

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591190

研究課題名(和文)CTGFを標的とした新規腎疾患治療の探索

研究課題名(英文)Investigation of a novel therapy for renal diseases by inhibiting CTGF

研究代表者

横井 秀基 (YOKOI, HIDEKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定病院助教

研究者番号：90378779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：CTGFはTGF-betaの作用を増強する因子である。本研究はコンディショナルCTGFノックアウトマウスを用いて、糖尿病性腎症モデルならびに抗糸球体基底膜腎炎モデルを作製し解析を行った。全身性誘導性に生後CTGFをノックアウトさせた(ROSA-CTGF cKO)マウスおよびポドサイト特異的CTGF欠損マウスは、ストレプトゾトシン誘発による糖尿病性腎症モデルにおいては変化を認めなかった。一方、ROSA-CTGF cKOマウスは抗糸球体基底膜腎炎マウスにおいて、蛋白尿が約50%、マクロファージ浸潤が約40%、半月体形成を含む糸球体変化、細胞外基質産生が抑制されることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) regulates signaling of other growth factors and promotes fibrosis. We examined the role of CTGF in diabetic nephropathy and in anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) nephritis, using conditional CTGF knockout mice. Systemic inducible CTGF knock out (ROSA-CTGF cKO) mice and podocyte-specific CTGF knockout mice exhibited no apparent phenotypic changes in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. In anti-GBM nephritis model, ROSA-CTGF cKO mice ameliorated proteinuria by 50%, macrophage infiltration in glomeruli by 40%, glomerular changes including crescentic formation, extracellular matrix deposition and thickness of GBM in electron microscopic analysis compared with control mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：内科 腎臓内科 糸球体腎炎

1. 研究開始当初の背景

Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)は強い細胞外基質産生作用を持つ。糸球体基底膜 (GBM) 抗体腎炎ならびに糖尿病性腎症における CTGF の意義を解明するために全身性誘導型 CTGF ノックアウトマウスおよび糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 特異的 CTGF ノックアウトマウスを作製し、CTGF 減少による表現型の違いを評価することを目的としている。

研究代表者は腎疾患において CTGF が TGF- β と協調して細胞外基質産生作用を亢進することを報告してきた。また、ポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウス (CTGF-Tg)を作出し、ストレプトゾトシンにより糖尿病を惹起したところ、糖尿病性腎症の経過がポドサイト特異的 CTGF 過剰発現マウスでは増悪することを報告した (Yokoi et al. *Kidney Int* 2008)。さらに解析をすすめるために、誘導型 CTGF ノックアウトマウス (CTGF floxed マウス) を作製した。CTGF 翻訳領域の両端に loxP を挿入した。この CTGF floxed/floxed (fl/fl) マウスを全身性の誘導可能な RosaCreER^{T2} マウス (変異エストロゲン受容体と Cre recombinase のキメラ蛋白を全身で発現するマウス) と交配し (Rosa-CTGF cKO マウス)、4-hydroxytamoxifen を投与することで、CTGF 遺伝子発現が腎において 81% 低下した。また、podocyte 特異的 CTGF ノックアウトマウスを Nephron プロモーター下で発現する Cre リコンビナーゼマウス (Nephron-Cre マウス) との交配により作製した (pod-CTGF cKO マウス)。このマウスは 16 週までの経過ではタンパク尿を呈さず、体重・血圧も野生型と変化なく、腎形態もほぼ正常であった。これらのマウスを用いて、慢性腎臓病における CTGF の意義を検討する。

2. 研究の目的

本研究では、Rosa-CTGF cKO マウスなら

びに pod-CTGF cKO マウスに糖尿病性腎症をストレプトゾトシンを用いて惹起し、糖尿病性腎症における CTGF 抑制の意義を検討する。また、同マウスに抗糸球体基底膜抗体腎症を発症させ、腎炎における CTGF の意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 1型糖尿病モデルマウスにおける Rosa-CTGF cKO マウスおよび pod-CTGF cKO マウスの解析

Rosa-CTGF cKO マウスは生後 3 週で 4-hydroxytamoxifen 0.05mg/kgBW の 3 日間連日腹腔内投与した。Rosa-CTGF cKO マウスもしくは pod-CTGF cKO マウスにストレプトゾトシン 100 mg/kgBW を 3 回腹腔投与を行い 4 週毎に血圧、体重、尿中アルブミン計測を行い、投与 12 週後に屠殺し、組織学的検討、電子顕微鏡、糸球体内 MAC2 陽性細胞数、単離糸球体 mRNA 発現を解析した。

(2) 抗糸球体基底膜抗体腎炎における Rosa-CTGF cKO マウスの解析

Rosa-CTGF cKO マウスに生後 3 週で 4-hydroxytamoxifen 0.05 mg/kgBW を 3 日間連日腹腔内投与し、全身性に CTGF を欠損させた。次に 8 週齢で兔 IgG を腹腔内投与し前感作を行い、その 1 週後に兔抗糸球体基底膜抗体を投与し、抗糸球体基底膜抗体 (GBM) 腎炎を惹起した。Day 3, 7, 14, 28 に蓄尿を行い、尿蛋白排泄量を検査し、Day 28 に屠殺し組織学的検討、電子顕微鏡による評価、糸球体内 MAC2 陽性細胞数、単離糸球体 mRNA 発現を行った。

