

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09684

研究課題名（和文）腎臓発生や老化に関する研究成果を臨床医療に応用するための基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for application to clinical medicine based on kidney development and aging science

研究代表者

臼井 丈一（USUI, JOICHI）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70447340

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）：プロジェクトA：「腎臓発生のKey転写因子、TCF21の腎臓病への関与の検討」、B：「老化のKeyオルガネラ、ミトコンドリア機能異常と腎臓病との関連性の検討」を進めた。A:TCF21に関するin vivo実験でポドサイト抗TCF21陽性組織スコアと尿蛋白、尿TCF21濃度との相関を確認した。またin vitro実験系、Tcf21過剰発現実験で細胞骨格に作用し細胞死の抑制することを確認した。B:変異ミトコンドリアDNA導入マウスでミトコンドリア変異率が90%を越え、加齢に伴いポドサイト障害が出現することを確認したことからミトコンドリア異常の腎病変の主標的がポドサイト障害であることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生や老化と疾患発症のメカニズムの共通項は多く、腎臓病発症でも同様であることを証明した。TCF21発現は糸球体硬化への共通機構であるポドサイト障害と関連性があり、予後指標である蛋白尿との相関も確認した。そのため、臨床応用状、糸球体疾患の鑑別、治療反応性のバイオマーカーの候補となる。さらに治療ターゲットとして蛋白尿制御の起点となる可能性があり、新規治療法の開発に繋がりうる。ミトコンドリア変異蓄積型のポドサイト障害にその変異率、加齢が影響しており、加齢性糸球体硬化のメカニズムを明らかにできる疾患モデルとして活用可能である。近年増加傾向の高齢者腎障害メカニズム解明を介し、その診療向上に寄与しうる。

研究成果の概要（英文）：Based on biological research about organ development and aging, 2 projects were progressed, A: TCF21 expression in various kidney diseases, B: Renal involvements of mitochondrial DNA deletion-dependent model. A: In vivo TCF21 experiments, we investigated TCF21 expression in vivo. The association between histological TCF21 expression and UP/urinary TCF21 was statistically significant. In vitro experiments using Tcf21-expressing podocyte cell line, we could observe Tcf21-dependent effects, related with actin cytoskeleton dysregulation and apoptosis. Therefore, TCF21 expression changes functional significance in injured podocytes. B: We focused on the glomerular injury of mito-mice and investigated the pathogenesis of their renal involvement. The proteinuria developed dependent with higher mitochondrial DNA deletion, more than 90% deletion. Mito-mice with proteinuria histologically revealed FSGS. The podocytes are the main target of mitochondrial dysfunction in the kidney.

研究分野：内科学 腎臓内科学

キーワード：内科 発生 老化 病理学

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全は発症数の推移に近年鈍化がみられているものの、高齢者や糖尿病性腎症の増加に伴い依然として行政上も重点課題に挙げられ、更なる予防・治療対策が検討されている。すなわち腎疾患の病態解明・治療法開発は内科学研究の重点課題であり、診療と研究の両面で末期腎不全患者数の抑制に努力する必要が求められている。

発生研究は1990年代より発生工学の技術開発、再生医学への着眼・展開により急速に進捗を遂げている。腎臓発生も同様に、数多くのKey分子やpathwayの関与が報告され、腎疾患での病態メカニズムや再生医学研究などへ展開されている。

本プロジェクトは継続研究であり、今回の研究計画では、それまでに検討してきた腎臓発生研究の成果を一つずつヒト腎疾患のメカニズムの解明に応用していく。Basic helix-loop-helix型転写因子TCF21(Pod1, Capsulin, Epicardin)は腎臓、肺、心臓、脾臓、生殖細胞などの発生・分化に必須な分子である。特に上皮-間葉転換(EMT)に関与し、腎臓発生では後腎間葉に高発現し、KOマウスを用いた解析から腎臓形成に必須であることが証明されている(Development 1999, PLOS One 2012)。一方、成体では糸球体ポドサイトに高発現しているものの、腎疾患や蛋白尿制御への関与は未解明である。そのため、ヒト腎疾患、小動物腎疾患モデルを用いた成体の糸球体ポドサイトにおけるTCF21の機能解析を計画した。また腎臓発生のみならず老化のメカニズム(ミトコンドリア機能)にも焦点を当てる。ミトコンドリアDNAの遺伝的な特殊性から遺伝子改変マウスの作製には困難が伴い、過去に報告されているマウスモデルは非常に限られている。筑波大学生命環境系ではミトコンドリア変異DNA導入キメラマウスの作製法を確立しており(Nat Med 2001)、このキメラマウスの腎臓・尿・血清サンプルをすでに入手し検討を進めている。予備検討で変異遺伝子のキメラ率と蛋白尿・腎組織障害が正の相関があること、加齢による病変の促進を観察済みである。

