

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17246

研究課題名(和文)アルドステロンによる糸球体障害におけるポドサイトのp38MAPKの役割の解明

研究課題名(英文)Role of p38MAPK on podocyte in aldosterone-induced glomerular injury

研究代表者

加藤 有希子(Kato, Yukiko)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：40769519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルドステロンによるポドサイト障害におけるp38MAPKならびにナトリウム利尿ペプチド受容体A(GC-A)の役割を検討した。ポドサイト特異的GC-A&p38 MAPKダブルノックアウトマウスを作製し、アルドステロン、高食塩負荷を行うと、高度のアルブミン尿と糸球体係蹄壁内に血栓を認め、ポドサイト障害と共に強い内皮障害を呈した。またMAPK14欠失GC-Aノックダウンした培養ヒトポドサイトを用いて、ポドサイトにおけるp38 MAPKとGC-Aの減少が内皮細胞の細胞外基質に関わる遺伝子発現亢進に関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドサイトのGC-Aとp38 MAPKの意義を検討するために、ポドサイト特異的GC-A&p38MAPKダブルノックアウトマウスを作製し、これら2つの因子が特に高食塩負荷時・アルドステロン過剰状態において、糸球体障害を増悪させることを示した。社会的意義として、高血圧ならびに高食塩時の腎障害の機序解明に貢献している。

研究成果の概要(英文)：The role of p38MAPK and natriuretic peptide receptor A (GC-A) in aldosterone-induced podocyte injury was investigated. To investigate the significance of p38MAPK in podocytes, podocyte-specific GC-A & p38 MAPK double knockout mice were generated and subjected to aldosterone and high salt diet. The double-knockout mice showed severe albuminuria and marked podocyte damage. In addition, the mice showed fibrin thrombi in the capillary lesion and endothelial damage. Using cultured human podocyte with MAPK14 deletion GC-A knockdown, we showed that decreased p38MAPK and GC-A in podocytes is involved in the upregulation of gene expression related to the extracellular matrix of endothelial cells.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト アルドステロン ナトリウム利尿ペプチド p38 MAPK ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓病においてアルドステロンが蛋白尿増加や腎障害に関与することは報告されてきた。申請者らはこれまで腎不全、腎炎および糖尿病性腎症モデルを用い、ナトリウム利尿ペプチド/guanylyl cyclase receptor-A (GC-A)受容体シグナルが腎保護的に作用することを報告してきた。ナトリウム利尿ペプチド受容体は、腎臓において集合管のみならずポドサイトにも発現している。アルドステロンによる腎障害におけるナトリウム利尿ペプチドの意義の検討をおこなうために、全身性 GC-A 欠損マウスに片腎摘を行い、6%高食塩食負荷とアルドステロンを投与(以下 ALDO 負荷)し、腎障害の程度を検討したところ、高度アルブミン尿および糸球体障害を呈した(Ogawa, Kato et al. J Am Soc Nephrol 23:1198, 2012)。このモデルではポドサイト傷害が増強しており、申請者は GC-A シグナルがポドサイトにおいてアルドステロンを含む腎障害に対して拮抗的に作用している機序に興味を持っている。

さらに申請者はポドサイトにおける GC-A の意義を検討するために、ポドサイト特異的 GC-A コンディショナルノックアウトマウス(pod GC-A cKO マウス)を作製し、同様に ALDO 負荷を行うと尿中アルブミン排泄が13倍に増加し、メサンギウム基質の増加、ポドサイト障害が認められた。全身性の GC-A KO マウスならびに pod GC-A cKO マウスの解析からポドサイトにおける p38MAPK のリン酸化が亢進していることを見出し、p38 MAPK の役割について興味を持った。そのため、p38MAPK 阻害薬 FR167653 を用い、これら動物モデルへの投与したところ、アルブミン尿は95%低下し、ポドサイト障害が軽減していることを示し、このことから、p38MAPK の抑制はポドサイト障害を軽減することを示した(Kato et al. Sci Rep 7:46624, 2017)。

しかしながら、p38 MAPK 阻害薬投与は全身の細胞において p38 MAPK を抑制することから、ポドサイトにおける p38 MAPK の意義については不明であった。また、p38 MAPK はベール状態においてもポドサイトの分化や形態維持に必要であると想定されるが、これまで全身性誘導性 p38 MAPK ノックアウトマウスで腎臓の影響を検討した報告はあるが(Muller et al. Plos One 8:e56316, 2013) ポドサイト特異的 p38MAPK cKO マウスの報告はなく、ポドサイトにおいて、p38 MAPK を欠失させたときの表現型がどのようになるかは不明であった。

p38 MAPK は、p38 α 、p38 β 、p38 γ のアイソフォームを持つが、これまでの他臓器における欠失検討からは、p38 β が心臓などに於いて重要であることが示されている(Nishida et al. Mol Cell Biol 24:10611, 2004)。

以上の点から本申請研究における学術的「問い」は以下を考えている。

(1) ポドサイトにおいて p38 MAPK を欠失させると、マウス糸球体に変化が現れるか、また出生後まもなく現れる場合は生後数週齢を経た後に p38 MAPK を欠失させた場合はどのような変化が現れるか。

(2) ポドサイトの GC-A 欠失はアルドステロンによるポドサイト障害をさらに増悪させる方向へ作用するが、その悪化はポドサイトの p38 MAPK を抑制することで改善するのかどうか、またその分子メカニズムはどのようになっているか。

2. 研究の目的

本研究の目的は

(1) ポドサイトにおける p38 MAPK の意義を検討するために、ポドサイト特異的 p38 MAPK cKO マウスを作製し、解析を行う。また、胎生期よりノックアウトすることで生後すぐに著明な変化が現れる場合は、タモキシフェン誘導性 p38 MAPK ノックアウトマウスを作製し、生後ある程度経ってから p38 MAPK をノックアウトすることで、成体における p38 MAPK の意義を明らかにする。

(2) これまでに検討してきた ALDO 負荷 pod GC-A cKO マウスにおける p38 MAPK の意義を検討するために、ポドサイト特異的 GC-A&p38 MAPK ダブル cKO マウスを作製する。生後すぐに著明な変化が現れる場合は、タモキシフェン誘導性のダブルノックアウトマウスを作製する。また、疾患における p38 MAPK の意義を明らかにする。

本研究の学術的独自性と創造性としては、これまで p38 MAPK 阻害による腎炎の改善効果は我々を含め複数の報告があるが (Iwata et al. J Am Soc Nephrol 14:57, 2003, Nishida et al. Nephrol Dial Transplant 23:2520, 2008) p38 MAPK ノックアウトマウスを用いた腎障害の検討は 1 報告のみである。MX1Cre を用いて全身誘導性に p38 MAPK 欠失させたところ、GBM 腎炎の糸球体病変は軽快せずに尿細管障害のみが軽快したという報告がある (Muller et al. Plos One 8:e56316, 2013)。しかしながら誘導性の Cre であるため、残存している p38 MAPK があること、他臓器の p38 も減少していることから、ポドサイトの p38 MAPK の意義については明らかではない。また、本申請研究は、ALDO 負荷におけるポドサイトの p38 MAPK の意義についても検討を行う予定であり、疾患におけるポドサイトの p38 MAPK の意義が明確になる。

3. 研究の方法

(1) ポドサイト特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスの作製と解析

ヒトネフリンプロモーター下に Cre recombinase を過剰発現するネフリン Cre マウス (Asano et al. J Am Soc Nephrol 16:2257, 2005; 東海大学松阪泰二先生より供与) と p38 MAPK floxed マウス (Mapk14^{fl/fl}; Nat Genet 39:750, 2007; Spanish National Cancer Center Nebreda 先生, EMBL Mouse Biology Unit Pasparakis 先生より供与) を交配して作製する。生直後の変化が強い場合は、当研究室で作製した human NPHS2-CreERT2 マウス (Yokoi et al. Nephrol Dial Transplant 25:2120 ;2010) と p38 MAPK floxed マウスを交配し、タモキシフェン誘導性にポドサイト特異的に p38 MAPK を欠失させる。

(2) 培養ポドサイトにおける p38 MAPK & GC-A の意義の検討

培養ポドサイトに p38 MAPK および GC-A の siRNA を transfection し、培養ポドサイトのアポトーシスに關与する遺伝子発現、酸化ストレスに關与する遺伝子発現について、アルドステロン負荷を行い検討する。siRNA の効率が低い場合は、CRISPER/Cas9 システムを用いて、遺伝子を欠損させる。

