

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790329

研究課題名(和文) 転写因子Storkheadボックス1蛋白の生物学的・病理学的意義の検討

研究課題名(英文) Biological and pathological function of Storkhead-protein 1

研究代表者

金崎 めぐみ (KANASAKI, Megumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：50599355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは世界に先駆け転写因子Storkhead-protein 1 (Stox1)ノックアウトマウスを作成した。Streptozotocin投与1型糖尿病モデルでは投与後2ヶ月でLittermate wild typeマウスとstox1ノックアウトマウスを比較検討した場合、C57Bl6系統ではgenotypeによる差を認めなかったが、129系統ではwild typeに比しstox1ノックアウトマウスで有意な尿アルブミン上昇と著明な尿細管間質の線維化を認めた。Stox1が慢性的な高血糖状態における腎障害の進展に寄与しており、マウスのストレインにより差があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor Storkhead-protein 1 (Stox1) localize on the chromosome 10q22 which has been reported as a responsible site of type 2 diabetic nephropathy and severe hypertension. Applicants created Stox1 knockout mice and reported first in the world. When compared streptozotocin induced diabetic model of our Stox1 knockout mice to it's littermate wild type mice, in SV129 strain Stox1 knockout mice shows significantly more albuminuria and more histologically severe renal tubulointerstitial fibrosis, whereas in C57Bl6 strain obvious phenotype change were not detected between the two genotypes. We showed that Stox1 contributes to the development of renal failure in chronic hyperglycemia state and also that there is a difference by a mouse strain in the role of Stox1 for development of diabetic renal vascular complications.

研究分野：糖尿病B

キーワード：Stox1 糖尿病性腎症 腎線維化

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病（肥満や糖尿病、高血圧、メタボリック症候群、癌、様々な精神神経疾患）は、素因を有する人間が様々な環境因子に長期間暴露された際に発症すると考えられるが、全世界における発症規模を考慮に入れると、その素因は多くの人々が共有し、おそらく人類が進化の過程で必要不可欠として獲得したものであると考えられる。Storkhead-box protein 1 (ストークヘッドボックス1蛋白:以後 Stox1)は、FOX familyに属する転写因子で、ヒト染色体座10q22に局在する。詳細な Stox1 の分子機能は不明であるが、Stox1 が妊娠中における高血圧・腎機能障害を主徴とする疾病、妊娠高血圧腎症(preeclampsia)の責任分子である可能性が SNP 解析により示された。(Nat Genetics 2005)。我々は Stox が、特に脳、精巣、卵巣、脾臓、および胎盤に強く発現していることを見出した。我々が作成した Stox1 ノックアウトマウスではレニンが胎盤において強く発現しており(図1、Kanasaki et al, Submitted)、胎盤におけるレニン発現増強がレニン-アンギオテンシン昇圧機構を介して妊娠高血圧を誘導し、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬ロサルタン投与により抑制されることが明らかとなった。またそのような Stox1 不全は、胎盤での血管不全・細胞外基質増加を伴い、それらはロサルタン投与により改善した。siRNA を用いた検討では、Stox1 がレニン転写の negative regulator であり、Stox1 がレニン遺伝子の3' -UTRに作用し mRNA 分解を促進する可能性を見いだした。興味深いことに10q22は、糖尿病性腎症の候補責任部位として報告され(Chen G et al 2007)、また、炎症反応をとともう高血圧患者との関連の報告もなされている(Ding K 2008)。Stox1 ノックアウトマウスを用いて糖尿病モデルを誘導し、Stox1 不全の糖尿病血管

合併症進展における意義を検討することで病態解明の一助となると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) Stox1 不全の糖尿病血管合併症進展における意義を検討し、新たな病態分子機構を解明する。

(2) Stox1 作用増強薬開発を展開するための基盤となる研究を実施する。

## 3. 研究の方法

本研究では転写因子の Stox1 不全が糖尿病性腎症の発症や進展に与える影響を検討し、Stox1 調節系を介した新たな糖尿病性腎症の病態機構を明らかにすることを目的としており、以下の実験を行った。

(1) Stox1 ノックアウトマウスと litter mate 野生型マウスに高脂肪(30%脂肪/総カロリー)食を12週間投与し食事誘導型肥満2型糖尿病モデルを誘導した。

(2) 申請者らが作成した Sv/129 系統 Stox1 ノックアウトマウス、逆交配により得られた C57Bl/6 系統 Stox1 ノックアウトマウスおよびこれらの litter mate 野生型マウスを用い、生後8週にストレプトゾトシン (Sv/129 系統には 50mg/kg を5日間連日、C57Bl/6 系統には 200mg/kg を1回)を腹腔内注射し1型糖尿病モデルを誘導した。

