

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19721

研究課題名（和文）胎生期の栄養感知シグナルを介した健全な腎臓形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of healthy kidney formation via nutrient sensing signals during the fetal period

研究代表者

馬場 理也（Baba, Masaya）

熊本大学・病院・助教

研究者番号：10347304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、母体からの栄養が胎児の腎発生に与える影響を明らかにし、健全な腎発生促進に寄与する事を目的とする。このために、ネフロン前駆細胞特異的な栄養感知機構異常マウス（FlcnKOマウス）及び、妊娠母マウスの栄養制限による低出生体重モデルを用いて研究を進めた。低出生体重P0マウスでは糸球体数が減少しており、ヒトでの報告を裏付ける結果が得られた。FlcnKO P0マウスでは、ネフロン前駆細胞の減少とボウマン嚢の拡張、ヘンレの係蹄の異常が認められた。また、FlcnKOマウスの腎臓では栄養応答性転写因子Tfe3が核内に局在しており、Tfe3の異常な活性化が腎発生の異常に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓の機能単位であるネフロンは再生することがなく生理的な加齢と共に減少していく。その為、生涯にわたり腎臓の機能を良好に維持する為には、十分な数のネフロンを持った健全な腎臓を胎生期に形成する事が不可欠である。大規模な疫学調査により、胎生期における母体の低栄養が子供のネフロン数の減少と高い相関関係にあることが明らかにされており、胎生期の栄養と腎臓の発生の間には深い関係があることが示唆されてきた。母体の栄養制限で新生児のネフロン数が減少し、胎児の栄養感知機構のノックアウトがネフロン前駆細胞の減少を引き起こす事を見出した本研究は、母体からの栄養が胎児の腎発生に与える影響を明らかにする足がかりとなる。

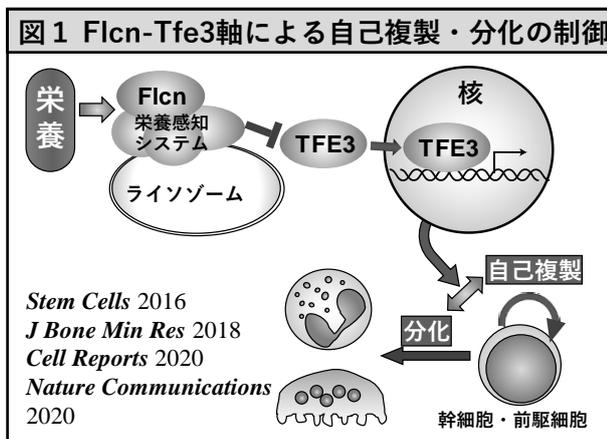
研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the effects of maternal nutrition on fetal kidney development and contribute to promoting healthy nephrogenesis. To this end, we conducted research using nephron progenitor cell-specific nutrient-sensing mechanism-deficient mice (FlcnKO mice) and a low birth weight model induced by maternal nutritional restriction during pregnancy. In low birth weight P0 mice, a reduction in the number of glomeruli was observed, supporting findings reported in humans. In FlcnKO P0 mice, a decrease in nephron progenitor cells, expansion of Bowman's capsule, and abnormalities in the loops of Henle were noted. Additionally, in the kidneys of FlcnKO mice, the nutrient-responsive transcription factor Tfe3 was localized in the nucleus, suggesting that abnormal activation of Tfe3 might contribute to kidney developmental abnormalities.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎発生 胎生期 栄養状態

