

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15469

研究課題名(和文)ネフリンレポーターマウスを用いた新規ポドサイト保護薬の探索

研究課題名(英文)Screening of novel podocyte protective reagents using nephrin reporter mice

研究代表者

森 潔 (Mori, Kiyoshi)

静岡県立大学・薬学部・特任教授

研究者番号：60343232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ネフリンは糸球体濾過バリアの主要構成要素であり、ネフリン発現の減少は糸球体疾患の初期に共通して観察されるため、ポドサイトにおけるネフリン発現を増加させる方法は治療的意義を有する。本研究ではネフリンプロモーター配列を用いてenhanced green fluorescent protein (EGFP)の発現を調節するノックインマウスを作製した。このマウスから糸球体を単離し培養すると、ポドサイトにおけるEGFPシグナルは培養5日後に半減したが、ビタミンDを添加するとシグナルは4倍に増加した。ネフリン遺伝子発現を増加させる化合物のスクリーニングに用いることができるマウスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Nephrin is a critical component of glomerular filtration barrier. Downregulation of nephrin expression is commonly observed at early stage of glomerular disorders, suggesting that methods to increase nephrin expression in podocytes may have therapeutic utility. Here, we generated a knockin mouse line carrying single copy of 5.5 kb nephrin promoter controlling expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) at Rosa26 genomic locus (Nephrin-EGFP mouse). Next, we isolated and cultivated glomeruli from these mice, and developed a protocol to automatically quantitate EGFP expression in cultured glomeruli. EGFP signal was markedly reduced after 5 days of culture but reduction was inhibited by vitamin D treatment. Thus, we generated a mouse line converting nephrin promoter activity into fluorescence, which can be used to screen compounds having activity to enhance nephrin gene expression.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓内科学 糸球体 ポドサイト 化合物ライブラリー スクリーニング レポーターアッセイ

1. 研究開始当初の背景

ネフリンは糸球体構造を維持し蛋白尿を防止するために重要な働きをしており、糸球体疾患に伴い減少したネフリン発現を増加させる方法は治療的意義を有する可能性がある。特定の目的をもった化合物をスクリーニングするためには、レポータープラスミドを過剰発現させた培養細胞がしばしば用いられるが、プラスミドのゲノム挿入部位やコピー数によるバラツキの影響を受けやすい。DNA断片を microinjection して作製するトランスジェニックマウスでも同様の問題が発生する。

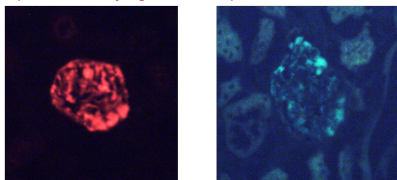
2. 研究の目的

本研究ではゲノムの特定部位に1コピーだけ外来DNAの挿入を可能とする pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT)法を用いて、ネフリンレポーターマウスを作製し、薬物スクリーニングにおける有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) ROSA26ゲノムローカスに変異型 loxP 配列を有する PITT シードマウスに対して、5.5kb ネフリンプロモーター配列の支配下にEGFPを発現するカセットを挿入し、ネフリンレポーターマウスを作製した。想定外のトラブルに備えるために常法に従い Neph1-mCherry transgenic mice も作製した(下図)。

Neph1-mCherry Tg mice Neph1-EGFP knockin mice



(2) マウスより磁気ビーズ法を用いて高純度糸球体を単離し、96 well plate に 100-150 個/well で播種した。プレートへの接着性および薬剤応答性を指標に予備検討を行い、牛血清(FBS)を最初3日間は10%、次の2日間は0.5%とした。

(3) 京都大学大学院医学研究科・医学研究支援センターより化合物ライブラリーの供与を受け、DMSOに10mMで溶解し、終濃度10μM、1%DMSO、0.5%FBSで培養糸球体に添加した。

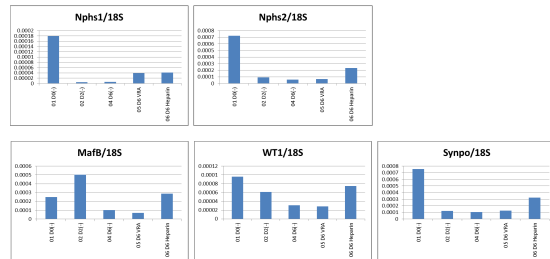
(4) 蛍光強度はパラホルムアルデヒドで軽固定後、ArrayScan VTI HCS Readerにより定量した。画像解析にはHCS Studio 2.0 Cell Analysis Softwareを用い、2000μm²以上の大きさのDAPI核染色集塊を糸球体を認定した。

