

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590899

研究課題名（和文） Foxc 転写因子の異常によるポドサイト傷害機序

研究課題名（英文） Roles of Foxc transcription factors in podocyte injury.

研究代表者

本島 英 (MOTOJIMA MASARU)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80468636

研究成果の概要（和文）：腎発生および糸球体硬化症の発症におけるFoxc1、Foxc2転写因子の役割を明らかにするために、各種ノックアウトマウス（KO）の導入および作製を試みた。

Foxc1 変異マウスで発生する重複腎において、異所性尿管芽に由来する上側の腎臓の組織像を検討したが、正常尿管芽由来の下側の腎臓および野生型マウスの腎臓との違いは認められなかった。Foxc1は、将来、腎実質を構成する後腎間充織で発現するにもかかわらず、ウォルフ管からの尿管芽形成の位置情報を制御しているという点が興味深い。Foxc2 KO マウス、Foxc1 ポドサイト特異的 KO マウスを作成し、解析中である。新たに Foxc2 loxP マウスの作成を行い、Foxc2 conditional KO マウスも作成可能となった。

研究成果の概要（英文）：This project is aimed to clarify roles of Foxc1 and Foxc2 in the kidney development and the development of glomerular sclerosis.

Mice carrying null mutated Foxc1 gene frequently develop anomalous double collecting system due to ectopic budding. However, ectopic budding per se does not contribute to kidney dysplasia. It is intriguing that Foxc1 expression does not affect the fate of metanephric mesenchyme where it is expressed but controls the site of bud formation by the Wolffian duct.

We are analyzing kidney tissues from Foxc2 null mice, podocyte specific Foxc1 knockout mice. We also generated Foxc2 loxP mice that enable us to generate kidney specific Foxc2 conditional knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2012年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは高度に分化した細胞であり、

基本的に増殖再生することができない。ポドサイトが傷害され糸球体から失われると、欠失部位は周囲の細胞によって修復され、血清蛋白質等の高分子物質に対するバリエーション機能を維持しようとする。しかしながら、このような修復機能にも限界があり、ポドサイトの欠失が閾値を越えると、糸球体硬化に陥り、腎機能が低下していくと考えられている。疾患により異なる機序のポドサイト傷害であっても、ポドサイト数の低下が糸球体硬化症の進行に直結する共通の原因となっている。傷害されたポドサイトではネフリンやポドシン等のポドサイトマーカーの発現が減弱し、通常は発現していないデスミンなどの発現が亢進してくる。我々の検討において、このような脱分化状態は初期には修復可能であるが、傷害が進行するとポドサイトは分化状態を維持できず、糸球体から失われていくことが明らかになっている。したがって、ポドサイトの分化状態を維持し、糸球体からの脱落を阻止することができれば、糸球体硬化症の進行を遅延、抑制できるものと推察される。しかしながら、ポドサイトの分化調節機構には不明な点が多い。本研究では腎臓内でポドサイトに限局して高発現する転写因子 **Foxc1** と **Foxc2** がポドサイトの分化調節機構と糸球体硬化症の発症機序に深く関係するという仮説を検証する。

**Foxc1** はAxenfeld-Rieger症候群の原因遺伝子のひとつであり、**Foxc1** ノックアウト(KO) マウスは先天性水頭症や、骨格の異常、眼の異常、心血管傷害を呈し出生直後に死亡する。CHMU/Leの遺伝的背景において、**Foxc1** KOマウスの腎臓は重複腎尿管異常を伴う。我々は**Foxc1** KOマウスにおいて、異所性尿管芽に由来する腎臓が低形成となることを明らかにし、**Foxc1** が先天性腎尿路奇形 (CAKUT) に関与する可能性を発見した。一方、**Foxc2** は**Foxc1** とほぼ相同 (97%) なDNA結合領域を持ち、Lymphedema-Distichiasis症候群の原因遺伝子のひとつである。**Foxc2** KOマウスは**Foxc1** KOと同様に骨格の異常や心血管傷害により胎児期から出生直後に死亡する。また、**Foxc2** KOマウスの腎臓において糸球体係蹄構築の異常や足突起の融合が見られるという報告がある。**Foxc1** と**Foxc2** の両方がヘテロ欠損する**Foxc1/2** Heterozygous compound KO (**Foxc1+/-; Foxc2+/-**) においては、骨格の異常や心血管傷害に加えて、遺伝的背景に関わらずに