1. 研究開始当初の背景

腎臓の機能単位であるネフロンは再生することがなく生理的な加齢と共に減少していく。その為、生涯にわたり腎機能を良好に維持する為には、十分な数のネフロンを持った健全な腎臓を胎生期に形成する事が不可欠である。ネフロン前駆細胞は胎生期に自己複製と分化のバランスを適正に保ちつつネフロンへと分化し、充分量のネフロンが形成される時期に全て分化して消失する。これまでの大規模疫学調査により、胎生期における母体の低栄養がネフロン数の減少ならびに慢性腎臓病の発症と高い相関関係にあることが明らかにされている。しかし、ネフロン前駆細胞の自己複製と分化のバランスが栄養状態によりどのように制御されているのか、その分子機構は未解明である。我々はこれまでの研究活動で、細胞内代謝シグナル制御分子 *Flcn* が転写因子 *Tfe3* の核内局在を制御する事で、幹細胞や前駆細胞の増殖と分化調節に根本的な役割を果たすことを明らかにして来た (図1)。ネフロン前駆細胞の自己複製と分化の運命決定においても、栄養・細胞内代謝が重要な役割を果たすのではないかと考え、ネフロン前駆細胞特異的な *Flcn* ノックアウトマウスを作製・解析する。また、妊娠母マウスの栄養制限による低出生体重モデルを作製し、解析する。



2. 研究の目的

本研究は、母体からの栄養が細胞内栄養感知機構を介し、ネフロン前駆細胞の自己複製と分化のバランスを制御する分子機構を明らかにする。さらに、そのバランス制御方法の開発へと展開し、健全な腎発生促進による健康寿命の延伸に寄与する事を目的とする

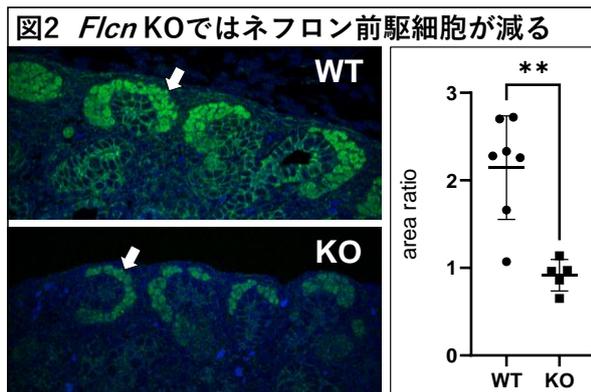
3. 研究の方法

- (1) ネフロン前駆細胞特異的 *Flcn* ノックアウトマウス新生児腎臓の詳細な解析
 - ・マウスを P0 で解剖し、腎臓を摘出、HE 染色及び免疫染色を行い、腎臓の発生を詳細に解析する。
 - ・セルソーターで分取したネフロン前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析を行う。
- (2) *Flcn*、*Tfe3* ダブルノックアウトマウス新生児の詳細な解析
 - ・ネフロン前駆細胞特異的 *Flcn* ノックアウトマウスを *Tfe3* ノックアウトマウスと交配し、ダブルノックアウトマウスを作製。
 - ・マウスを P0 で解剖し、腎臓を摘出、HE 染色及び免疫染色を行い、腎臓の発生を詳細に解析する。
- (3) 低体重出生マウスモデルの解析
 - ・母マウスのタンパク質制限食による低体重出生マウスを P0 で解剖し、腎臓を摘出、HE 染色及び免疫染色を行い、腎臓の発生を詳細に解析する。

4. 研究成果

【研究の主な成果】

- (1) ネフロン前駆細胞特異的 *Flcn* ノックアウト (*Flcn* KO) は腎臓の発生異常を起こす。
Flcn KO マウス及びコントロールマウスを P0 で解剖し、腎臓の組織切片の HE 染色を行い、形態を比較検討した。*Flcn* KO では明らかなボウマン嚢の拡張を認めた。また、髄質を中心に、膨化した細胞からなる蛇行した管を *Flcn* KO で認めた。この異常な管状構造の由来を調べる為、各種尿細管マーカーの免疫染色を行ったところ、ヘンレ係蹄のマーカーである NKCC2 が陽性に染まった。以上より、*Flcn* KO ではボウマン嚢とヘンレの係蹄に異常を認めることが明らかになった。
- (2) *Flcn* KO ではネフロン前駆細胞が減少する。
Flcn KO マウス及びコントロールマウスを P0 で解剖し、腎臓の組織切片を抗 *Six2* 抗体で免疫染色した。デジタル蛍光顕微鏡



