

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461214

研究課題名(和文)ポドサイトの転写因子Tcf21の機能解析を通じた慢性腎臓病の機序解明

研究課題名(英文)The role of Tcf21 in Podocytes in Health and Diseases

研究代表者

前澤 善朗 (Maezawa, Yoshiro)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80436443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腎臓の発生をコントロールする蛋白Tcf21が、糖尿病性腎症や腎臓の繊維化に関与すると考えた。一方でTcf21のKOマウスは生まれた直後に死んでしまうので、大人になってからTcf21遺伝子を除去し、生存するポドサイト特異的Tcf21KO、あるいは腎間質でのTcf21KOを作製した。大人マウスでポドサイト特異的Tcf21 KOは尿蛋白を呈さなかったが、これに糖尿病を起すと、腎障害が進むことがわかり、Tcf21は糖尿病性腎症に保護的と思われた。また、間質特異的なTcf21KOは尿細管と集合管の著明な低形成を来たした。すなわち、Tcf21はポドサイトの保護や、腎間質の機能維持に重要と思われる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the role of the transcription factor Tcf21 in Podocytes and in Stromal cells. In order to circumvent the early lethality of Tcf21 KO mice, we established an tetracycline-induced podocyte specific Tcf21 KO mice and stromal specific Tcf21 KO mice. The podocyte specific Tcf21 defect in adult mice did not result in proteinuria. But, by induction of diabetes using Streptozotocin, the mutant mice showed severe proteinuria after 12 weeks. In addition, the stroma specific Tcf21 KO mice showed severe defect in collecting duct and loop of Henle formation.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：ポドサイト 転写因子 Tcf21

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic kidney disease, CKD)は、蛋白尿と緩やかな腎機能低下をきたし、末期腎不全や心血管イベントにいたる予後不良の疾患であり、本邦では1,330万人の患者が存在する(日本腎臓学会、2012)。根本的な治療法は存在せず、慢性透析患者数は30万人を越え、その負担は大きな社会問題となっている。ことに糖尿病腎症は透析導入患者の44%を占め、その病態の解明と治療戦略の確立が急務である。

申請者らは、Tcf21 と呼ばれる転写因子がポドサイトの機能制御に極めて重要であることを見いだしている。Tcf21 はポドサイトや腎間質細胞に発現し、腎発生早期には *nephron progenitor* にも発現し、他の臓器では、肺、心臓、生殖器、膵臓などに認められる。Tcf21 の KO マウスは極端な腎、肺の低形成および心奇形により出生直後に死亡するため、その機能を成熟個体で詳しく検討することは不可能であった(Quaggin et al, Development 1998. Harel, Maezawa et al, PNAS 2012)。申請者らは Toronto Mount Sinai Hospital の Dr. Quaggin Lab において、世界で最初に Tcf21 の floxed mouse を作成し Cre マウスと交配することで、ポドサイト発生分化のいくつかの段階で Tcf21 を欠損するマウスを作成した。その結果、ポドサイトの *progenitor* で Tcf21 を欠損する(Wnt4CreTcf21)と、その分化が著しく障害され、足突起が形成されない事がわかった。さらに、比較的成熟したポドサイトにおいて Tcf21 を欠損(Pod-KO)すると、ポドサイトは正常に発生し2週齢ごろまでは健康であるが、40%の mutant が3-

4週齢において大量の尿蛋白と FSGS を呈する。一方で60%のマウスは明らかな表現型を示さない。更に、Pod-KO マウスの糸球体では、Vegf 発現が大きく低下しているのははじめ、Placental growth factor (PGF), Glypican-1 など糸球体機能に関わる因子の発現が低下し、Tcf21 は糸球体における血管新生ネットワークを制御するのではないかと想定された。しかし、なぜ Mutant 間で尿蛋白に差があるのか、Tcf21 がポドサイト機能を制御する分子機序、発生過程の影響を排除した、出生後の Tcf21 の役割、あるいはポドサイト以外の腎細胞における Tcf21 の機能については未だ不明であった。

