

令和元年6月15日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09619

研究課題名(和文)新規遺伝子改変法によるメサンギウムの糸球体形成と糖尿病性腎症への系譜的役割の解明

研究課題名(英文)The role of mesangial cells in glomeruli formation and the development of diabetic kidney disease

研究代表者

長井 幸二郎(NAGAI, Kojiro)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：40542048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroでは腎臓からより簡便に効率よくメサンギウム細胞を培養する方法を確立した。In vivoではメサンギウム細胞から目的とする遺伝子発現を欠失するマウスの作成法を確立した。そのマウスを利用してTSC1をメサンギウム細胞から欠失させ、mTOR経路を活性化することにより、メサンギウム細胞にて形質変化がおこることをin vivoにて世界で初めて証明できた。次に、糖尿病性腎症の発症進展に重要なサイトカインであるBMP-4やTGF- β 1を糸球体で過剰発現させることにより、糖尿病性腎症に類似した病変ができることを示した。Wnt/b-catenin経路のメサンギウム細胞における役割を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症を代表とする慢性腎臓病は透析導入原疾患であるとともに心血管系疾患のリスクが高く、対応が急務であるが、現存の治療法では明らかに不十分である。その進展増悪機構を理解するのに、主に慢性腎臓病の初期に病変がおこるメサンギウム細胞の役割解明は必須であるが、これまでその方法に乏しかった。今回の研究でin vitroにおいてはメサンギウム細胞の効率的な単離培養法が確立された。in vivoではメサンギウム細胞特異的な目標分子の役割をしらべるシステムを確立し、慢性腎臓病の原因の一つを同定することができた。よって新規治療法の確立に大きく寄与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In vitro, we could modify the method to harvest mesangial cells from mouse kidney efficiently. In vivo, we could establish the protocol to raise mesangium-specific gene modified mice by a Cre-loxP system. To activate mTORC1-S6 kinase pathway, TSC1 (the upstream inhibitory molecule of the pathway) was deleted in mesangial cells. mTORC1-S6 kinase pathway activation could induce mesangial expansion and sclerotic phenotypic change. We also made the mice which had BMP-4 or TGF- β 1 overexpression in glomeruli. BMP-4 could cause the lesion which mimicked human diabetic kidney disease. The mice which had Wnt/b-catenin pathway activation in mesangial cells were developed. The analysis of the phenotype is in progress.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：メサンギウム細胞 糸球体硬化 細胞内シグナル伝達 糖尿病性腎症 慢性腎臓病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は世界的に増加しており、透析導入原疾患の第1位であり、同時に心血管系疾患の発症リスクが高く、対応が急務である。腎症発症進展に TGF- β 1 や Angiotensin II といったサイトカインが関わっており、アンジオテンシン受容体阻害薬が進行抑制に有効だが、効果は不十分で、新しい治療目標が必須である。治療目標探索のためにはヒトの糖尿病性腎症に類似した動物モデルが必要であるが、現在糖尿病性腎症モデルはヒトと同様の、進行した特徴的病変である結節性硬化や蛋白尿、腎不全を来さない。

糖尿病性腎症の結節性硬化、蛋白尿、腎不全へ至る機序を研究するために、糸球体構成細胞各々における責任因子の役割の解明が必要である (J Clin Invest. 2014;124:2333-40.)。よって主要なサイトカイン産生部位と考えられ、腎症初期に下流因子の影響で病変が形成されるメサンギウム細胞の *in vivo* での機能解析は不可欠であるが、メサンギウム細胞は特異的なマーカーがなく、細胞特異的な遺伝子調節は不可能であったため、その役割は不明な点が多い。しかし、タモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウス (Am J Pathol. 2010;176:85-97.) が報告され、Cre recombinase が糸球体では、メサンギウム細胞に発現することがわかり、メサンギウム細胞の *in vitro*, *in vivo*、特に成体における機能解析が初めて可能となった。また Foxd1-Cre マウスは Cre recombinase が、出生時には糸球体では、メサンギウム細胞に発現する (Development. 2014;141:346-54.)。成体になると糸球体全体に発現する。このマウスを使うと出生時のメサンギウム細胞における目的分子の役割が解明可能である。

