

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591202

研究課題名(和文) BMPによる糸球体血管系蹄発生と正常構造維持における役割

研究課題名(英文) A role of BMP on the development of glomerular capillary tufts

研究代表者

宮崎 陽一 (Miyazaki, Yoichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60266690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：Dox投与により、Podocyte 特異的にBMP阻害たんぱく質であるNogginを発現するPodocine-rtTA; Tet0-Nogginを作成。Dox投与により、糸球体構造には変化を認めなかったが、近位尿細管におけるTGレクチンの染色性の低下、間質の浮腫性拡大、P-Smad1/5/8 陽性細胞数低下が認められた。近位尿細管にはBMPは発現せず、BMP7受容体が発現すること、胎生期におけるpodocyte特異的BMP7ノックアウトでは近位尿細管の形成不全が生ずることから、成体においても、Podocyte障害はBMPの発現低下を介して近位尿細管障害の原因となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established the transgenic mouse line (Podocine-rtTA; Tet0-Noggin), in which Noggin, Bmp inhibitor, was selectively expressed only in the podocytes under the control of Dox. We then analyzed the adult transgenic mice with or without Dox for 3 months. Podocine-rtTA; Tet0-Noggin with Dox showed a reduced expression of TG-lectin expression in proximal tubules, interstitial edema and a decrease in proximal tubular cells positive for phosphorylated Smad1/5/8. In contrast, the morphology of glomerulus appeared normal. It has been shown that BMP7-receptor, but not BMP per se, is not expressed in proximal tubules. Conditional knockout of Bmp7 in podocytes has been reported to lead to a defect in proximal tubule development during embryonic stage. In conjunction with these findings, we assume that, in adulthood also, the podocyte injury cause not only the development of glomerulosclerosis, but also a damage in proximal tubules via a decrease of BMP expression.

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：Noggin podocyte proximal tubule cross-talk

1. 研究開始当初の背景

申請者らは前年度までに、糸球体上皮細胞にのみほぼ特異的に発現を drive する *Nephrin promoter* の下流に BMP の阻害たんぱく質である *noggin* を連結し、transgenic mouse (*Nephrin-Noggin*) を作成したところ、出生直後には糸球体血管係蹄におけるメサンギウム細胞の欠如、および近位尿細管の発達障害が認められ (J Am Soc Nephrol 2008)、生後 12 ヶ月においては顕著なメサンギウム領域の拡大と糸球体の硬化を一部のマウスに認め、その異常は糖尿病性腎症に認められるびまん性病変に酷似することを報告した (Biochem Biophys Res Commun 2006)。以上から、腎糸球体における BMP の抑制が糖尿病性腎症にみられる特徴的糸球体病変の形成に一部関与する可能性も示唆されたが、sh しながら *Nephrin-Noggin* では糸球体の発生段階においてすでに異常がみられることから、成体腎に認められるこの変化は発生段階の異常に伴う二次的な変化である可能性も考えられた。したがって現在までのところ、成体における、糸球体上皮細胞 BMP の生理作用の詳細はほとんどわかっていない。また成体腎において糸球体に発現する BMP の subclass は不明であり、本研究において作成する Doxycycline で誘導可能な糸球体上皮細胞特異的 *Noggin* transgenic mouse は多くの BMP 機能を抑制するための有用な系であると考えられる。

これらの知見を受け、本研究では成体腎における BMP の生理作用をより詳細に明らかにするため以下の実験を行った。

2. 研究の目的

Tet-on system を用いることにより、誘導可能で、podocyte 特異的に *Noggin* (BMP 阻害たんぱく質) を産生する Transgenic mouse を作成し、成体腎における糸球体血管係蹄あるいは尿細管の正常構造維持に対する生理作用やその分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

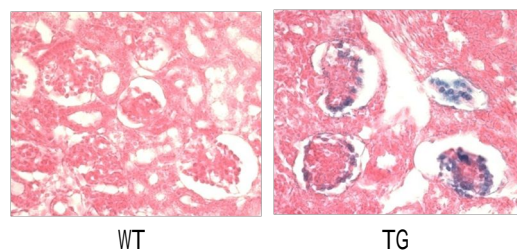
Tet-on system によって発現誘導される糸球体上皮細胞特異的 *Noggin transgenic mouse* の作成を行った。*Noggin* cDNA を *Tet 0 promoter* の下流に連結。Expression cassette

を作成し DNA を精製。フェニックスバイオ株式会社に受託し計 150 個の受精卵に injection した。計 80 匹の出生マウスの tail DNA を解析したところ、10 匹の mouse ゲノム DNA に transgene が組み込まれている事を確認、*Tet 0-Noggin* mice とした。この responder mice それぞれを、確立した activator transgenic line である *Podocine-rtTA mice* (ミシガン大学 Dr JB Kopp から供与) と交配した。