2. 研究の目的

そこで申請者らは、ポドサイトにおける Tcf21 の働くメカニズムや出生後、成熟個体における Tcf21 の機能を明らかにすること、更には、腎間質細胞の Tcf21 の機能を明らかにする事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

この目的のために、以下の実験を行なった。

(1)テトラサイクリン誘導性ポドサイト特異的 Tcf21KO マウス (Podocin-rtTA/tetO Cre/Tcf21^{lox/lox}、以下 iPodTcf21) を作成し、3週齢にて飲料水にドキシサイクリンを混合することで Tcf21 遺伝子の欠損を誘導した。3週間のドキシサイクリン投与後、更に Streptzotocin を腹腔内注射することで糖尿病を惹起した。マウスの尿蛋白、血糖、体重をモニターし、また糖尿病惹起後15週にてマウスを屠殺、糸球体の変化について組織学的に検討した。

(2)ポドサイト以外の細胞における Tcf21 の機能を検討するため、腎間質細胞において Tcf21 を欠損させることとした。FoxD1-Cre マウスと Tcf21 floxed を交配し、腎間質細胞特異的 Tcf21KO マウス (StrTcf21 KO) を作製し、尿量、尿中電解質等を検討した。さらに幾つかの週齢にてマウスを屠殺し腎臓を採取、組織学的に検討した。また、腎 RNA を用いて realtime PCR 法や RNA-Seq 法を用いて遺伝子発現の変化を、野生型と StrTcf21 マウスで比較検討した。

4. 研究成果

(1)iPodTcf21KO マウスは糖尿病性腎症に susceptible か？

まず、テトラサイクリン誘導性ポドサイト特異的 Tcf21KO マウスを作製した。Tcf21 がいつ重要なのかを明らかにするために、出生後 0 日よりドキシサイクリンを用いて Tcf21 を欠損させたところ、9 週齢での尿中アルブミンクレアチニン比はコントロール群 $28\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Cre}$ 、iPodTcf21 マウスでは平均 $240\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Cre}$ と有意な増加を示した。組織学的には部分的な糸球体硬化とメサンギウムの拡大、並びに尿細管に蛋白円柱を認め、出生直後のポドサイト機能維持には Tcf21 が必須であると考えられた。一方で、生後 3 週齢より Tcf21 を欠損させたところ、9 週齢、16 週齢時の検討では尿中アルブミンに野生型と比較して差を認めなかった。即ち、生後 3 週のポドサイトでは Tcf21 はさほど重要ではないと考えられ、発生、成長段階によって変化する Tcf21 の重要性が明らかになった (図 1)。

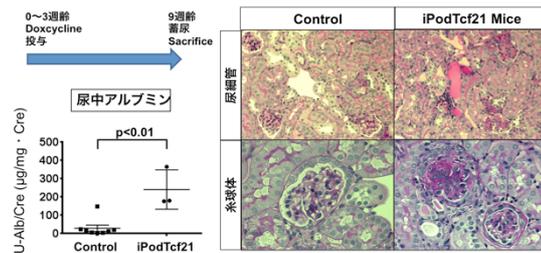


図1 出生直後のポドサイトの機能維持にTcf21が必要である

以上より、3 週齢以降であれば発生過程におけるポドサイト傷害を回避できると考えられたため、3 週齢にて Tcf21 を欠損させた後、6 週齢から STZ を用いて糖尿病を惹起し、糖尿病性腎症における Tcf21 の役割について検討した。すると、9 週齢までは野生型の STZ マウスと比較して差異はみられなかったが、12 週以降に高率に大量の尿蛋白を来たし (12 週齢で、野生型平均 $56\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Cre}$ 、iPodTcf21 $207.8\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Cre}$ 図 2)、組織学的にも強い糸球体の硬化とポドサイト足突起の平低化、基底膜の蛇行と瘤状の変化を呈していた (図 3)。従って、Tcf21 はまず発生過程や出生直後において重要であり、また成熟個体においては、定常状態ではあまり重要ではないが、糖尿病性腎症などの疾患状態においては発現が増加し、臓器保護的に働いているものと考えられた。

