

令和 4 年 6 月 15 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：20K17278

研究課題名(和文) 高塩、アルドステロンによる腎障害へのNa利尿ペプチド効果に対するCTGFの意義

研究課題名(英文) Significance of CTGF for nautreitic-peptide effects on high salt and aldosterone-induced renal injury

研究代表者

石井 輝 (Ishii, Akira)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40760153

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)：ポドサイト特異的ナトリウム利尿ペプチド受容体(GC-A)コンディショナルKOマウス(pod GC-A cKO)と全身性誘導型Connective tissue growth factor (CTGF)ノックアウトマウス(Rosa CTGF cKO)を交配して作成したポドサイト特異的GC-A;CTGFダブルノックアウト(pod GC-A;CTGF dKO)マウスでは、pod GC-A cKOと比較して、体重、血圧、尿量、腎重量等には明らかな差は認めなかったものの、アルブミン尿が経時的に増悪する傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によりポドサイトにおける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が、その悪化はポドサイトのCTGFを抑制することで予想に反して増悪する可能性が示唆された。このことは、慢性腎臓病進行の機序、あるいはその予防におけるナトリウム利尿ペプチドやConnective tissue growth factor (CTGF)の臨床的意義の解明に重要な意味づけをなす可能性があること期待され、さらなる詳細な検討により将来的には腎臓病進行予防のための創薬に結びつけたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We created podocyte specific guanylyl cyclase(GC-A); Connective tissue growth factor (CTGF) double knockout (pod GC-A; CTGF dKO) mice by crossing pod GC-A cKO mice with systemic CTGF knockout mice (Rosa CTGF cKO). Pod GC-A; CTGF dKO mice showed no obvious differences in body weight, blood pressure, urine output, or kidney weight compared to pod GC-A cKO, but showed a tendency to worsen albuminuria over time.

研究分野：腎臓病学

キーワード：CTGF 高食塩 アルドステロン Na利尿ペプチド

1. 研究開始当初の背景

我が国において、急速な高齢化の進行に伴う慢性腎臓病患者のさらなる増加が懸念されている。腎臓の加齢性変化として、糸球体内のポドサイト数の低下が見られることが近年報告されている (Hodgin et al, J Am Soc Nephrol 26:3162, 2015)。そこで腎臓病進行予防のためのポドサイトの形態や機能を保護・維持する治療戦略の確立が臨床的にもますます必要となることが予想されるが、ポドサイトをターゲットとした治療は未だ十分に確立されておらず重要な研究課題である。

これまで研究者らは、ポドサイトの病態生理について、1. ナトリウム利尿ペプチド (NP) 系、2. Transforming growth factor (TGF) - CTGF シグナルに着目し継続的に研究・報告を行ってきた。近年、アルドステロンは独立した腎障害促進因子として注目されている。アルドステロンによる腎障害における NP の意義の検討をおこなうために、全身性 guanylyl cyclase receptor-A (GC-A)-A KO 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投与 (以下 ALDO 負荷) を行い、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 (図 1: Ogawa, Ishii 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、研究者は 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た。そこで研究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 KO 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、ポドサイトにおける NP - GC-A シグナルはポドサイトの形態や機能維持に重要であると考えられた (図 2: Kato, Ishii et al. Sci Rep 7:46624, 2017)。

さて、Connective tissue growth factor (CTGF) は病的な状態において TGF- など他の増殖因子の機能を調節し、細胞外基質増加作用や炎症を惹起するなど様々な機能を有する増殖因子である。研究者らはこれまでに腎疾患における CTGF の意義について研究を行い、ポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウス (CTGF-Tg) では糖尿病性腎臓病が悪化することを示し、糸球体硬化におけるポドサイトの CTGF の重要性について報告してきた (Yokoi et al. Kidney Int 73:446, 2008)。さらに研究者らは CTGF floxed マウスを作成し、全身性の誘導可能な RosaCreERT2 マウス (RCreERT2; Artemis 社より購入) と交配し、4-hydroxytamoxifen 投与による全身性薬剤誘導性 CTGF ノックアウトマウス (Rosa-CTGF cKO) を作製したところ、CTGF mRNA 発現は腎において 81% 低下した。この全身誘導性 CTGF cKO マウスに抗糸球体基底膜 (GBM) 腎炎を惹起すると、コントロールマウスに比べ (CTGF^{fl/fl}; Cre(-) マウス) に比べ、蛋白尿や糸球体での炎症細胞浸潤が軽減した (Toda, Ishii et al. Sci Rep 7:46624, 2017)。一方、全身性 GC-A KO マウスでは、コントロールマウスと比較し、糸球体での CTGF mRNA 発現が約 2 倍に亢進していた。そこで、レニン - アンジオテンシン - アルドステロン系を活性化する本モデルにおけるポドサイトの CTGF の意義について着目した。