4. 研究成果

(1) 新たに作成した *Tet0-Noggin* の founder mouse とすでに確立した *Podocine-rtTA* を交配し dual transgenic mouse (*Podocine-rtTA; Tet0-Noggin*) を作成し、Doxycycline を投与し、出生直後の腎組織を解析した。その結果、糸球体血管係蹄の虚脱、糸球体嚢胞の形成および尿細管発達障害という phenotype を呈する 2 つの別個の founder mouse 由来の *Podocine-rtTA; Tet0-Noggin* pups が認められた。

(2) 次に Dox 投与により安定して形質を示す *Podocine-rtTA; Tet0-Noggin* mouse の系統樹立を試みた。*Podocine-rtTA; Tet0-Noggin* を C57BL6/J と 3 回以上 backcross した結果、Dox 投与群のみ糸球体上皮細胞に *Noggin* の発現や lac Z の発現を認め(図)、



糸球体血管係蹄の虚脱、糸球体嚢胞の形成および尿細管発達障害という形質を 9 割以上の確率で示す、独立した 2 系統の *Podocine-rtTA; Tet0-Noggin* の mouse line の樹立に成功した。

(3) そこで成体における糸球体上皮細胞 BMP の機能を検討する目的で、*Podocine-rtTA; Tet0-Noggin* を継代・繁殖し、3~5 ヶ月令のマウスに 3 ヶ月間 Dox を投与し (Dox+, n=8)、Dox を投与しなかったマウス

(Dox-, n=6)と比較してみると、尿蛋白排泄量や糸球体構造に関して両者に明らかな差は認められなかった。しかしながら、Dox+ではDox-と比較し、TG-lectin陽性の近位尿細管が有意に減少していた。近位尿細管細胞の増殖活性と細胞死を検討したところ、Dox+ではDox-と比較しTUNEL+細胞は同程度に認められたが、BrdU+細胞が有意に少なかった。Dox+ではコラーゲンの増加を伴わない間質幅の拡大が認められ、間質の浮腫性拡大と判断された。最後に、近位尿細管細胞におけるSmad1/5/8のリン酸化を検討したところ、Dox+では有意にP-Smad1/5/8陽性細胞数が低下していた。

(4)さらに、もう一方のfounder mouseから確立した別のlineを用い確認実験を行った。2ヶ月令のマウスをDox投与群(Dox+, n=10)、Dox非投与群(Dox-, n=8)に分け、3ヶ月後解析したところ、上記と同様な所見が得られた。以上の結果は、成体における近位尿細管の正常構造の維持はBMP依存性であることを示唆する。そのBMPが糸球体上皮細胞由来か否か今回の検討からは結論できない。しかしながら近位尿細管にはBMPは発現していないこと一方、近位尿細管にはBMP7受容体が発現すること過去の報告から、胎生期におけるpodocyte特異的BMP7ノックアウトでは近位尿細管の形成不全が生ずることが報告されている。以上から、成体においても、podocyte由来BMPの低下が近位尿細管障害に関与する可能性が高いと判断された。一方、糸球体の構造には有意な変化を惹起しなかった。

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4件)

Miyazaki Y, Shimizu A, Pastan I, Taguchi K, Naganuma E, Yokoo T, Saito A, Miyata T, Yamamoto M, Matsusaka T. Keap1 inhibition attenuates glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant 2014; 29; 783-791 (査読有)

Miyazaki Y, Shimizu A, Ichikawa I,

Hosoya T, Pastan I, Matsusaka T. Mice are unable to endogenously regenerate podocytes during the repair of immunotoxin-induced glomerular injury. Nephrol Dial Transplant 2014; 29; 1005-1012 (査読有)

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 2013; 198; 22-27 (査読有)

Shimizu A, Zhong J, Miyazaki Y, Hosoya T, Ichikawa I, Matsusaka T. ARB protects podocytes from HIV-1 nephropathy independently of podocyte AT1. Nephrol Dial Transplant 2012; 27; 3169-3175 (査読有)

[学会発表](計2件)

Suyama M, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T. Podocyte-Derived VEGF Regulates Glomerular Tuft Development via the Suppression of PDGF Receptor Phosphorylation of the Smooth Muscle. Annual Meeting of American Society of Nephrology October 2012, San Diego, CA

清水 昭博、松阪 泰二、宮崎 陽一、細谷 龍男、宮田 敏男、山本 雅之。Keap1-Nrf2経路と糖尿病性腎症。日本腎臓学会学術総会(シンポジウム), 2012年6月, 横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 陽一 (Yoichi Miyazaki)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60266690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし