

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16942

研究課題名(和文) R3hdmlを用いた筋腎連関の機序解明および新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the Mechanisms of Muscle-Renal Linkage and Establishment of Novel Therapeutic Strategies through Analysis of R3hdml

研究代表者

石川 崇広 (Ishikawa, Takahiro)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：00749426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はR3hdmlによるCKDやサルコペニアの新たな治療戦略を確立することを目的としている。今回の研究において、R3hdmlを過剰発現させたマウスでは、糖尿病状態における尿蛋白の増加が抑制されました。R3hdmlの発現は、マウスの骨格筋の発生と分化の過程で増加することがわかった。R3hdmlを欠損したマウスの体重および骨格筋量は、野生型マウスと比較して低かった。R3hdmlの発現は、Cardiotoxin (CTX)誘発筋損傷に対応した筋再生中に増加した。CTX注入後の握力の回復は、R3hdml KOマウスで著しく損なわれたが、R3hdmlによって回復することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果は、R3hdmlが糖尿病性腎症を始めとするCKDやサルコペニアの病態に深く関与することを示すものである。またR3hdmlを過剰発現させることで、糖尿病性腎症やサルコペニアの状態を軽減させた。これはR3hdmlが、両者の病態において保護的な役割を果たす因子であることを示している。今後更にR3hdmlの解明することは、将来的なR3hdmlを用いた「筋腎連関」の機序解明およびCKDやサルコペニアに対する新規治療法の確立に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the pathogenesis of CKD and sarcopenia through the analysis of R3hdml. In mice overexpressing R3hdml, the increase in urinary protein in the diabetic state was suppressed. Expression of R3hdml increases during skeletal muscle development and differentiation in mice. Body weight and skeletal muscle mass of R3hdml knockout (KO) mice were lower compared to control mice. Expression of R3hdml increased during muscle regeneration in response to cardiotoxin (CTX)-induced muscle injury. Recovery of handgrip strength after CTX injection was significantly impaired in R3hdml KO mice, which is rescued by R3hdml. These results indicate that R3hdml is an inhibitory factor against CKD and sarcopenia.

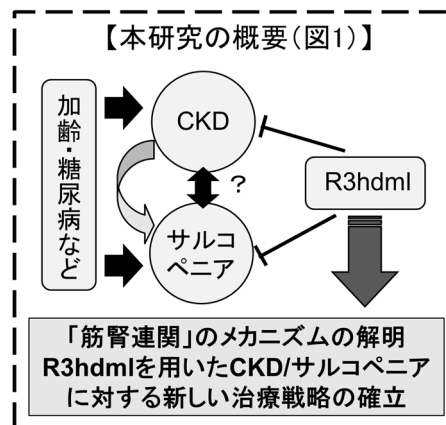
研究分野：糖尿病性腎症 サルコペニア

キーワード：筋腎連関 糖尿病性腎症 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では高齢者糖尿病も増加し、その合併症である糖尿病性腎症はCKDの原因として多くを占めている。CKDは直接的に透析導入の原因になるのみならず、心腎連関により心疾患のリスクを高める。さらにCKD患者はサルコペニアの合併が多く、両者の合併は死亡率や心血管合併症のリスクを相加的に高め、健康寿命の短縮や医療費の増大など社会的にも大きな問題となっている。**両者はしばしば合併し、いわゆる「筋腎連関」という共通のメカニズムの存在が示唆される(図1)**。しかしCKDがサルコペニアを引き起こすメカニズムについては明らかでなく、予防や治療法は確立されていない。

これまで我々は糖尿病性腎症を含むCKDの発症機序を探るべく、マウスの糸球体を用いてcDNAライブラリー/cDNA microarrayという手法を用いて、糸球体に特異的に発現している遺伝子の同定とその機能解析を行った(Am J Pathol 2002, EMBO J2006)。そして約6000種類の糸球体発現遺伝子のうち、定常状態において主にポドサイトに発現し、かつ糖尿病状態で発現上昇している遺伝子として、R3hdmlを同定し、これに着目した研究を行ってきた。



そしてこれまでの研究課程において、R3hdmlはTransforming growth factor- β (TGF- β)の細胞内シグナルのうちp38MAPKリン酸化を抑制しポドサイトのアポトーシスに関与していることを突き止めた。またR3hdmlノックアウト(KO)マウスを用いた解析において、R3h KOマウスは糖尿病性腎症が野生型に比べて進行しやすいことを見出した。さらにR3hdmlはポドサイトのみならず筋障害時の筋肉でも発現していることや、R3hdmlは早期糖尿病状態など病的な状態において血中や尿中に発現が認められる分泌タンパクであることをこれまでの基礎検討において明らかにした。

以上より我々は、R3hdmlがCKDとサルコペニアの病態に関与する共通のメカニズムに関与している重要な遺伝子であることを確信し、本研究を推進するに至った。

2. 研究の目的

R3hdmlの生物学的作用の解析を通して、CKDとサルコペニアとの関係を包括的に捉えた、いわゆる「筋腎連関」の病態メカニズムの解明が本研究の目的である。

3. 研究の方法

CKDに対するR3hdmlの機能解析

R3hdml KOマウスの表現型の解析

R3hdml KOを作成し、定常状態および糖尿病を惹起した際の表現型を、RT-PCRおよびウェスタンブロット法、免疫染色法、尿中のアルブミン排泄量の測定などを用いて検討した。