下で *Six2* 陽性細胞（ネフロン前駆細胞）の面積を定量したところ、*Flcn* KO マウスでは有意にネフロン前駆細胞が減少していた（図2）。ネフロン前駆細胞の減少はネフロンの減少に反映される可能性がある。実際に *Flcn* KO マウスでは糸球体数が減少するという予備データがあった。今回、サンプル数を増やして糸球体数を改めて比較検討したところ、*Flcn* KO とコントロールの間に糸球体数の有意な差を認めなかった。

(3) *Flcn* KO ネフロン前駆細胞ではアミノ酸制御・mTORC1 関連遺伝子が増加している。

P0 マウスの腎臓を酵素処理して細胞懸濁液とし、*Six2*-GFP のトランスジーンにより GFP が陽性なネフロン前駆細胞を、セルソーターで分取した。続いて RNA を抽出し、RamDA-seq 法にて網羅的遺伝子発現解析を行った（図3）。*Flcn* KO ネフロン前駆細胞で優位に増加している遺伝子群の Gene Ontology 解析を行ったところアミノ酸制御・mTORC1 経路が上位にランクされた。引き続き、mTORC1 の活性を下流分子の免疫染色で評価している。

(4) *Tfe3* のノックアウトは *Flcn* KO の表現型を一部救済する。

Flcn KO の P0 腎臓において、*Tfe3* が核内に局在することを免疫染色で確認した。*Tfe3* の異常な活性化が *Flcn* KO の表現型を引き起こしている可能性を検証するために、*Flcn*、*Tfe3* ダブルノックアウトマウスを作製し解析した。*Flcn*、*Tfe3* ダブルノックアウトマウスではボウマン嚢の拡張が見られなくなった（図4）。一方でヘンレの係蹄の異常とネフロン前駆細胞の減少は *Tfe3* をノックアウトすることでも救済されなかった。*Flcn* の欠損により、*Tfe3* と同じ MiTF/TFE3 ファミリーに属する転写因子 *Tfeb* も異常に活性化することから、*Flcn* KO マウスの *Tfeb* ノックアウトマウスとの交配を進め解析を進めている。

(5) 母マウスの栄養制限による低体重出生マウスは糸球体数の減少を示す。

母マウスにタンパク質制限食を与え、低体重出生モデルを作製した。低体重出生マウス及びコントロールマウスを P0 で解剖し、腎臓の組織切片の HE 染色を行い、形態を比較検討した。低体重出生マウスにおいて優位に糸球体数が減少していた（図5）。引き続き *Six2* の免疫染色を行い、ネフロン前駆細胞数の評価を進めている。

【国内外における位置づけとインパクト】

ネフロン前駆細胞特異的な *Flcn* KO の解析はこれまでに国内外ともに行われていない。栄養感知システムを構成する *Flcn* が、ネフロン前駆細胞の数を規定しているという解析結果は、胎生期における母体の低栄養がネフロン数の減少を示す分子機構解明の糸口となり得る。

【今後の展望】

RamDA-seq 法によるネフロン前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析を更に進めるとともに、ネフロン前駆細胞の自己複製評価系を確立し、ネフロン前駆細胞の数が規定される分子機構解明へと展開する。