(3) (1)、(2)のマウスの糖尿病性腎症の発症や進展について、尿アルブミン測定、腎組織免疫染色を行い比較検討を行った。

(4) Stox1 と相互作用するタンパクを同定するため Stox1 cDNA クローニングを行った。

## 4. 研究成果

(1) ストレプトゾトシン(STZ)投与によりインスリン枯渇1型糖尿病を Stox1 ノックアウトマウスに誘導すると、糖尿病発症後3-4週でその2割程のマウスで著明な蛋白尿とともに著明な浮腫、腹水を認めた。こ

これらの変化は同系統の野生型マウスには認められなかった。

(2) STZ 投与後 2 ヶ月で C57Bl6 系統および 129 系統共に littermate wild type マウスで尿アルブミンの増加を認めた。

Littermate wild type マウスと *stox1* ノックアウトマウスを比較検討した場合、C57Bl6 系統では genotype による差を認めなかったが、129 系統では wild type に比し *stox1* ノックアウトマウスで有意な尿アルブミン上昇 (図 1) と著明な尿細管間質の線維化 (図 2) を認めた。またこのような腎臓表現系の違いは腎臓レニン発現とも相関し、C57Bl6 マウスにおいて腎臓レニン発現に genotype による差異を認めなかったが、129 系統マウスでは *stox1* ノックアウトマウスで腎レニンの増加を認めた。

(3) 高脂肪食投与メタボリックシンドロームマウス (食事誘導型肥満 2 型糖尿病モデル) にて、予想に反して 12 週まで経過しても尿アルブミン排泄増加を認めず (逆に低下した)、それらに genotype の影響は認めなかった。また、血糖や体重、耐糖能にも明らかな異常を見いだせなかった。

(4) しかしながら興味深い事に、対照群 (wild type littermate male) では高脂肪食群で尿細管に顕著な lipid droplet を認めるのに対して、*Stox1* ノックアウトマウスでは lipid droplet はほとんど存在しなかった。Lipid droplet には腎を含めた臓器保護効果との関連があるとも報告されており、今後検討を行って行く。腎臓線維化も 12 週間まで投与したマウスではいずれの genotype でも認めなかった。

(5) 129sv マウスを用いて、腎臓線維芽細胞の由来と考えられている内皮間葉分化 (EndMT) および上皮間葉分化 (EMT) の解析実験を行った。EndMT を CD31 陽性-aSMA 陽性、もしくは、CD31 陽性-FSP1 陽性、EMT を E-cadherin 陽性-aSMA 陽性細胞の存在とし

て評価した場合、予想通り、STZ 投与糖尿病にて *Stox1* ノックアウトでは EndMT、EMT 惹起細胞が増加していた。

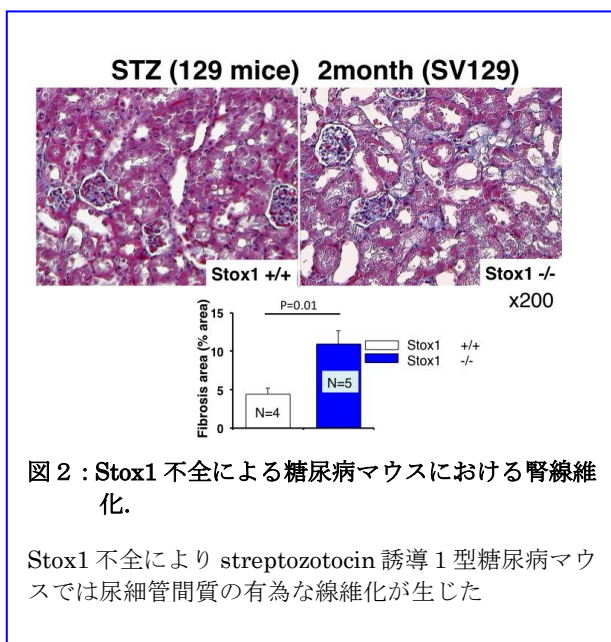
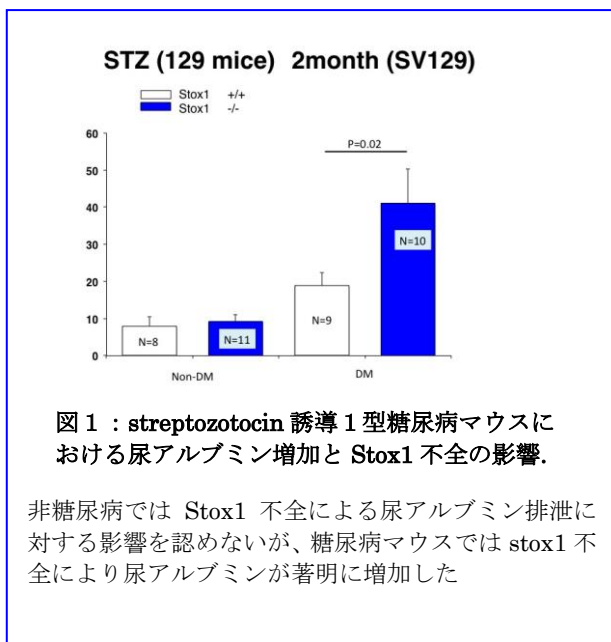
(6) *Stox1* の cDNA はクローニングを行い、全長 cDNA を入手した。