2. 研究の目的

そこで上記の背景から、腎臓におけるナトリウム利尿ペプチドのアルドステロン拮抗作用における CTGF の機能的意義についてノックアウトマウスを用いて検討することとした。すなわち本研究では、ポドサイト特異的 CTGF KO マウスを用いて、アルドステロン負荷・

GC-A 欠失による糸球体障害における CTGF の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ポドサイト特異的 GC-A コンディショナル KO マウス (pod GC-A cKO) : 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) と全身性誘導型 CTGF ノックアウトマウス (Rosa CTGF cKO) を交配して、ポドサイト特異的 GC-A ; CTGF ダブルノックアウト (pod GC-A ; CTGF dKO) マウスを作製した。さらに本マウスに対して 12 週齢で左腎摘出術を行い、その後 14 週齢から 6% 高食塩負荷、浸透圧ミニポンプによるアルドステロン投与を開始、毎週体重や血圧測定、蓄尿を計 4 週間継続した後屠殺を行い、pod GC-A ; CTGF dKO と pod GC-A cKO との表現型の比較検討を行った。

4. 研究成果

まず糸球体での CTGF mRNA 発現は、pod GC-A cKO と比較して pod GC-A ; CTGF dKO で約 40% 抑制されていた (図 1)。

血中のアルドステロン濃度は、pod GC-A ; CTGF dKO と pod GC-A cKO で同程度の上昇を認めた。次に体重、血圧 (図 2) 尿量、腎重量の測定を行ったところ、pod GC-A ; CTGF dKO と pod GC-A cKO との間でこれらの測定項目に明らかな差は認めなかった。さらに腎臓の組織学的検討を行った。糸球体サイズやメサンギウム基質の増生の程度を定量化したところ、両者に明らかな差を認めなかった。一方でアルブミン尿は pod GC-A ; CTGF dKO 群で増加を示す傾向 (図 3) が見られた。これは上記背景に示したこれまでの研究者らの検討からの予測とは合致しない興味深い現象であった。

以上の成績より、ポドサイトにおける GC-A 欠失はアルドステロン、高塩によるポドサイト障害をさらに増悪させるが、その悪化はポドサイトの CTGF を抑制することで予想に反してさらに増悪する可能性が示唆され、現在その現象と機序の解明にむけての解析をさらに進めている。

ctgf/Actb (glomerular)

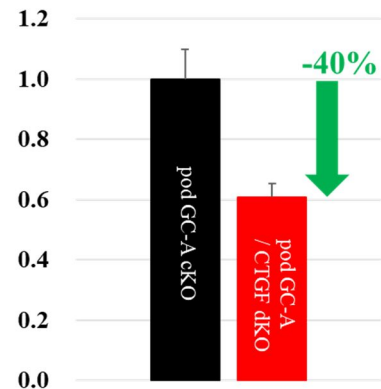


図 1 pod GC-A ; CTGF dKO における糸球体での CTGF の遺伝子発現 pod GC-A ; CTGF dKO で約 40% 抑制されていた。