申請者はこれまでメサンギウム細胞における mTOR 経路の機能に注目し、糖尿病性腎症や腎炎への寄与を解明してきた (PLoS One. 2013; 8: e66759. など)。

また Wnt/b-catenin 経路は、申請者が解析に関わった、骨、軟骨に特徴的な細胞外基質の制御因子であり結節性硬化制御因子候補の SOX9 (J Biol Chem. 2011; 286:32162-9.) と相互作用する (Genes Dev. 2004;18:1072-87.)。BMP4-smad1 の発現調整因子で (Bone Res. 2015;3:15005.)、ヒト糖尿病性腎症糸球体での活性化、発現上昇が SOX9 と共に報告されている (Diabetes. 2011;60:2354-69. J Biol Chem. 2011;28:26003-15.)。その役割は細胞依存性で、形質転換やアポトーシスなどの調節因子であるが、メサンギウム細胞における役割は未解明である。

2. 研究の目的

- (1) *in vitro* にて、実験動物からメサンギウム細胞を単離培養するプロトコールを改変し、メサンギウム特異的遺伝子改変マウスから培養メサンギウム細胞実験への系を確立する。
- (2) *in vivo* にてメサンギウム細胞において、mTOR 経路の活性化をおこすとメサンギウム細胞増殖、基質増加、硬化をおこし、ヒト腎疾患に類似した経過をたどるのか確認する。
- (3) *in vivo* にて、メサンギウム細胞において、サイトカイン BMP4 や TGF- β 1 やその下流因子である SOX9 や Wnt/b-catenin 経路が発生時糸球体形成に影響を及ぼすか検討する。
- (4) *in vivo* にて、メサンギウム細胞において、サイトカイン BMP4 や TGF- β 1 やその下流因子である SOX9 や Wnt/b-catenin 経路が、成体においてヒト糖尿病性腎症の経過に矛盾しないメサンギウム基質増加、基底膜肥厚といった組織変化につづいて蛋白尿を呈し、最終的に特徴的な結節性硬化を形成、その後、糸球体硬化、腎不全といった病態を起こすのか。すなわちヒト糖尿病性腎症の発症進展に中心的な役割をはたすのはメサンギウム細胞か、podocyte か、両方なのか、を明らかにする。

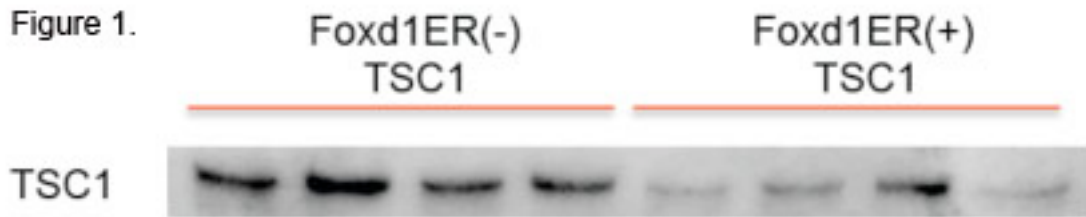
3. 研究の方法

- (1) *in vitro* にて、dynabeads method (Am J Pathol. 2002;161:799-805.) で糸球体単離したあと、更にクローニングリングにて糸球体のみを採取、細胞培養し、今まで採用していた sieving method と比較してその効率を検討する。
- (2) *in vivo* にてタモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウスと下流の mTOR 経路に対して抑制的に働き、細胞増殖や肥大の制御を行っている TSC1 の floxed マウスを掛け合わせることでメサンギウム特異的 mTOR 経路活性化マウスを作成及び解析する。mTOR 経路の活性化をヒト腎生検組織で起こっているかを確認する。
- (3,4) *in vivo* にて、Foxd1-Cre マウス、タモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウスと Cre 依存的 BMP4 過剰発現マウスや Cre 依存的 TGF- β 1 過剰発現マウスを掛け合わせることでメサンギウム細胞特異的 BMP4 and/or TGF- β 1 過剰発現マウスの作成及び解析、Podocin-Cre マウスを使用した Podocyte におけるサイトカインの強発現マウスとの病変の比較を行う。
- in vivo* Foxd1-Cre マウス、タモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウスと Cre 依存的 SOX9 過剰発現マウス、Cre 依存的安定化 b-catenin 発現マウスを掛け合わせることでメサンギウム細胞特異的 SOX9 過剰発現マウス、b-catenin 活性化マウスの作成及び解析する SOX9、b-catenin のヒト腎生検組織での発現を確認する。