2. 研究の目的

腎臓領域の主たる課題である腎疾患の病態解明、診断・治療法の開発を目的とする。具体的には、腎疾患の病態解明・治療法開発として、プロジェクトA:前年より継続して、腎臓発生のKey転写因子であるTCF21等の腎疾患・蛋白尿制御への関与の検討を、プロジェクトB:老化のKeyオルガネラであるミトコンドリア機能異常と腎疾患・蛋白尿制御との関連性の検討を進め、臨床応用の基盤を築く。

3. 研究の方法

(1) プロジェクトA: Tcf21等の腎疾患・蛋白尿制御への関与の検討

腎疾患におけるTCF21の発現解析(*in vivo*実験系)

一次性、二次性の各腎炎・ネフローゼ症候群のヒト腎生検、小動物糸球体疾患モデルでTCF21の組織・化学的に発現解析を行う。ヒト腎生検サンプルの使用に関しては研究同意書を取得し実施する。小動物糸球体疾患モデルであるネフローゼ症候群モデル(ラットPAN腎症)での組織発現解析を行う。

Tcf21過剰発現糸球体ポドサイト培養細胞の解析(*in vitro*実験系)

Tcf21過剰発現培養細胞株を用いた*in vitro*実験系での機能解析を行う。Tcf21強制発現

系での機能解析（細胞増殖能、細胞周期、細胞死、細胞肥大、細胞骨格等の変化）、遺伝子発現解析（RT-PCR でのポドサイト関連分子発現変化、Microarray 等）を行う。

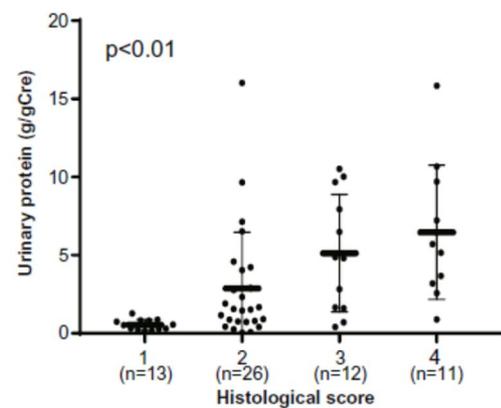
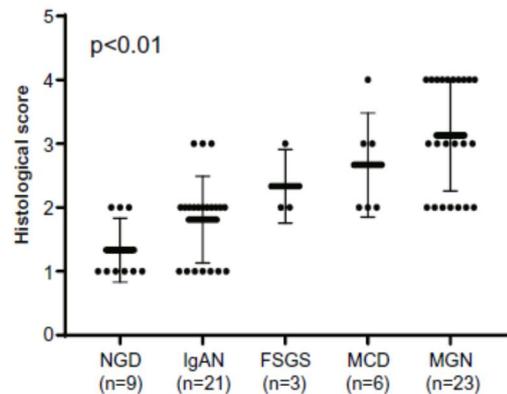
（2）プロジェクト B：ミトコンドリア変異遺伝子導入キメラマウスの腎病変の解析

