M. International Consensus on Risk Management of Diabetic Ketoacidosis in Patients with Type 1 Diabetes Treated with Sodium-Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors. *Diabetes Care*. 査読有. 2019 Feb 6. pii: dc182316. doi: 10.2337/dc18-2316. [Epub ahead of print] PMID: 30728224

Ide S, Finer G, Maezawa Y, Onay T, Souma T, Scott R, Ide K, Akimoto Y, Li C, Ye M, Zhao X, Baba Y, Minamizuka T, Jin J, Takemoto M, Yokote K, Quaggin SE. Transcription Factor 21 Is Required for Branching Morphogenesis and Regulates the Gdnf-Axis in Kidney Development. *J Am Soc Nephrol*. 査読有. 2018 Dec;29(12):2795-2808. doi: 10.1681/ASN.2017121278. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30377232

Maezawa Y, Yokote K. Human glomerular transcriptome of diabetic kidneys: Can the podocyte cytoskeleton be a therapeutic target? *J Diabetes Investig*. 査読有. 2019 Mar;10(2):224-226. doi: 10.1111/jdi.12951. Epub 2018 Nov 8. No abstract available. PMID: 30290070

Nagano H, Hashimoto N, Nakayama A, Suzuki S, Miyabayashi Y, Yamato A, Higuchi S, Fujimoto M, Sakuma I, Beppu M, Yokoyama M, Suzuki Y, Sugano S, Ikeda K, Tatsuno I, Manabe I, Yokote K, Inoue S, Tanaka T. p53-inducible DPYSL4 associates with mitochondrial supercomplexes and regulates energy metabolism in adipocytes and cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有. 2018 Aug 14;115(33):8370-8375. doi: 10.1073/pnas.1804243115. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30061407

Ishibashi R, Takemoto M, Tsurutani Y, Kuroda M, Ogawa M, Wakabayashi H, Uesugi N, Nagata M, Imai N, Hattori A, Sakamoto K, Kitamoto T, Maezawa Y, Narita I, Hiroi S, Furuta A, Miida T, Yokote K. Immune-mediated acquired lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: A case report and literature review. *J Clin Lipidol*. 査読有. 2018 Jul - Aug;12(4):888-897.e2. doi: 10.1016/j.jacl.2018.05.002. Epub 2018 May 15. PMID: 29937398

Itoh H, Komuro I, Takeuchi M, Akasaka T, Daida H, Egashira Y, Fujita H, Higaki J, Hirata KI, Ishibashi S, Isshiki T, Ito S, Kashiwagi A, Kato S, Kitagawa K, Kitakaze M, Kitazono T, Kurabayashi M, Miyauchi K, Murakami T, Murohara T, Node K, Ogawa S, Saito Y, Seino Y, Shigeeda T, Shindo S, Sugawara M, Sugiyama S, Terauchi Y, Tsutsui H, Ueshima K, Utsunomiya K, Yamagishi M, Yamazaki T, Yo S, Yokote K, Yoshida K, Yoshimura M, Yoshimura N, Nakao K, Nagai R; EMPATHY Investigators. Intensive Treat-to-Target Statin Therapy in High-Risk Japanese Patients With Hypercholesterolemia and Diabetic Retinopathy: Report of a Randomized Study. *Diabetes Care*. 査読有. 2018 Jun;41(6):1275-1284. doi: 10.2337/dc17-2224. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29626074

Ide K, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Ishikawa T, Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. N-3 polyunsaturated fatty acids improve lipoprotein particle size and concentration in Japanese patients with type 2 diabetes and hypertriglyceridemia: a pilot study. *Lipids Health Dis*. 査読有. 2018 Mar 15;17(1):51. doi: 10.1186/s12944-018-0706-8. PMID: 29544483

Shoji M, Takemoto M, Kobayashi K, Shoji T, Mori S, Sagara JI, Kurosawa H, Hirayama Y, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Serum podocalyxin levels correlate with carotid intima media thickness, implicating its role as a novel biomarker for atherosclerosis. *Sci Rep*. 査読有. 2018 Jan 10;8(1):245. doi: 10.1038/s41598-017-18647-6. PMID: 29321582

Kitamoto T, Sakurai K, Lee EY, Yokote K, Accili D, Miki T. Distinct roles of systemic and local actions of insulin on pancreatic β -cells. *Metabolism*. 査読有. 2018 May;82:100-110. doi: 10.1016/j.metabol.2017.12.017. Epub 2018 Jan 7. PMID: 29320716

Araki E, Yamashita S, Arai H, Yokote K, Satoh J, Inoguchi T, Nakamura J, Maegawa H, Yoshioka N, Tanizawa Y, Watada H, Suganami H, Ishibashi S. Effects of Pemafibrate, a Novel Selective PPAR α Modulator, on Lipid and Glucose Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes and Hypertriglyceridemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Diabetes Care*. 査読有. 2018 Mar;41(3):538-546. doi: 10.2337/dc17-1589. Epub 2018 Jan 3. PMID: 2929880

〔学会発表〕(計 7 件)

Overview of clinical trials with a SPPARM α in patients with dyslipidaemia: Japanese and European experience. 口頭, Yokote K. International Atherosclerosis Society Joint Symposium : The Selective Peroxisome Proliferator – Activated Receptor Alpha Modulator (SPPARM α) Concept. 2018/11/24, 海外.

Comparison of ipragliflozin and metformin for visceral fat reduction in elderly patients with type 2 diabetes: a prospective, blinded-endpoint, randomised controlled study. ポスター, Koshizaka M, Yokote K et al. European Association for the Study of Diabetes 54th Annual Meeting, 2018/10/4, 海外

Comparing the Effects of Ipragliflozin and Metformin on Visceral Fat Reduction in Patients with Type 2 Diabetes Inadequately Controlled with Sitagliptin–A Prospective, Multicenter, Blinded-Endpoint, Randomized Controlled Study in Japan (PRIME-V Study). 口頭, Koshizaka M, Yokote K et al. the American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions, 2018/6/25, 海外.

Human model of accelerated aging and atherosclerosis. 口頭, Yokote K. 18th International symposium on atherosclerosis. 2018/6/10, 海外.

井出真太郎、前澤善朗、Scott Rizardy、Onay Tuncerm、井出佳奈、竹本稔、秋元義弘、Susan Quaggin、横手幸太郎 (2018) 糖尿病腎症における転写調節因子 Tcf21 の機能解析。第 61 回日本糖尿病学会学術総会、5月24日、東京

正司真弓、前澤善朗、竹本稔、小林一貴、越坂理也、石川崇広、井出真太郎、井出佳奈、横手幸太郎 (2018) 血中ポドカリキシン(Podocalyxin:Podxl)値と頸動脈内膜中膜肥厚度(IMT)との関連についての検討 (ポスター)、第 116 回日本内科学会総会、4月14日、京都

井出真太郎、前澤善朗、Gal Finer、Rizaldy Scott、Tuncer Ona、竹本稔、秋元義弘、Susan Quaggin、横手幸太郎 (2018) 転写因子 Tcf21 は腎臓発生において Gdnf 経路を介して尿管芽の分岐を制御する。第 55 回日本臨床分子医学会学術集会、4月13日、京都 (学術奨励賞)

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：前澤 善朗

ローマ字氏名：Maezawa Yoshiro

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：80436443

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。