重複腎尿管異常が頻発することが知られて

表1. 各種**Foxc1/2** KOの遺伝子型と表現型

| 遺伝子型                      | 表現型 |      |       |         |       |
|---------------------------|-----|------|-------|---------|-------|
|                           | 水頭症 | 骨格異常 | 心血管異常 | 重複腎尿管異常 | 糸球体異常 |
| <b>Foxc1-/-</b>           | +   | +    | +     | +       | ?     |
| <b>Foxc1+/-; Foxc2+/-</b> | -   | +    | +     | +       | ?     |
| <b>Foxc2-/-</b>           | -   | +    | +     | -       | +     |

いる。以上の結果は、**Foxc1** と**Foxc2** は腎臓の発生過程において互いの機能を補完し合っていることを示唆する。我々は泌尿生殖器系の遺伝子発現データベースであるGugmap (<http://www.gudmap.org>) のデータを解析し、腎臓における**Foxc1** と**Foxc2** の発現パターンがほぼ完全に一致することを見出した。すなわち、これらの転写因子は腎形成の初期に後腎間葉細胞に強く発現し、Renal vesicleからS字体までのネフロン形成の中間体において高発現であり、成熟したネフロンではポドサイトにその発現が限局してくる。抗**Foxc1** 抗体による免疫染色においても、成体の糸球体ではポドサイトと思われる細胞に強い染色性が見られる。したがって、**Foxc1** と**Foxc2** が腎尿路系の発生だけでなく、発生後のポドサイトの機能維持の役割も担っていると考える。

## 2. 研究の目的

本研究では腎臓内でポドサイトに限局して高発現する転写因子 **Foxc1** と **Foxc2** がポドサイトの分化調節と糸球体硬化症の発症機序に深く関係するという仮説を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では**Foxc1/2** が糸球体係蹄構築とポドサイトの分化及び機能維持に重要であるという仮説を検証するために以下の項目について検討する。

### 1. **Foxc1** は糸球体の正常発生とポドサイトの機能維持のために必須であるか？

**Foxc1** KO マウスの胎児について、糸球体の構造を電子顕微鏡により詳細に解析する。**Foxc1-/-**の糸球体は光顕レベルでは顕著な異常が見られなかったが、電顕による微細構造の解析は為されていない。また、**Foxc1** KO マウスは出生直後には死亡するので、成体のポドサイトにおける**Foxc1**の機能を解析することができない。そこで、我々が開発したポドサイト特異的にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (Nephrin-Cre) を利用して、ポドサイト特異的 **Foxc1** KO マウス (Nephrin-Cre;

Foxc1flox/flox) を作製し、ポドサイトにおける Foxc1 の欠損が糸球体の構造や機能に異常を引き起こすか否か検討する。出生直後に異常が見られなくても、成長に伴ってポドサイトに異常が出現することも有り得るので尿タンパクをモニタリングする。

## 2. Foxc1 と Foxc2 は協調的に働き、糸球体の正常発生とポドサイトの機能維持を司っている？

Foxc1/2 Heterozygous compound KO マウスの胎児については腎組織像に関する十分な知見が無いため、Foxc1 KO マウスと同様に光顕及び電顕レベルでの詳細な解析を行う。このマウスにおいては Foxc2 KO マウスと同様な所見が認められると予想する。

次に、ポドサイトにおいて Foxc1 をホモ欠損し、さらに全身で Foxc2 がヘテロ欠損するマウス (Nephrin-Cre; Foxc1flox/flox; Foxc2+/-) を交配により作製し、糸球体の構造や機能を解析する。ポドサイトに発現する Foxc1/2 の多くを欠損する Nephrin-Cre; Foxc1flox/flox; Foxc2+/- マウスでは、ポドサイトに異常が起こる可能性が非常に高いと思われる。まず、最初にポドサイトの異常に伴う足突起の融合が起こり、次いでメサンギウム領域が拡大すると予想する。同時に派生する Nephrin-Cre; Foxc1flox/+; Foxc2+/- マウスについても検討する。