R3hdml過剰発現マウスの表現型の解析

アデノウイルスベクターを用いて、R3hdml過剰発現マウスを作成した。さらに糖尿病を惹起し、その表現型を観察した。

・サルコペニアに対する R3hdml の機能解析
in vitro における R3hdml の発現様式の検討

マウス骨格筋より単離した筋衛星細胞や、マウス筋芽細胞である C2C12 培養細胞株を筋管へと分化誘導した際の R3hdml の発現変化を RT-PCR、ウェスタンブロット法を用いて検討した。また si-RNA を用いて R3hdml 遺伝子のサイレンシングを行い、C2C12 細胞の分化に及ぼす影響を検討した。さらにルシフェラーゼアッセイを用いて C2C12 細胞における R3hdml の発現様式を検討した。

in vivo における R3hdml の発現様式の検討

R3hdml KO マウスにおける骨格筋の表現型を検討した。さらにマウス骨格筋の成長発達過程および Cardiotoxin (CTX)投与による骨格筋損傷時の R3hdml の発現を、RT-PCR 法、免疫組織染色法、in situ hybridization 法を用いて検討した。

4. 研究成果

・CKD に対する R3hdml の機能解析

R3hdml KO マウスの表現型の解析

これまでの解析において、R3hdml ノックアウトマウス (R3hdml KO) は以下の特徴があることを明らかにしてきた。

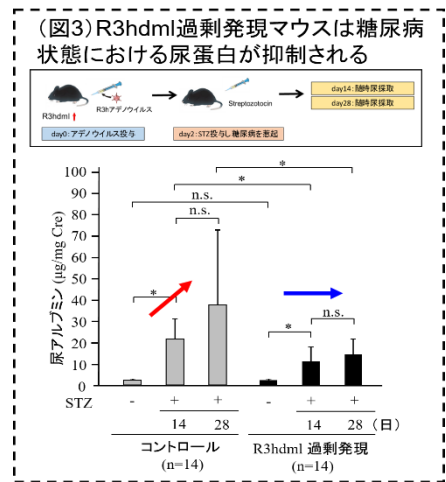
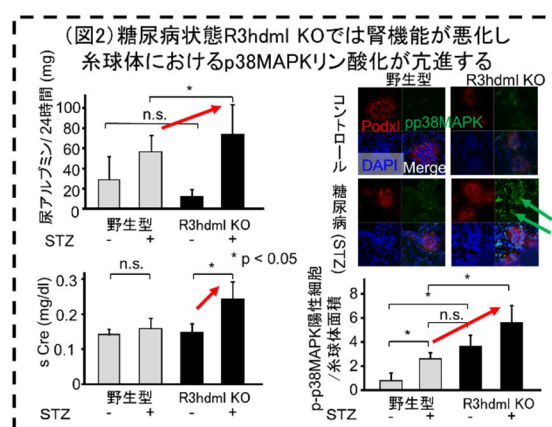
・R3hdmlKO の腎系球体は、光学顕微鏡下における観察では野生型と特に大きな変化を認めないものの、電子顕微鏡下での観察では**糖尿病腎症に特徴的な糸球体基底膜・ポドサイト足突起の変化が認められた。**

・定常状態においては野生型と比べて尿中アルブミン排泄に変化は認められなかったものの、STZ を用いて糖尿病を惹起した R3hdml KO は、同条件の野生型に比べて**尿中アルブミン増加と腎機能の悪化を認めた。**

今回の検討において、R3hdml KO において尿中アルブミンの増加を認める機序について、免疫染色を用いて検討した。糖尿病を惹起した、野生型ならびに R3hdml KO の糸球体を採取し免疫染色を行ったところ、R3hdml KO では糸球体における p38MAPK のリン酸化が亢進していた(図2)。以上より **R3hdml は糖尿病状態において活性化する p38MAPK のリン酸化抑制を介して、糖尿病性腎症を代表とする CKD の進展を抑制する因子である可能性を見出した。**

R3hdml 過剰発現マウスの作成

R3hdml 過剰発現モデルの作成を実施した。まずアデノウイルスベクターを作成、増殖し感染力があり、かつ安定して R3hdml を発現していることを確認した。続いて尾静脈からアデノウイルスを投与し、肝臓に発現していることを確認した。そして R3hdml 過剰発現マウスに STZ を用いて糖尿病を惹起したところ、同条件の野生型に比べて尿中のアルブミン排泄が有意に減少することが明らかとなった。以上より、**R3hdml は糖尿病腎症の進展に保護的働く可能性が示唆された。**