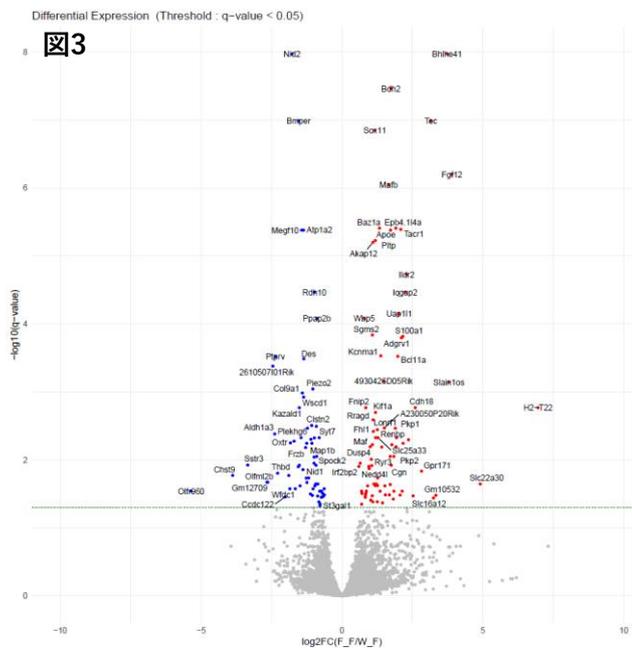


図4 *Tfe3* のノックアウトはボウマン嚢拡張を救済する

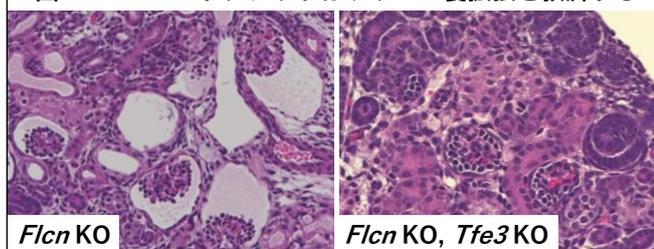
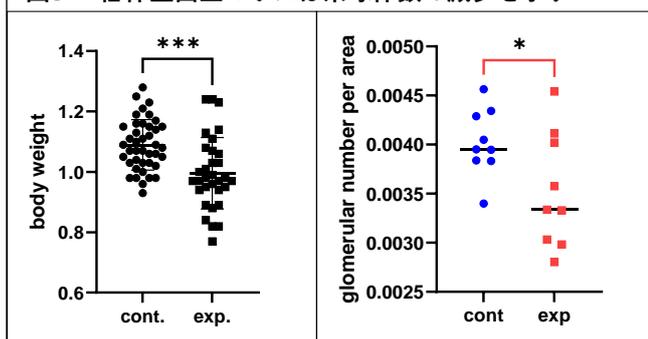


