

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08181

研究課題名(和文)系球体上皮細胞障害における転写因子CTCFと腎内RAS活性化の役割検討

研究課題名(英文)The role of CTCF and infrarenal renin-angiotensin system activation in podocyte injury

研究代表者

漆原 真樹 (URUSHIHARA, Maki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部医学域・教授

研究者番号：50403689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では遺伝子間の相互干渉を防ぐ仕組みであるインシュレーターの系球体上皮細胞における役割を解明し腎内レニン・アンジオテンシン系活性化による蛋白尿の新たな病態機序を解明する。系球体上皮細胞特異的にインシュレーターCTCFをノックアウトしたマウスは上皮細胞の虚脱変化が認められた。さらにアンジオテンシン受容体拮抗薬を投与すると上皮細胞障害が軽減していた。また尿蛋白量も低下し腎機能も改善していた。また単離培養した上皮細胞はアンジオテンシンIIの刺激によりポドシンの発現が低下しアポトーシス細胞が増加していた。CTCF制御による腎内RAS活性化の系球体上皮細胞障害の新たな病態機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、蛋白尿の原因として系球体上皮細胞とその足細胞突起間に存在するスリット膜による蛋白濾過障壁機構の破綻が着目され、難治性の腎病態解明の治療戦略が期待されている。また、レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system: RAS) と系球体上皮細胞は密接な関係があり、アンジオテンシンII刺激により細胞生存や分化異常、スリット膜関連分子の発現低下が起こり系球体硬化を誘導する。本研究では遺伝子間の相互干渉を防ぐ仕組みであるインシュレーターCTCFの系球体上皮細胞における役割を解明し腎内RAS活性化による蛋白尿の新たな病態機序を解明し有効な治療法となり得ることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effects of CTCF deficiency. Podocyte-specific CTCF knockout mice developed severe progressive proteinuria and impaired renal function. We showed that angiotensin II type 1 receptor blockers suppress the development of glomerulonephritis and podocyte apoptosis in podocyte-specific CTCF knockout mice. We also investigated the changes in the expression of podocin in podocyte cell cultures with or without stimulation with angiotensin II from isolated glomeruli from podocyte-specific CTCF knockout mice. Podocin expression decreased in cell cultures stimulated with angiotensin II. These results suggest that RAS is involved in the development of glomerulonephritis and the induction of podocyte apoptosis in podocyte-specific CTCF knockout mice, and that CTCF may be necessary for RAS control in podocytes.

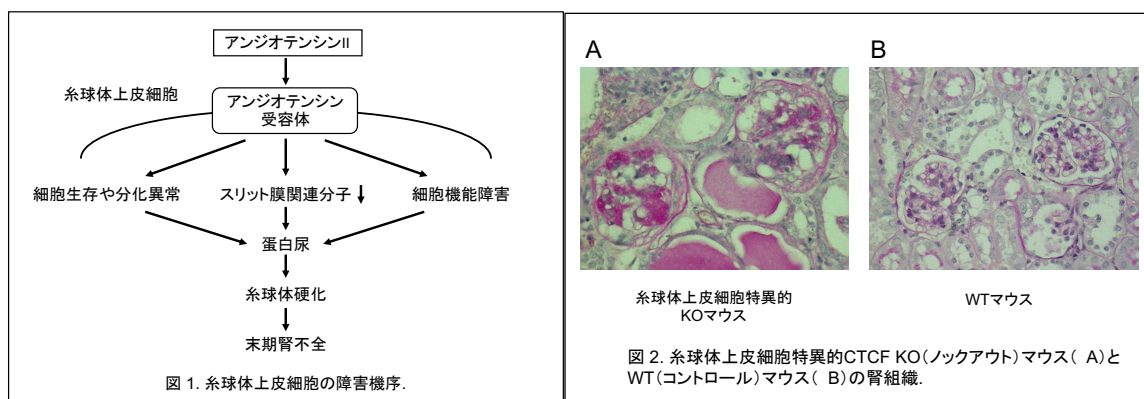
研究分野：小児腎臓病学

キーワード：系球体上皮細胞 レニン-アンジオテンシン系

## 1. 研究開始当初の背景

学校検尿の普及により小児の慢性腎臓病は早期に発見され治療を開始するため末期腎不全への進展を防げるようになったが、巣状分節性糸球体硬化症などの難治性の病態の予後改善は未だ不十分である。近年、蛋白尿の原因として糸球体上皮細胞とその足細胞突起間に存在するスリット膜による蛋白濾過障壁機構の破綻が着目され、難治性の腎病態解明の治療戦略が期待されている。また、またレニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system: RAS) と糸球体上皮細胞は密接な関係があり、アンジオテンシン II 刺激により細胞生存や分化異常、スリット膜関連分子の発現低下が起こり糸球体硬化を誘導する (図1)。