反省点、考察

今回の検討では *stox1* 不全による糖尿病腎症の発症進展機序への寄与を検討した。残念ながら 2 型糖尿病モデルマウスはヒト表現系を再現する良いモデルが存在せず、高脂肪食投与メタボリックシンドロームモデルを用いたが、既報と異なり野生型マウスで尿アルブミン排泄が増加せず、実験系の再考が必要である。また、*stox1* ノックアウトマウスでは尿アルブミンが抑制されており、可能性として過剰な尿アルブミン再吸収が尿細管に存在する可能性を排除しない。レプチン不全マウス (ob/ob) やレプチン受容体不全マウス (db/db) が最も容易に腎組織-尿タンパク排泄増加などが観察できるモデルではあるが、ヒトではそのようなレプチン不全は稀であり、結果の解釈には注意を要する。今回は高脂肪食にクイックファット (30% fat in energy) を用いたが、更に高い脂肪含有食 (60% fat in energy: Research Diet) を用いてより長い検討を行うべきであるかもしれない。

Streptozotocin 投与 1 型糖尿病モデルマウスでは、マウス系統により表現系に違いがある事、*stox1* 不全の影響もマウス系統により差異がある事が明らかとなった。*stox1* 不全による腎臓レニン発現増加も 129 系統マウスでのみ認められている。実際、マウスはヒトとは異なり、レニン遺伝子には 2 つ (REN1, REN2) が染色体上に tandem repeat して存在していることが知られている。それぞれマウス系統により REN1, 2 臓器特異性がある事が知られ、*Stox1* によるマウスレニン遺伝子に対する感受性の違いがこれらの差をもたらした可

能性がある。また、非糖尿病状態 (STZ 非接種) では腎臓レニンに発現の差を *stox1*wild type、ノックアウトに関わらず認めておらず、糖尿病条件下のみで認められるプログラムがこれらの変化をもたらす可能性がある。現在これらの観点から検討を行っている。  
*Stox1* 相互作用蛋白のスクリーニングに関しては、実験系を再考している。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Shi S, Srivastava SP, Kanasaki M, He J, Kitada M, Nagai T, Nitta K, Takagi S, Kanasaki K, Koya D. Interactions of DPP-4 and integrin $\beta$ 1 influences endothelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* 2015 in press 査読有
- ② Nagai T, Nitta K, Kanasaki M, Koya D, Kanasaki K. The biological significance of angiotensin-converting enzyme inhibition to combat kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol.* 2015 19(1):65-74 査読有
- ③ Nagai T, Kanasaki M, Srivastava SP, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Shi S, Kanasaki K, Koya D. N-acetyl-seryl aspartyl-lysyl-proline inhibits diabetes-associated kidney fibrosis and endothelial-mesenchymal transition. *Biomed Res Int.* 2014;2014:696475 査読有 doi:10.1155/2014/696475
- ④ Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Srivastava SP, Koya D. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes.* 2014 63(6):2120-2131 査読有
- ⑤ Keizo Kanasaki; Munehiro Kitada; Megumi Kanasaki; Daisuke Koya, The biological consequence of obesity on the kidney. *Nephrology Dialysis*

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 金崎啓造, Sen Shi, 金崎めぐみ  
「DPP-4 と integrin  $\beta 1$  の相互作用は  
糖尿病腎の線維化と内皮細胞—間葉系  
分化を惹起する」第 58 回日本糖尿病学  
会年次学術集会 2015 年 5 月 21 日、海  
峡メッセ下関（山口県下関市）
- ② K. Kanasaki, M. Kanasaki, S. Shi, SP.  
Srivastava, D. Koya  
「Linagliptin-mediated DPP-4  
inhibition ameliorates kidney  
fibrosis in streptozotocin-induced  
diabetic mice via restoring  
microRNA29s」第 74 回アメリカ糖尿病  
学会議 2014 年 6 月 14 日 Moscone  
Center (Sanfrancisco, USA)
- ③ 金崎啓造、S. Shi、永井貴子、金崎めぐ  
み、SP. Srivastava、古家大祐  
「Linagliptin を用いた Dipeptidyl  
Peptidase-4 阻害による糖尿病マウス  
腎線維化に対する治療効果とその分子  
機構」第 57 回日本糖尿病学会年次学術  
集会、2014 年 5 月 23 日、大阪国際会議  
場（大阪府大阪市）
- ④ 金崎啓造、金崎めぐみ、Ling Xu、北田  
宗弘、長尾健児、神通寛子、野口泰志、  
古家大祐 第 49 回金沢医科大学学術集  
会 2013 年 7 月 6 日 金沢医科大学  
（石川県河北郡）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金崎 めぐみ (KANASAKI, Megumi)  
金沢医科大学, 医学部, 助教  
研究者番号 : 50599355