ミトコンドリア変異遺伝子導入キメラマウス mito-mice を用いて腎変異遺伝子キメラ率と蛋白尿・腎機能・腎組織障害の関連性を検討する。

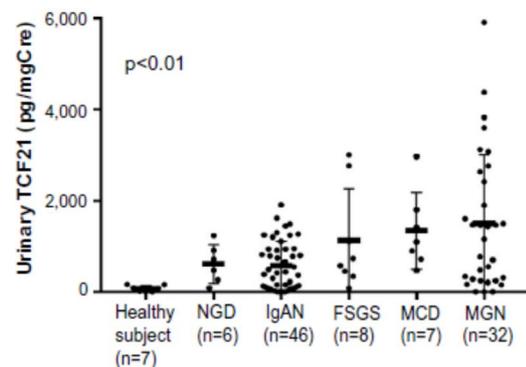
4. 研究成果

（1）腎疾患における TCF21 の発現解析（*in vivo* 実験系）

各種ヒト腎疾患、腎生検サンプルでの抗 TCF21 染色の結果、TCF21 は糸球体ポドサイトに発現していること、糸球体疾患群間で発現程度に有意差があることが明らかとなった（ $p < 0.01$ ）。TCF21 の発現部位としては、非糸球体疾患ではポドサイト核に限局し、ネフローゼ症候群を呈する腎疾患 { 巣状糸球体硬化症（FSGS）、微小変化型ネフローゼ症候群（MCD）、膜性腎症（MGN）} ではポドサイトの核以外に細胞質まで分布拡大していた。抗 TCF21 陽性組織スコアは、非糸球体疾患 < IgA 腎症 < FSGS、MCD、MGN の順で高発現していた（右上図：各糸球体疾患別の抗 TCF21 組織スコア、 $p < 0.01$ ）。また、組織発現が高いほど、尿蛋白量は有意差を持って多かった（右下図：抗 TCF21 組織スコア別の尿蛋白量比較、 $p < 0.01$ ）。ラットネフローゼ症候群モデルを用いた解析では、ネフローゼ極期で、コントロールと比較しポドサイト核に発現を認め、ネフローゼ改善に伴い発現はほぼ消失していた。



次に尿 TCF21 濃度の検討を行い、各糸球体疾患群間で有意な濃度差があり、前述の抗 TCF21 陽性組織発現スコアと正の相関があった（右図：各糸球体疾患別の尿 TCF21 濃度、 $p < 0.01$ ）。また、ネフローゼ症候群に限定し治療寛解・非寛解の 2 群間で検討すると、寛解群で有意差を持ち尿 TCF21 濃度は低下していた（ $p < 0.01$ ）。



これらの研究成果は Scientific Reports に掲載されている。

サブ解析として、代表的なヒト糸球体腎炎（非ネフローゼ）である IgA 腎症においてネフローゼ症候群程ではないものの抗 TCF21 陽性組織スコア上昇と尿中 Tcf21 濃度、尿蛋白との間に相関が確認された。この研究成果は論文投稿 revise 中である。

（2）Tcf21 過剰発現糸球体ポドサイト培養細胞の解析（*in vitro* 実験系）

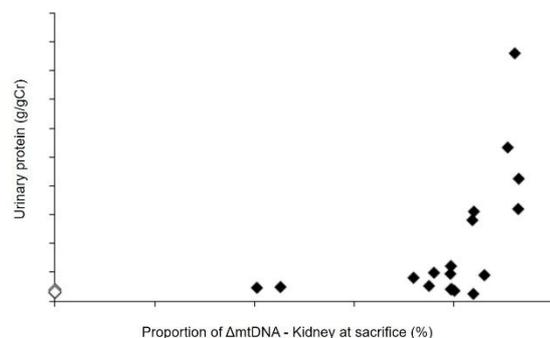
Tcf21 過剰発現マウス糸球体ポドサイト培養細胞を用いて、コントロール培養細胞を対照

として、ポドサイト関連遺伝子の発現差、cDNA microarrayによる網羅的遺伝子発現解析、KEGGパスウェイ解析を実施した。リストアップした53個のポドサイト関連遺伝子の発現差に有意差はなかった。Tcf21発現上昇遺伝子では、cytokine-cytokine receptor interaction, TGF-beta signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, renin secretion, rheumatoid arthritis, galactose metabolism, NF-kappa B signaling pathway, tuberculosis, mineral absorption, and malariaが抽出された。一方、Tcf21発現低下遺伝子では、fatty acid degradation, fatty acid metabolism and regulation of actin cytoskeletonが抽出された。これらの結果よりTcf21過剰発現は複数の細胞内シグナル伝達に影響していることが想定された。そのため、マウス系球体ポドサイト培養細胞の細胞生理機能・形態変化の検討を進めた。Tcf21過剰発現効果として、細胞形態上philopodia形成の促進を認めた、細胞増殖能、移動能ともに低下していた、actin関連分子発現変化を伴っていた、Adriamycin添加によるネフローゼ模倣モデルでは細胞死を抑制していた、等細胞機能や形態に影響をしていることを確認した。以上よりTcf21過剰発現は細胞骨格に作用し、また細胞死の抑制し細胞保護的に機能することと考えられた。