研究代表者らの最新の研究でインシュレーターの構成蛋白の一つである CTCF を糸球体上皮細胞特異的にノックアウトしたマウスを作製したところ上皮細胞の虚脱変化を認めるといへ興味深い知見を得た (図2)。本研究では遺伝子間の相互干渉を防ぐ仕組みであるインシュレーターの糸球体上皮細胞における役割を解明し腎内 RAS 活性化による蛋白尿の新たな病態機序を解明することにより効果的な治療法を探求する。



## 2. 研究の目的

転写調節因子である CTCF により制御される腎内 RAS 活性化による糸球体上皮細胞障害の病態機序を解明する。そのために糸球体上皮細胞特異的 CTCF ノックアウトマウスにおける上皮細胞障害の形態観察やアンジオテンシン受容体拮抗薬投与による治療効果と培養糸球体上皮細胞の RAS による細胞動態とその役割を明らかにすることを具体的な目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 糸球体上皮細胞特異的 CTCF ノックアウトマウスへの RAS 阻害薬投与

NPHS2 遺伝子改変マウスと Cre-recombinase 遺伝子導入マウスを交配させ糸球体上皮細胞特異的 CTCF ノックアウトマウスを作製した。上皮細胞の虚血性変化による糸球体障害や半月体を呈するためアンジオテンシン受容体拮抗薬を投与し治療効果をみた。腎臓を摘出して免疫染色のようなパラフィン切片と凍結切片を作成した。一部の組織はエポキシ樹脂包埋し電子顕微鏡による詳細な形態観察をした。さらにマウスの尿や血液を採取して尿蛋白定量、腎機能を測定した。

### (2) アンジオテンシン II 刺激による培養糸球体上皮細胞の検討

糸球体上皮細胞特異的 CTCF ノックアウトマウスより糸球体を採取し、上皮細胞を単離培養した。アンジオテンシン II の刺激を与え、スリット膜関連分子であるポドシンの発現とアポトーシスを評価するため TUNEL 染色を行った。

## 4. 研究成果

糸球体上皮細胞特異的 CTCF ノックアウトマウスは電子顕微鏡による観察で糸球体基底膜の肥厚、足突起の消失が認められた (図3)。さらにアンジオテンシン受容体拮抗薬を投与すると糸球体

上皮細胞障害が軽減していた（図4）。また無治療群と比較して尿蛋白量も低下し腎機能も改善していた。

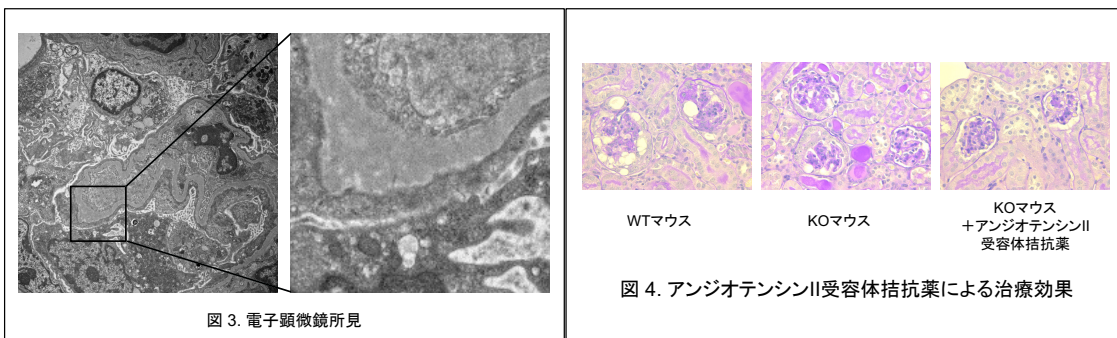


図 3. 電子顕微鏡所見

図 4. アンジオテンシンII受容体拮抗薬による治療効果

また糸球体上皮細胞特異的CTCF ノックアウトマウスより単離培養した糸球体上皮細胞はアンジオテンシン II の刺激によりポドシンの発現が低下しアポトーシス細胞が増加していた（図5）。

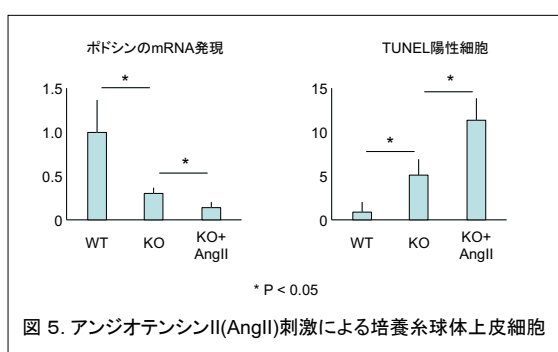


図 5. アンジオテンシンII(AngII)刺激による培養糸球体上皮細胞

これらの結果から、インシュレーターCTCF 制御による腎内 RAS 活性化の糸球体上皮細胞障害の新たな病態機序が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	香美 祥二  (KAGAMI Shoji)  (00224337)	徳島大学・病院・病院長    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関