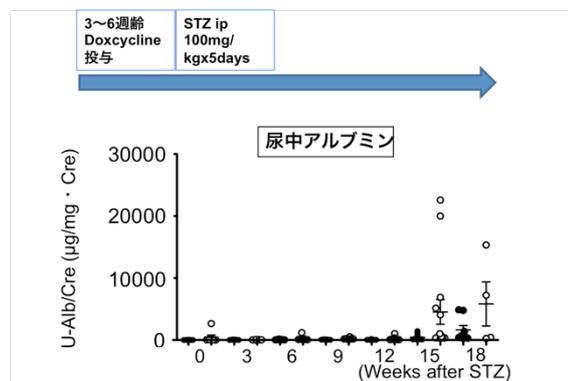


図2 成熟個体のポドサイトにおいてTcf21を欠損しても、マウスは糖尿病性腎症になりやすい

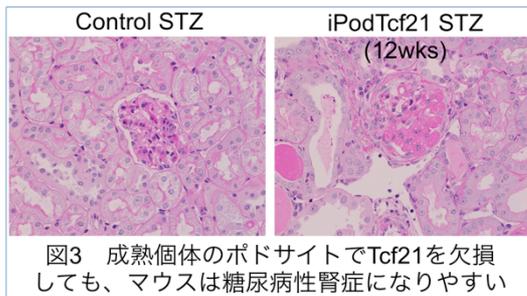


図3 成熟個体のポドサイトでTcf21を欠損しても、マウスは糖尿病性腎症になりやすい

(2)腎間質における Tcf21 の役割

続いて、腎臓の他の構成細胞における Tcf21 の役割について検討することとし、間質特異的な Cre driver mouse line である FoxD1Cre を用いた検討を行った。strTcf21 KO マウスは4週齢にて解析したところ、明らかな髄質の低形成を呈し、一方で蓄尿検査では、1日尿量が正常群 $1.43 \pm 0.21 \text{ ml}$ 、変異群 $8.39 \pm 0.76 \text{ ml}$ と変異群で有意に多かった。免疫染色では uromodulin 陽性の Loop of Henle 並びに Aquaporin2 陽性の集合管のコンパートメントが著明に減少していることが分かった(図4)。Ki67 染色を行なうと間質における細胞の増殖は著明に低下していた。

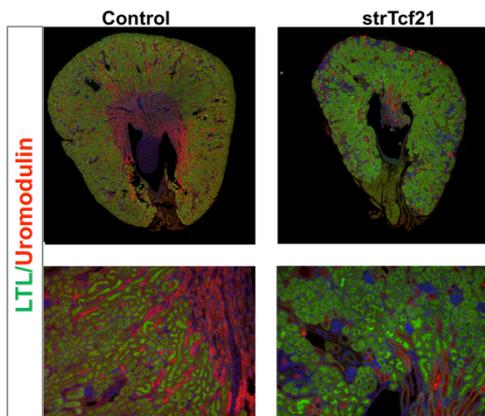


図4 strTcf21KOはヘンレのループの低形成を呈する

更にこの表現形のマカニズムを詳細に検討するため、出生直後の whole kidney を用いて RNA-seq を行い、gene ontology analysis を行った。この結果、「尿管芽の分岐及び腎臓発生に関わる遺伝子」あるいは「腎臓発生」に関与する遺伝子が

strTcf21 マウス腎において変化していることが判明した。

そのため、腎発生において尿管芽の分岐と形態形成に関わる遺伝子について、realtime PCR 法を用いて検討した。すると、腎発生の Master regulator である GDNF、尿管芽に発現し GDNF シグナリングに必要である Wnt11 の発現が、strTcf21 マウスでは低下していることが判明した。