筋肉における R3hdml の役割に対する検討

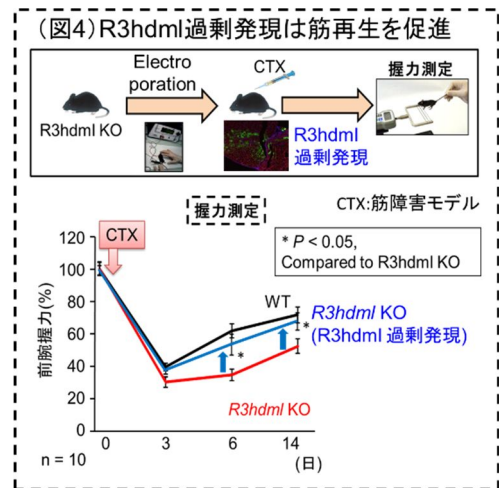
in vitro における R3hdml の発現様式の検討

R3hdml 遺伝子/蛋白は単離筋衛星細胞ならびに C2C12 細胞の分化に伴い発現上昇した。さらに si-RNA を用いた R3hdml 遺伝子のサイレンシングにより、C2C12 細胞の筋管形成が抑制された。R3hdml-Luc を C2C12 細胞にトランスフェクションした所、C2C12 細胞の分化に伴いルシフェラーゼ活性は増加した。さらに筋分化過程における R3hdml の発現制御機構を明らかにするために、R3hdml 転写開始部位 5'末端上流を、JASPAR データベースを用いて解析したところ、複数の MyoD 結合部位が存在する事が明らかとなった。そこで R3hdml-Luc と CMV プロモーター下に MyoD を発現させるプラスミドを C2C12 細胞に同時トランスフェクションした群 (MyoD 陽性)、トランスフェクションしなかった群 (MyoD 陰性)におけるルシフェラーゼ活性を比較した。その結果、トランスフェクション後の MyoD 陽性群のルシフェラーゼ活性が MyoD 陰性群と比較して有意に上昇しており、MyoD が R3hdml の発現制御に関わる一因子の可能性が示唆された。

in vivo における R3hdml の発現様式の検討

まず、R3hdml KO マウスにおける骨格筋の表現型を検討した。その結果、マウス骨格筋において R3hdml 遺伝子発現は出生直後に観察されたが、成後 21 日には消失していた。R3hdml KO マウスの骨格筋重量は野生型に比べて有意に少なかった。R3hdml KO から単離された筋衛星細胞は、Ki67 陽性細胞数が野生型と比べて有意に少なく、増殖能の低下を認めた。また R3hdml KO 大腿直筋は野生型と比し低形成であり、筋分化誘導因子である Pax-7、MyoD、Myogenin の発現はいずれも低下を認めた。

最後に骨格筋障害モデルである、Cardiotoxin (CTX) を投与した際の R3hdml の発現変化を観察した。マウスに 10 μ M CTX 投与をしたところ、R3hdml 遺伝子は再生している骨格筋において発現が増加していた。さらに in situ hybridization 法と免疫組織染色法を組み合わせた検討から、R3hdml 遺伝子は MyoD 陽性の筋衛星細胞で発現が亢進していることが明らかとなった。そして野生型および R3hdml KO マウスにそれぞれ CTX を投与すると、R3hdml KO マウスでは野生型と比べて、筋再生および筋力の回復が遅延していた。さらに R3hdml を Electro poration を用いて過剰発現させることで、筋再生が回復した。



以上より、R3hdml は CKD およびサルコペニアの病態に関わる重要な因子であることを本研究において明らかにし、それぞれ論文にて報告を行った。

・ Ishikawa T, et al: A novel podocyte protein, R3h domain containing-like, inhibits TGF- β induced p38 MAPK and regulates the structure of podocytes and glomerular basement membrane. J Mol Med (Berl). 2021 Feb 23. doi: 10.1007/s00109-021-02050-w.

・ Sakamoto K, Furuichi Y, Yamamoto M, Takahashi M, Akimoto Y, Ishikawa T, et al: R3hdml regulates satellite cell proliferation and differentiation. EMBO Rep. 2019 Nov 5;20(11):e47957

今後更にその機能を解明することは、将来的なR3hdmlを用いた「筋腎連関」の機序解明およびCKDやサルコペニアに対する新規治療法の確立に寄与するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa Takahiro, Takemoto Minoru, Akimoto Yoshihiro, Takada-Watanabe Aki, Yan Kunimasa, Sakamoto Kenichi, Maezawa Yoshiro, Suguro Miyuki, He Liqun, Tryggvason Karl, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro	4. 巻
2. 論文標題 A novel podocyte protein, R3h domain containing-like, inhibits TGF- β -induced p38 MAPK and regulates the structure of podocytes and glomerular basement membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00109-021-02050-w	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 Sakamoto K, Furuichi Y, Yamamoto M, Takahashi M, Akimoto Y, Ishikawa T, Shimizu T, Fujimoto M, Takada-Watanabe A, Hayashi A, Mita Y, Manabe Y, Fujii NL, Ishibashi R, Maezawa Y, Betsholtz C, Yokote K, Takemoto M.	4. 巻 11
2. 論文標題 R3hdm1 regulates satellite cell proliferation and differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201947957.	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
---------------------------	-----------------------	----

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