4. 研究成果

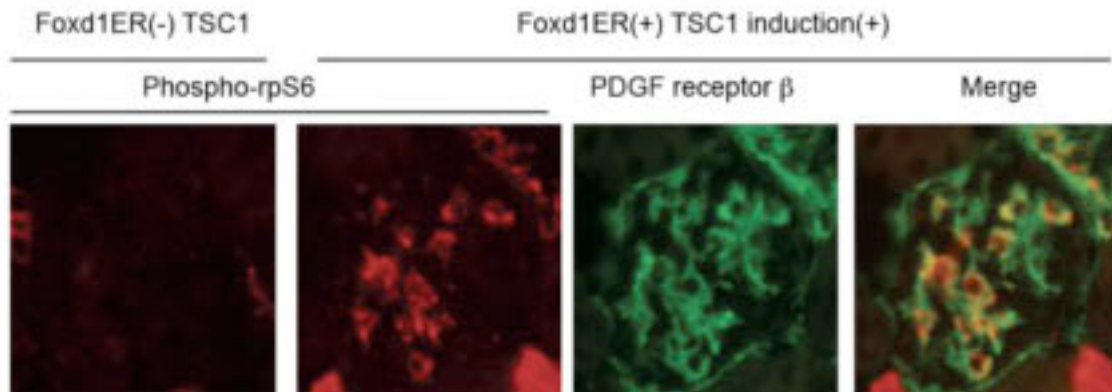
- (1) *in vitro* にて、dynabeads method にて糸球体単離したところクローニングリングを使用しなくても良いほどにその純度が高いため、効率的にメサンギウム細胞を単離培養できることを発見し、そのプロトコールを確立した。この手法をもちいて、メサンギウム特異的 TSC1 ノックアウトマウス (Foxd1ER(+)) TSC1 マウスからメサンギウム培養を単離培養し、TSC1 発現が低下し