表2. 解析予定マウス

| ポドサイトの遺伝子型         | 解析予定マウスの遺伝子型                                          | 解析対象     |
|--------------------|-------------------------------------------------------|----------|
| Foxc1-/-           | Foxc1-/-<br>N-Cre; Foxc1flox/flox                     | 胎児<br>成体 |
| Foxc2-/-           | Foxc2-/-                                              | 胎児       |
| Foxc1+/-; Foxc2+/- | Foxc1+/-; Foxc2+/-<br>N-Cre; Foxc1flox/+; Foxc2+/-    | 胎児<br>成体 |
| Foxc1-/-; Foxc2-/- | N-Cre; Foxc1flox/flox; Foxc2+/-<br>N-Cre; Nephrin-Cre | 成体       |

## 4. 研究成果

分化を開始したネフロンや成体腎では Foxc1 と Foxc2 の発現部位は重複しており、どちらもポドサイトに限局して発現が認められることを In situ ハイブリダイゼーション法にて確認した。

Foxc1 KO マウス (Foxc1-/-) の新生仔は、水腎症を伴った重複腎、重複尿管、巨大尿管などの腎尿路奇形を伴って出生した。このことから Foxc1 は尿管芽の発芽位置を特定するために重要であると考えられた。水

腎症、巨大尿管は、尿の逆流によるものと考えられた。しかし、これらのマウスの腎実質には、野生型マウスとの違いが認められなかった。すなわち、重複腎組織像は正常と同様で、Nephrin、Megalin、AQP-1、Tamm-Horsfall protein 等の各ネフロンセグメントマーカーの発現にも違いは認められなかった。

Foxc1 は、将来、腎実質を構成する後腎間充織で発現するにもかかわらず、ウォルフ管からの尿管芽形成の位置情報を制御しているという興味深い結果を得た。

Foxc1 の発現が成体腎ではポドサイトに限局することから、Nephrin-Cre; Foxc1loxP/loxP はポドサイトに異常をきたし、糸球体硬化を発症すると期待していたが、生後6か月が経過した現在も、尿タンパクや腎組織の異常は確認されていない。このマウスの腎皮質から調整した DNA に Foxc1 の欠失が確認されたことから、ポドサイトにおいて Cre による組み換えは起こっているものと推察された。ポドサイト傷害負荷への反応や Foxc2 が代償的に活性化される可能性を検討することが必要であると考えられた。

現在、Foxc1 ポドサイト特異的 KO マウスに Foxc2 ヘテロ欠損するマウスの解析が進行中である。また、Foxc2 が単一エクソン遺伝子であるため、Foxc2loxP の作製は困難を極めたが、ダブルセレクション法により目的の ES 細胞を得ることに成功した。4倍体胚補完法により、この ES 細胞からのマウス作製に成功し、今年度内には申請者等の施設で利用可能な状態となる見込みである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Komaki, F.; Miyazaki, Y.; Niimura, F.; Matsusaka, T.; Ichikawa, I.; Motojima, M. Foxc1 gene null mutation causes ectopic budding and kidney hypoplasia, but not dysplasia. CELLS TISSUES ORGANS、査読有、In press.

[学会発表] (計1件)

1. 発表者：本島 英、小牧文代、宮崎陽一、新村文男、松阪泰二、市川家國 演題名：Ectopic ureteral budding from the wolffian duct results in hypoplastic, but not dysplastic, kidney.

学会名：米国腎臓学会年会、発表年月日：  
2011年11月10日、発表場所：フィラデルフ  
ィア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本島 英 (MOTOJIMA MASARU)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80468636

(2) 研究分担者

松阪 泰二 (MATSUSAKA TAIJI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50317749

(3) 連携研究者

市川 家國 (ICHIKAWA IEKUNI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80317768

宮崎 陽一 (MIYAZAKI YOICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60266690