4. 研究成果

(1) 1型糖尿病モデルマウスにおける Rosa-CTGF cKO マウスおよび pod-CTGF cKO マウスの解析

まず pod-CTGF cKO マウスにストレプトゾトシンと投与し、糖尿病を惹起し、解析を行った。体重、血圧、糖代謝において両群で差を認めなかった。また尿中アルブミン排泄量

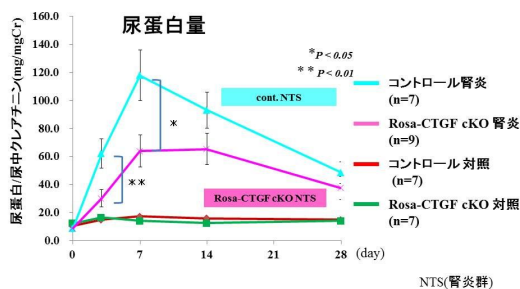
は糖尿病マウスでは、コントロールマウスに比して、約 3 倍程度増加するが、pod CTGF cKO マウスとコントロールマウスでは差を認めなかった。また組織学的・電子顕微鏡学的にも差を認めず、単離糸球体 mRNA 発現ならびに糸球体内 MAC 2 陽性細胞数も差を認めなかった。

次に、Rosa-CTGF cKO マウスにストレプトゾトシンを投与し糖尿病を惹起したが、同様に糖尿病コントロールマウスと比して、体重、血圧、糖代謝、尿中アルブミン排泄量、腎組織、糸球体 mRNA 発現で差を認めなかった。

(2) 抗糸球体基底膜抗体腎炎における Rosa-CTGF cKO マウスの解析

抗 GBM 腎炎を惹起した Rosa-CTGF cKO マウスとコントロールマウスを比較した。コントロールマウスでは尿蛋白排泄量は day 7 をピークに 120 mg/mgCr であったが、Rosa-CTGF cKO マウスでは 60 mg/mgCr と有意に低下していた (図) 。

抗GBM腎炎においてCTGF cKOマウスは尿蛋白量が低下している



糸球体における半月体形成率もコントロールマウスの 6% から Rosa-CTGF cKO マウスでは 3% と低下していた。電子顕微鏡で糸球体基底膜の肥厚を計測したところ、コントロール腎炎群で増加した肥厚が、Rosa-CTGF cKO 腎炎群では減少していた。マクローファージに染色される糸球体内 MAC 2 陽性細胞数はコントロール腎炎群で増加するが、Rosa-CTGF cKO マウスでは浸潤細胞数が約 4 割減少していた。

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 6 件)

Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. *PLoS One* 9:e88942, 2014. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0088942

Kasahara M, Nakagawa T, Yokoi H, Kuwabara T, Yasuno S, Mori K, Mukoyama M, Ueshima K. Do statins play a role in renoprotection? *Clin Exp Nephrol* 18:282-285, 2014. 査読有

doi: 10.1007/s10157-013-0928-z

Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Toda N, Yamada R, Namoto S, Yamamoto T, Seki N, Souma N, Yamaguchi T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Peritoneal fibrosis and high transport are induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. *Perit Dial Int* 33:143-154, 2013. 査読有

doi: 10.3747/pdi.2011.00033

Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kato Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 23:1198-1209, 2012. 査読有

doi: 10.1681/ASN.2011100985

Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Ogawa Y, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K. Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia* 55:2256-2266, 2012. 査読有

doi: 10.1007/s00125-012-2578-1

Yokoi H, Kasahara M, Mori M, Ogawa Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Kato Y, Mori KP, Toda N, Ohno S, Muramatsu M, Muramatsu T, Sugawara A, Mukoyama M and Nakao K. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis *Kidney Int* 81:160-169, 2012.

doi: 10.1038/ki.2011.305.

〔学会発表〕(計 4 件)

N.Toda, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, H.Imamaki, K.Koga, A.Ishii, Y.Kato, K.P.Mori, S.Ohno, A.Sugawara, T.Matsusaka, K.Nakao, M.Mukoyama. Systemic Deletion of CTGF Ameliorates Anti-Glomerular Basement Membrane Nephritis with Reduction of Macrophage Infiltration

米国腎臓病学会年次総会

2013年11月7-10日, 2013日、米国アトランタ

戸田尚宏、横井秀基、笠原正登、森 潔、
栞原孝成、今牧博貴、石井輝、古賀健一、
森慶太、加藤有希子、大野祥子、菅原照、
向山政志、中尾一和

抗糸球体基底膜 (GBM) 腎炎における
CTGF の意義

第 56 回日本腎臓学会学術総会

2013年5月10-12日 東京

N.Toda, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, H.Imamaki, K.Koga, A.Ishii, Y.Kato, K.P.Mori, S.Ohno, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao

Inducible CTGF (CCN2) Knockout Mice Attenuates Anti-Glomerular Basement Membrane Nephritis

米国腎臓病学会年次総会

2012年10月30日-11月4日、サンディエゴ、米国

K.Koga, H.Yokoi, M.Mukoyama, K.Mori, M.Kasahara, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, A.Ishii, K.P.Mori, Y.Kato, M.Saleem, A.Sugawara, K.Nakao.

Functional analysis of miR-30c, miR-26a and miR-379 in podocytes and their potential roles in diabetic nephropathy

米国腎臓病学会年次総会

2011年11月8-13日、フィラデルフィア、米国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学腎臓内科ホームページ

<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/yokoi.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：90378779