ていることが確認できた (Figure 1)。



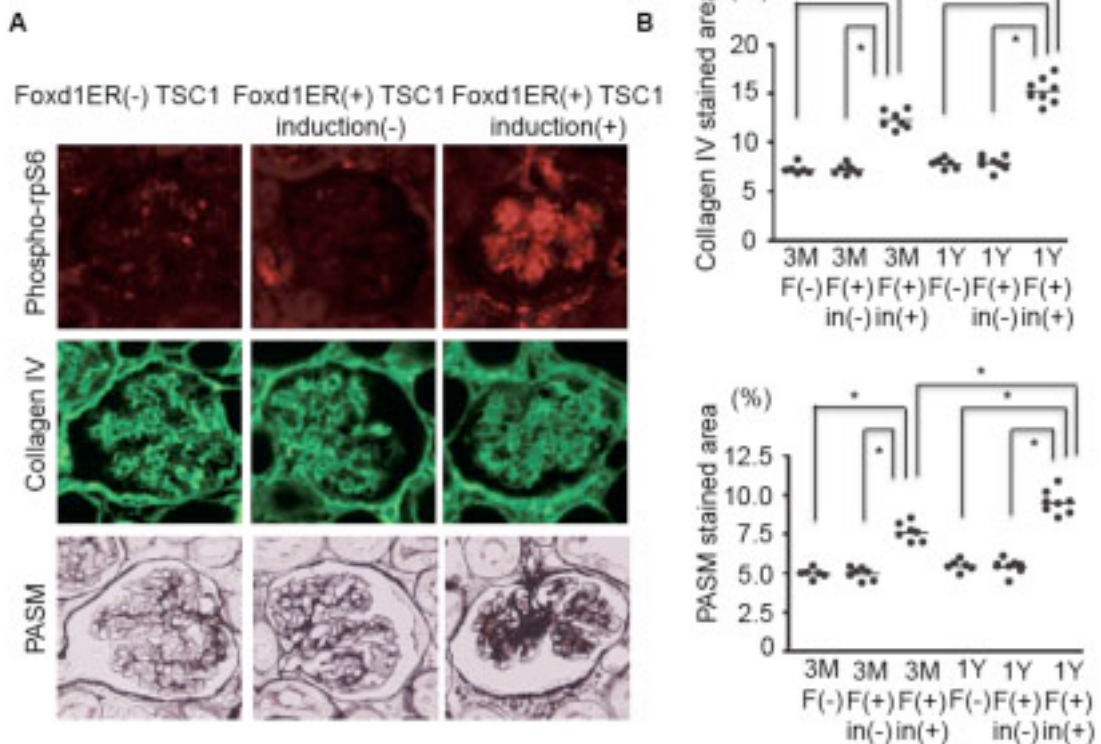
(2) *in vivo* にてタモキシフェン誘導型 Foxd1-Cre マウスと下流の mTOR 経路に対して抑制的に働き、細胞増殖や肥大の制御を行っている TSC1 の floxed マウスを掛け合わせることにより Foxd1ER(+)
TSC1 マウスを解析した。メサンギウム細胞で mTOR 経路が活性化していることを surrogate marker である Phospho-rpS6 の染色で確認できた (Figure 2)。

Figure 2.



ヒト腎疾患においてメサンギウム細胞における組織学的変化としてメサンギウム基質拡大と細胞増殖、形質変化が代表的であるが、Foxd1ER(+)
TSC1 マウスにて生後 3 ヶ月からメサンギウム基質拡大がおきていることが Collagen IV 染色と PASM 染色で確認できた (Figure 3)。

Figure 3.



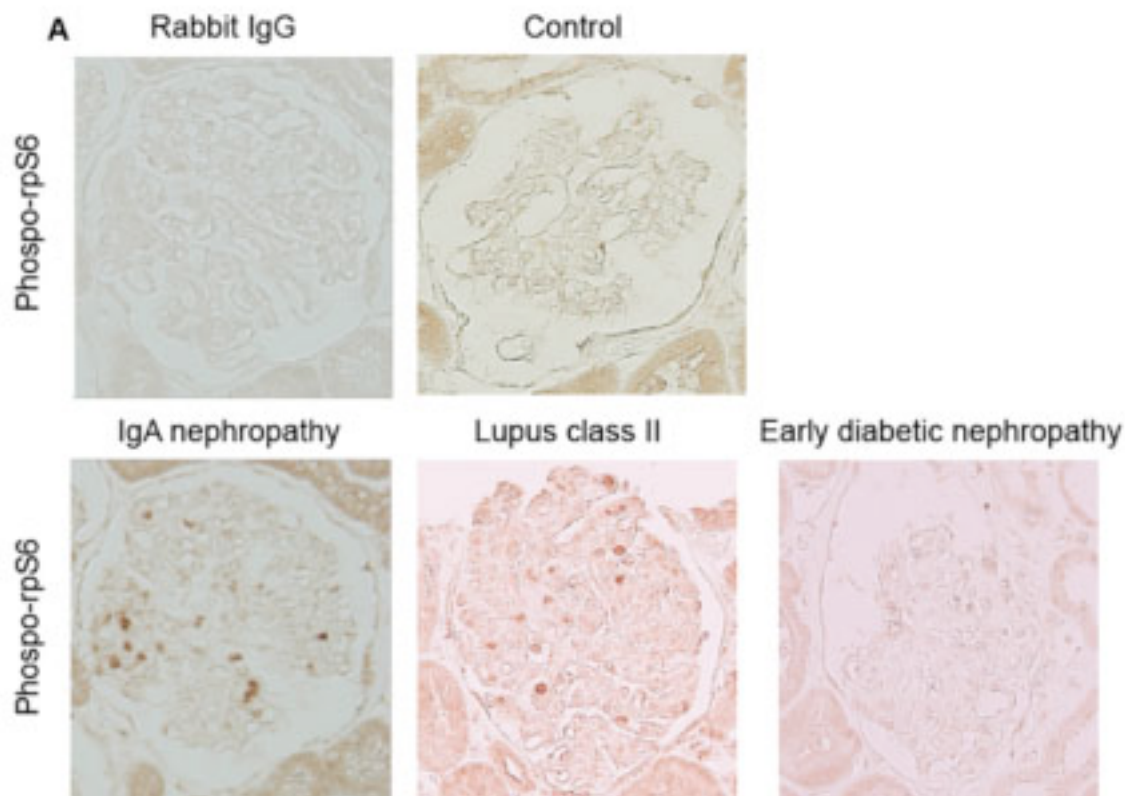
さらに Foxd1ER(+)
TSC1 マウスにてメサンギウム細胞の形質変化がおきていることが alpha-smooth muscle actin と Collagen I 染色で確認できた。