(3) ポドサイト特異的 p38 MAPK & GC-A ダブルノックアウトマウスの作製とアルドステロン負荷における病態の解析

ポドサイト特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスと GC-A floxed マウスを交配させ、ダブルノックアウトマウスを作製する。さらに、これまで検討してきた高食塩・片腎摘・アルドステロン負荷 (ALDO 負荷) を行い、高アルドステロン状態における糸球体障害が以前報告したポドサイト特異的 GC-A cKO マウスと比較して軽減するかどうかを検討し、ポドサイトにおける p38 の意義を明らかにする。血圧、尿所見、腎病理所見、電子顕微鏡によるポドサイトの形態、アポトーシス、ポドサイト関連タンパクの発現、酸化ストレスに關与する遺伝子群の発現変化を解析する。

4. 研究成果

(1) ポドサイト特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスの作製と解析

ポドサイト特異的 p38 MAPK ノックアウト (pod-p38 cKO) マウスを作製し、6% 高食塩負荷と vehicle (2% エタノール) と投与した。Pod-p38 cKO マウスとコントロール (CT) マウスの体重、腎重量、血圧、血清クレアチニン値、尿中カリウム値、尿アルブミン排泄を比較したが、両群に差を認めなかった。次に、6% 高食塩負荷とアルドステロン負荷を行ったところ、体重、腎重量、血圧、血清クレアチニン値、尿中カリウム値に差を認めなかったが、尿アルブミン排泄の軽度の増加を認めた。光学顕微鏡や電子顕微鏡での糸球体やポドサイトの変化は認められなかった。

(2) 培養ポドサイトにおける p38 & GC-A の意義の検討

培養系において、CRISPR/Cas9 システムを用いて培養ヒトポドサイトの MAPK14 を欠失させ、si-GC-A でノックダウンを行い、アルドステロン添加したところ、*SERPINE1*, *FNI*, *F8*, *CDH8* の発現亢進を認めた。さらに MAPK14 欠失 GC-A ノックダウン培養ヒトポドサイトと、野生型内

皮細胞 (HUVEC) をアルドステロン添加下で co-culture したところ、HUVEC において *TGFBI* と *FN1* の発現亢進を認めた。これらから、ポドサイトにおける p38 MAPK と GC-A の減少は内皮細胞の細胞外基質に関わる遺伝子発現亢進に関与していることが示された

(3) ポドサイト特異的 p38 MAPK & GC-A ダブルノックアウトマウスの作製とアルドステロン負荷における病態の解析

アルドステロンによるポドサイト障害における p38 MAPK ならびにナトリウム利尿ペプチド受容体 A (GC-A) の役割を検討した。ポドサイトにおける p38 MAPK の意義を検討するためにポドサイト特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスとポドサイト特異的 GC-A & p38 MAPK ダブルノックアウトマウスを作製し ALDO 負荷を行った。ポドサイト特異的ダブルノックアウトマウスでは高度のアルブミン尿と著しいポドサイト障害、糸球体内に血栓を認め、nephrin, podocin の発現の低下、ポドサイトの足突起消失が認められた。糸球体より RNA を抽出して網羅的に遺伝子発現を検討したところ、ダブルノックアウトマウスの糸球体では *Serpine1*, *Vcam1*, *Cdh6*, *Fn1*, *F8* の遺伝子発現が亢進しており、これらは real-time RT PCR 法にて同様の発現亢進を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉岡清香, 加藤有希子, 石井輝, 森慶太, 大崎啓介, 徳留健, 松阪泰二, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 アルドステロン誘導性糸球体障害に対する足細胞のp38 MAPK欠失の影響
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大崎啓介, 加藤有希子, 石井輝, 森慶太, 森潔, 笠原正登, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 MMP-10欠損による抗GBM腎炎の改善
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉岡清香, 山田博之, 石井輝, 加藤有希子, 森慶太, 大崎啓介, 徳留健, 松阪泰二, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 ポドサイト特異的p38 MAPK欠損はアルドステロン投与GC-Aノックアウトマウスの糸球体障害を悪化させる
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科 腎臓内科学
<http://www.kidney-kyoto-u.jp/>

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