収縮期血圧

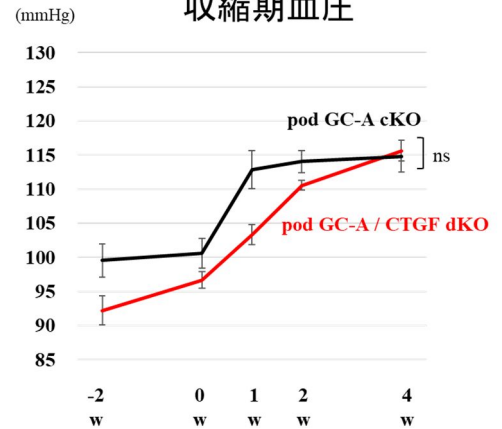


図 2 pod GC-A ; CTGF dKO における糸球体での血圧変化 pod GC-A ; CTGF dKO と pod GC-A cKO との間で明らかな血圧差は認めなかった。

尿中アルブミン・クレアチニン比

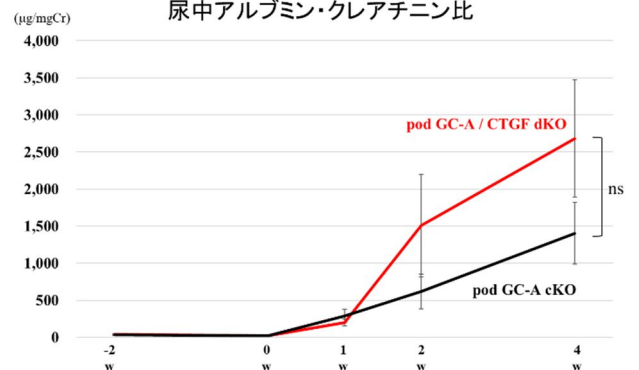


図 3 pod GC-A ; CTGF dKO におけるアルブミン尿変化 pod GC-A ; CTGF dKO では、pod GC-A cKO に比してアルブミン尿が増加する傾向が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Handa Takaya, Mori Keita P., Ishii Akira, Ohno Shoko, Kanai Yugo, Watanabe-Takano Haruko, Yasoda Akihiro, Kuwabara Takashige, Takahashi Nobuyuki, Mochizuki Naoki, Mukoyama Masashi, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteocrin ameliorates adriamycin nephropathy via p38 mitogen-activated protein kinase inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01095-8	査読の有無 無
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 Ohno Shoko, Ishii Akira, Yanagita Motoko, Yokoi Hideki	4. 巻 26
2. 論文標題 Calcium channel blocker in patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 207 ~ 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02153-1	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 ~ 2021年

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 ~ 2021年

1. 発表者名 半田貴也, 森 慶太, 石井 輝, 大野祥子, 金井有吾, 八十田明宏, 桑原孝成, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 オステオクリンはP38MAPKのリン酸化抑制を介してアドリアマイシン腎症を改善する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 石村拓也, 石井 輝, 大崎啓介, 戸田尚宏, 森 慶太, 半田貴也, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 Matrix metalloproteinase-10欠損マウスにおける腹膜線維化の抑制効果の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 石井 輝, 横井秀基, 中田紘介, 金子恵一, 北井悠一郎, 森 慶太, 戸田尚宏, 大崎啓介, 半田貴也, 佐藤有紀, 柳田素子
2. 発表標題 高脂肪, 高蛋白に追加した高食塩食は糖尿病性腎臓病を悪化させる
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 半田 貴也, 森 慶太, 石井 輝, 金井 有吾, 八十田 明宏, 桑原 孝成, 向山 政 志, 柳田 素子, 横井 秀基
2. 発表標題 オステオクリンはNPR1signalを促進し, リン酸化p38を抑制することで足細胞に保護 的に作用する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022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 ポドサイトにおけるp38MAPKの欠失はポドサイト特異的GC-Aノックアウトマウスの腎 障害を増悪させる
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 石村 拓也, 石井 輝, 大崎 啓介, 戸田 尚宏, 森 慶太, 半田 貴也, 柳田 素子, 横井 秀基
2. 発表標題 Matrix metalloproteinase 10欠損マウスにおける腹膜の炎症・線維化の抑制効果の 検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 西尾 治臣, 石井 輝, 杉岡清香, 戸田尚宏, 加藤有希子, 森 慶太, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 ポドサイトにおけるNPs/GC-Aシグナルに対するCCN2の意義
3. 学会等名 第12回 CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年～2022年

〔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
---------	---------