しかし、Foxd1ER(+)
TSC1 マウスにて、メサンギウム細胞は Ki-67 染色にて有意に増殖していなかった。以上から、mTOR 経路はメサンギウム基質拡大や形質変化の責任経路であるが、細胞増殖の原因とならないことが示された。これは mTOR 経路の活性化抑制剤であるラパマイシン投与により、基質拡大が抑制されることから確認できた。

またヒト腎疾患で予後規定因子となる蛋白尿の主体となるアルブミン尿はこのマウスでは排出が増加していなかった。よってメサンギウム細胞の形質変化のみでは蛋白尿が排出されないことが証明され、podocyte 障害が蛋白尿排出に重要であることが示唆された。

最後にヒト腎生検組織でも IgA 腎症やループス腎炎の患者の組織にてメサンギウム細胞で mTOR 経路が活性化していることを Phospho-rpS6 の染色で確認できた (Figure 4)。以上からメサンギウム細胞における mTOR 経路の活性化が、ヒト腎疾患の病変形成に直接関与していることを *in vivo* にて世界で初めて証明できた (J Am Soc Nephrol. 2017;28:2879-2885)。

Figure 4.



(3, 4) *in vivo* にて、Podocin-Cre マウスを使用した Podocyte における BMP4 過剰発現マウスにおいて、Podocyte にアポトーシスが誘導されることによってヒト糖尿病性腎症類似病変がおこることを確認し、報告した (Sci Rep. 2018;8:13011)。メサンギウム細胞特異的 BMP4 過剰発現マウスは現在作成中であり、今後上記マウスとの病変の比較を行う。

また、Podocin-Cre マウスを使用した Podocyte における TGF- β 1 過剰発現マウスにおいて、病変形成をみとめ、かつ、Podocyte とメサンギウム細胞各々への異なった影響を及ぼすことを確認した。そのメカニズムを *in vitro* で確認中である。また、メサンギウム細胞特異的 TGF- β 1 過剰発現マウスと病変およびメカニズムを比較解析中である。

in vivo にてメサンギウム細胞特異的 b-catenin 活性化マウスの作成をし、現在その病変を解析すると共に、その解析結果を確認するための動物数をそろえている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Tamaki Masanori, [Tominaga Tatsuya](#), Fujita Yui, Koezuka Yasuhiko, Ichien Go, Murakami Taichi, [Kishi Seiji](#), Yamamoto Keiichi, Abe Hideharu, [Nagai Kojiro](#), Doi Toshio
All-trans retinoic acid suppresses bone morphogenetic protein 4 in mouse diabetic nephropathy through a unique retinoic acid response element.
American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 査読有
316 巻 2019 年 E418-E431 DOI:10.1152/ajpendo.00218.2018