図5 低体重出生マウスは糸球体数の減少を示す



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tang J, Baba M.	4. 巻 14
2. 論文標題 MiT/TFE Family Renal Cell Carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	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) 10.3390/genes14010151.	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 -
1. 著者名 Takamatsu D, Kohashi K, Kiyozawa D, Kinoshita F, Ieiri K, Baba M, Eto M, Oda Y.	4. 巻 242
2. 論文標題 TFE3-immunopositive papillary renal cell carcinoma: A clinicopathological, immunohistochemical, and genetic study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	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) 10.1016/j.prp.2023.154313. Epub 2023 Jan 16.	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 -
1. 著者名 Jikuya R, Murakami K, Nishiyama A, Kato I, Furuya M, Nakabayashi J, Ramilowski JA, Hamanoue H, Maejima K, Fujita M, Mitome T, Ohtake S, Noguchi G, Kawaura S, Odaka H, Kawahara T, Komeya M, Shinoki R, Ueno D, Ito H, Ito Y, Muraoka K, Hayashi N, Kondo K, Nakaigawa N, Hatano K, Baba M, Suda T, Kodama T, et.al	4. 巻 25
2. 論文標題 Single-cell transcriptomes underscore genetically distinct tumor characteristics and microenvironment for hereditary kidney cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	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) 10.1016/j.isci.2022.104463. eCollection 2022 Jun 17.	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 Funasaki S, Mehanna S, Ma W, Nishizawa H, Kamikubo Y, Sugiyama H, Ikeda S, Motoshima T, Hasumi H, Linehan WM, Schmidt LS, Ricketts C, Suda T, Oike Y, Kamba T, Baba M.	4. 巻 113
2. 論文標題 Targeting chemoresistance in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma using a novel polyamide-chlorambucil conjugate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2352-2367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15364. Epub 2022 May 4.	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 Woodford MR, Andreou A, Baba M, van de Beek I, Di Malta C, Glykofridis I, Grimes H, Henske EP, Iliopoulos O, Kurihara M, Lazor R, Linehan WM, Matsumoto K, Marciniak SJ, Namba Y, Pause A, Rajan N, Ray A, Schmidt LS, Shi W, Steinlein OK, Thierauf J, Zoncu R, Webb A, Mollapour M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Seventh BHD international symposium: recent scientific and clinical advancement.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 173-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.28176. eCollection 2022.	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 Funasaki S, Mehanna S, Ma W, Nishizawa H, Kamikubo Y, Sugiyama H, Ikeda S, Motoshima T, Hasumi H, Linehan WM, Schmidt LS, Ricketts C, Suda T, Oike Y, Kamba T, Baba M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting chemoresistance in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma using a novel polyamide-chlorambucil conjugate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.15364.	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 Nishizawa H, Baba M, Furuya M, Kato I, Kurahashi R, Honda Y, Mikami Y, Nagashima Y, Eto M, Kamba T.	4. 巻 4
2. 論文標題 t(6; 11) renal cell carcinoma. A case report successfully diagnosed by using fluorescence in situ hybridization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Rep.	6. 最初と最後の頁 375-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12353.	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、穴見俊樹、倉橋竜磨、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 genome wide screeningによる転座型腎細胞癌の転写制御機構の解明
3. 学会等名 第33回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 Elucidation of Transcriptional regulation in Translocation Renal Cell Carcinoma Using CRISPR/Cas9 Genome-Wide Screening
3. 学会等名 Advancements in Urology 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 genome wide screening mediated clarification of carcinogenesis by a fusion TFE3
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 Elucidation of the carcinogenic mechanism of translocation renal cell carcinoma by CRISPR/Cas9 genome-wide screening
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、元島崇信、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 genome wide screening mediated clarification of carcinogenesis by a fusion TFE3
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shintaro Funasaki, Wenjuan Ma, Takanobu Motoshima, Yorifumi Sato, Yuichi Oike, Hisashi Hasumi, Toshio Suda, Tomomi Kamba, Masaya Baba
2. 発表標題 Hypoxia response pathway controls tumor development in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西澤秀和, 舟崎慎太郎, 元島崇信, 矢津田旬二, 馬場理也, 神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニングを用いた転座型腎細胞癌の発がん機構の解明
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaya Baba
2. 発表標題 Flcn role in blood and lymphatic system
3. 学会等名 BHD Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shintaro Funasaki, Sally Mehanna, Yasuhiko Kamikubo, Hiroshi Sugiyama, Shuji Ikeda, Yuichi Oike, Tomomi Kamba, Masaya Baba
2. 発表標題 Xp11.2転座型腎細胞癌の薬剤耐性回避メカニズムの解明と転座型TFE3の活性抑制による新しい治療薬の開発
3. 学会等名 Xp11.2転座型腎細胞癌の薬剤耐性回避メカニズムの解明と転座型TFE3の活性抑制による新しい治療薬の開発
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Shintaro Funasaki, Wenjuan Ma, Takanobu Motoshima, Yorifumi Satou, Yuichi Oike, Toshio Suda, Tomomi Kamba, Masaya Baba
2. 発表標題	低酸素応答経路の活性化によるXp11.2転座型腎細胞癌発がんメカニズムの解明
3. 学会等名	第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	西澤秀和、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、杉山豊、矢津田旬二、山口隆大、馬場理也、神波大己
2. 発表標題	t(6; 11) translocation renal cell carcinoma, successfully diagnosed by using FISH
3. 学会等名	The 37th KOREA-JAPAN Urological Congress (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	西澤秀和、上園英太、舟崎慎太郎、元島崇信、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題	SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture) による新規pVHL標的タンパク質の探索
3. 学会等名	第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	西澤秀和、元島崇信、馬文娟、舟崎慎太郎、蓮見壽史、佐藤賢文、古屋充子、長嶋洋治、尾池雄一、馬場理也、神波大己
2. 発表標題	Xp11.2転座型腎細胞癌で発現するキメラTFE3転写因子による低酸素応答経路の調節
3. 学会等名	第109回日本泌尿器科学術会総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 西澤秀和
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニングを用いた融合遺伝子TFE3による 発がんメカニズムの解明
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、元島崇信、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 genome wide screening mediated clarification of carcinogenesis by a fusion TFE3
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 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
研究分担者	有馬 勇一郎 (Arima Yuichiro) (60706414)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授 (17401)	

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