これらの研究成果は Scientific Reports に掲載されている。

(3) ミトコンドリア変異遺伝子導入キメラマウス (Mito マウス) の腎病変の解析

ミトコンドリア病モデルマウスである Mito マウスの系球体障害に着目し、その解析 (生化学および組織) を行った。解析の結果として、80%ミトコンドリア DNA 欠失を伴うマウスで蛋白尿が出現する個体が現れ、90%以上のミトコンドリア DNA 欠失を伴う高齢マウス全例で蛋白尿を認め、組織学上 FSGS を呈していた (右図)。FSGS を呈したマウス個体では、高度の系球体性蛋白尿による遠位尿細管腔内の円柱形成も確認できた、加えてポドサイト関連タンパクの発現低下およびポドサイト数の減少も観察された。すなわち、ポドサイト障害とその脱落は蛋白尿の出現とミトコンドリア DNA 欠失頻度と週齢に関連しており、Mito マウスにおいてミトコンドリア DNA 欠失依存性のポドサイト障害が確認された。ポドサイトは老化に伴いミトコンドリア DNA 異常の蓄積に起因するミトコンドリア機能異常の主たる標的細胞であることが示唆される。



これらの研究成果は論文投稿 revise 中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Usui Joichi, Yaguchi Misa, Yamazaki Satoshi, Takahashi-Kobayashi Mayumi, Kawamura Tetsuya, Kaneko Shuzo, Seshan Surya V., Ronco Pierre, Yamagata Kunihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcription factor 21 expression in injured podocytes of glomerular diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68422-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Usui Toshiaki, Morito Naoki, Shawki Hossam H., Sato Yoshinori, Tsukaguchi Hiroyasu, Hamada Michito, Jeon Hyojung, Yadav Manoj Kumar, Kuno Akihiro, Tsunakawa Yuki, Okada Risa, Ojima Takaaki, Kanai Maho, Asano Keigo, Imamura Yuki, Koshida Ryusuke, Yoh Keigyou, Usui Joichi, et al	4. 巻 98
2. 論文標題 Transcription factor MafB in podocytes protects against the development of focal segmental glomerulosclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 391 ~ 403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2020.02.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noguchi Kazuyuki, Ishida Junji, Kim Jun-Dal, Muromachi Naoto, Kako Koichiro, Mizukami Hayase, Lu Weizhe, Ishimaru Tomohiro, Kawasaki Shohei, Kaneko Shuzo, Usui Joichi, Ohtsu Hiroshi, Yamagata Kunihiro, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 117
2. 論文標題 Histamine receptor agonist alleviates severe cardiorenal damages by eliciting anti-inflammatory programming	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 3150 ~ 3156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1909124117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 横山千恵、臼井丈一、萩原正大、高野恵輔、大河内信弘、南木融、川上康、山縣邦弘	4. 巻 6
2. 論文標題 尿中ポドサイト数の推移を確認した移植腎巣状分節性糸球体硬化症の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床腎移植学会雑誌	6. 最初と最後の頁 87 ~ 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白井俊明、森戸直記、濱田理人、楊川堯基、佐藤芳憲、白井丈一、高橋智、山縣邦弘
2. 発表標題 巣状分節性糸球体硬化症の治療ターゲットとしてのMafBの可能性
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu Tatsuya, Masahiro Hagiwara, Joichi Usui, Shuzo Kaneko, Kazuto Nakada, Jun-ichi Hayashi, Kunihiro Yamagata
2. 発表標題 Investigation into renal involvement in animal model of mitochondrial diseases
3. 学会等名 ISN Frontiers meetings (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水達也、萩原正大、白井丈一、金子修三、山縣邦弘、中田和人、林純一
2. 発表標題 ミトコンドリア病モデルマウスの腎病変の解析
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 白井丈一、山縣邦弘	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 373
3. 書名 プレジジョン・メディシンの腎臓内科疾患への応用、医療革命プレジジョン・メディシン研究最前線、佐藤孝明他監修	

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学研究者総覧TRIOS
<https://trios.tsukuba.ac.jp/en/researcher/0000001875>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Weill Cornell Medicine			
フランス	Hospital Tenon			