(2) Fujita Yui, [Tominaga Tatsuya](#), Abe Hideharu, Kangawa Yumi, Fukushima Naoshi, Ueda Otoy, Jishage Kou-ichi, [Kishi Seiji](#), Murakami Taichi, Saga Yumiko, Kanwar Yashpal S., [Nagai Kojiro](#), Doi Toshio
An adjustment in BMP4 function represents a treatment for diabetic nephropathy and podocyte injury
Scientific Reports 査読有
8 巻 2018 年 13011-13011 DOI:10.1038/s41598-018-31464-9

(3) Ono Hiroyuki, Abe Hideharu, Sakurai Akiko, Ochi Arisa, Tominaga Tatsuya, Tamaki Masanori, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Nagai Kojiro, Kohashi Masayuki, Doi Toshio
Novel Interplay Between Smad1 and Smad3 Phosphorylation via AGE Regulates the Progression of Diabetic Nephropathy
Scientific Reports 査読有
8 巻 2018 年 10548-10548 DOI:10.1038/s41598-018-28439-1

(4) Doi Toshio, Moriya Tatsumi, Fujita Yui, Minagawa Naoto, Usami Masaru, Sasaki Tomoko, Abe Hideharu, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Ouchi Motoshi, Ichien Go, Yamamoto Keiichi, Ikeda Hiroki, Koezuka Yasuhiko, Takamatsu Norimichi, Shima Kenji, Mauer Michael, Nagai Kojiro, Tominaga Tatsuya
Urinary IgG4 and Smad1 Are Specific Biomarkers for Renal Structural and Functional Changes in Early Stages of Diabetic Nephropathy
Diabetes 査読有
67 巻 2018 年 986-993 DOI:10.2337/db17-1043

(5) Nagai Kojiro, Tominaga Tatsuya, Ueda Sayo, Shibata Eriko, Tamaki Masanori, Matsuura Motokazu, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Moriya Tatsumi, Abe Hideharu, Doi Toshio
Mesangial Cell Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Activation Results in Mesangial Expansion.
Journal of American Society of Nephrology 査読有
28 巻 2017 年 2879-2885 DOI: 10.1681/ASN.2016111196

[学会発表] (計 5 件)

(1) 長井 幸二郎

成体腎疾患におけるメサンギウム細胞の in vivo での機能解析
第 52 回日本臨床腎移植学会 2019 年

(2) Tamaki Masanori, Tominaga Tatsuya, Fujita Yui, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Nagai Kojiro, Abe Hideharu, Doi Toshio
Mesangial Matrix Expansion Attenuated by All-Trans Retinoic Acid Through Direct Suppression of Bone Morphogenetic Protein 4 in Mouse Diabetic Nephropathy
KIDNEY WEEK 2018 American Society of Nephrology 2018 年

(3) 長井 幸二郎

メサンギウム細胞の機能解析による CKD 病態解明
第 48 回日本腎臓学会西部学術大会 2018 年

(4) Fujita Yui, Tominaga Tatsuya, Murakami Taichi, Kishi Seiji, Nagai Kojiro, Abe Hideharu, Doi Toshio
The Role of BMP4 Signal Pathway on the Podocyte Injury in Diabetic Early Stage
KIDNEY WEEK 2016 American Society of Nephrology 2016 年

(5) Nagai Kojiro, Tominaga Tatsuya, Murakami Taichi, Shibata Eriko, Kishi Seiji, Matsuura Motokazu, Abe Hideharu, Doi Toshio
In vivo evidence of mTORC1-S6 kinase pathway involvement in the development of glomerulosclerosis in human IgA nephropathy
KIDNEY WEEK 2016 American Society of Nephrology 2016 年

[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 :

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tokudai-kidney.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：岸 誠司

ローマ字氏名：(KISHI, Seiji)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：助教

研究者番号（8 桁）：10519507

研究分担者氏名：富永 辰也

ローマ字氏名：(TOMINAGA, Tatsuya)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：80425446

※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。