4. 研究成果

ネフリンレポーターマウスでは確かに ROSA26 ローカスにレポーターが挿入されて

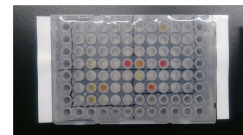
おり、ポドサイト特異的に緑色蛍光が観察された。単離糸球体の培養5日後にネフリンの遺伝子発現は15%、レポーターシグナルは50%に減少していた。培養4-5日後に50nMビタミンDを添加するとネフリンのmRNAは3.6倍、蛋白は2.7倍、レポーターシグナルは3.9倍に増加した。またヘパリン200U/mlの添加はポドサイト特異的分子である Neph1、Neph2、Mafk、Wt1、Symo などの遺伝子発現を増加させた(下図、3列目と5列目の棒グラフ比較)。

Heparin, 200 U/ml (1 mg/ml), days 4-6



さらに96 well plateを用いて、Prestwick Chemical、Calbiochem、Selleck Chemicalsの3社が保有する市販化合物のスクリーニングを行うと、強陽性、弱陽性を呈する多くのシグナルを得た。ビタミンDを陽性コントロールとしてヒット化合物の濃度を1/10、1/100に減らして再現性を検討するとビタミンDの効果は濃度依存性が小さいものの、強陽性ヒット化合物ではシグナルが1/10に減弱しており、元化合物を肉眼で見ると黄色やオレンジ色を呈しており、レポーター蛍光ではなく化合物自体のシグナルを検出している偽陽性であることが判明した(下図)。

Compound Name	Calbiochem Cat#	Compound Concentration (μM)	EGFP/Area Signals			
			0.01	0.1	1	10
Ro 31-8220	557320	Protein Kinase C Inhibitor	163	551*	8006*	0*
Gö 6983	365251	Protein Kinase C Inhibitor	111	179*	1385*	3554*
SU5416	676487	VEGFR2 Kinase Inhibitor III	139	149	344*	2109*
50 nM Vitamin D						(1977)
1% DMSO						(957)



次に765化合物のスクリーニングを行ったところ、40個の陽性化合物を得た。二次スクリーニングを行うと4個の化合物によりネフリン mRNA 発現が2倍以上に増加した。スクリーニングの規模を拡大すると共に、化合物の全身投与により、個体レベルで(病的)糸球体におけるネフリン発現を増加させるものがあるか今後さらに検討を進める。

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9件)

- 1) Tsuchida J, Matsusaka T, Ohtsuka M, Miura H, Okuno Y, Asanuma K, Nakagawa T,

- Yanagita M, Mori K. Establishment of Nephtrin Reporter Mice and Use for Chemical Screening. *PLoS One* 11:e0157497, 2016.
- 2) 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.
 - 3) Toyonaga T, Matsuura M, Mori K, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, Kobayashi T, Hibi T, Nakase H. Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages. *Sci Rep* 6:35014, 2016.
 - 4) 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* 28:278-289, 2017.
 - 5) Toda N, Yokoi H, Mori K, Mukoyama M. Production and Analysis of Conditional KO Mice of CCN2 in Kidney. *Methods Mol Biol* 1489:377-390, 2017.
 - 6) 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.
 - 7) Shirata N, Ihara KI, Yamamoto-Nonaka K, Seki T, Makino SI, Oliva Trejo JA, Miyake T, Yamada H, Campbell KN, Nakagawa T, Mori K, Yanagita M, Mundel P, Nishimori K, Asanuma K. Glomerulosclerosis Induced by Deficiency of Membrane-Associated Guanylate Kinase Inverted 2 in Kidney Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 28:2654-2669, 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.
 - 9) Ishii A, Katsuura G, Imamaki H, Kimura H, Mori KP, Kuwabara T, Kasahara M, Yokoi H, Ohinata K, Kawanishi T, Tsuchida J, Nakamoto Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Obesity-promoting and anti-thermogenic effects of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in mice. *Sci Rep* 7:15501, 2017.
- 〔その他〕
 ホームページ等
 静岡県立大学・教員データベース・教員情報
 詳細・森 潔
<http://db.u-shizuoka-ken.ac.jp/show/profile656.html>
- 6 . 研究組織
 (1)研究代表者
 森 潔 (MORI Kiyoshi)
 静岡県立大学薬学部・特任教授
 研究者番号：60343232

(2)研究分担者

松阪 泰二 (MATSUSAKA Taiji)

東海大学医学部・准教授

研究者番号：50317749

(3)連携研究者

大塚 正人 (OHTSUKA Masato)

東海大学医学部・准教授

研究者番号：90372945

(4)研究協力者

土田 潤一 (TSUCHIDA Junichi)

京都大学医学部・研究員

研究者番号：10643570