以上より、間質に発現する Tcf21 は隣のコンパートメントである尿細管や集合管の発生や形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、cell autonomous な効果ではないことから、間質細胞から分泌され尿細管や集合管の形成を促す様な液性因子の存在や、あるいは間質細胞による形態形成が尿管芽の分岐に必須である可能性が示唆されるが、詳しいメカニズムについては今後の課題となっている。

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9件) 全て査読あり

1: Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Takemoto M, Tokuyama Y, Saito T, Yokote K. Continuous glucose monitoring reveals hypoglycemia risk in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Investig. 2017 Apr 11. doi: 10.1111/jdi.12676.

2: Yamaga M, Takemoto M, Takada-Watanabe A, Koizumi N, Kitamoto T, Sakamoto K, Ishikawa T, Koshizaka M, Maezawa Y, Yokote K. Recent Trends in WRN Gene Mutation

Patterns in Individuals with Werner Syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2017 Apr 10. doi: 10.1111/jgs.14906.

3: He P, Kawamura H, Takemoto M, Maezawa Y, Ishikawa T, Ishibashi R, Sakamoto K, Shoji M, Hattori A, Yamaga M, Ide S, Ide K, Hayashi A, Tokuyama H, Kobayashi K, Yokote K. Combination of cilostazol and probucol protected podocytes from lipopolysaccharide-induced injury by both anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. *J Nephrol.* 2016 Dec 22. doi: 10.1007/s40620-016-0361-y.

4: Ishibashi R, Takemoto M, Akimoto Y, Ishikawa T, He P, Maezawa Y, Sakamoto K, Tsurutani Y, Ide S, Ide K, Kawamura H, Kobayashi K, Tokuyama H, Tryggvason K, Betsholtz C, Yokote K. A novel podocyte gene, semaphorin 3G, protects glomerular podocyte from lipopolysaccharide-induced inflammation. *Sci Rep.* 2016 May 16;6:25955. doi: 10.1038/srep25955.

5: Dimke H, Maezawa Y, Quaggin SE. Crosstalk in glomerular injury and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015 May;24(3):231-8. doi: 10.1097/MNH.000000000000117. Review.

6: Sakamoto K, Kuno K, Takemoto M, He P, Ishikawa T, Onishi S, Ishibashi R, Okabe E, Shoji M, Hattori A, Yamaga M, Kobayashi K, Kawamura H, Tokuyama H, Maezawa Y, Yokote

K. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects glomerular podocytes from inflammatory injuries. *J Diabetes Res.* 2015;2015:727152. doi: 10.1155/2015/727152. Epub 2015 Mar

7: Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes. *J Diabetes Investig.* 2015 Jan;6(1):3-15. doi: 10.1111/jdi.12255. Epub 2014 Jul 11. Review.

8: Maezawa Y, Onay T, Scott RP, Keir LS, Dimke H, Li C, Eremina V, Maezawa Y, Jeansson M, Shan J, Binnie M, Lewin M, Ghosh A, Miner JH, Vainio SJ, Quaggin SE. Loss of the podocyte-expressed transcription factor Tcf21/Pod1 results in podocyte differentiation defects and FSGS. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Nov;25(11):2459-70. doi: 10.1681/ASN.2013121307. Epub 2014 Jun 5.

9: Wong MD, Maezawa Y, Lerch JP, Henkelman RM. Automated pipeline for anatomical phenotyping of mouse embryos using micro-CT. *Development.* 2014 Jun;141(12):2533-41. doi: 10.1242/dev.107722. Epub 2014 May 21.

[学会発表] (計 26 件)

1. 第 31 回日本糖尿病合併症学会 2016 年 10 月 7 日 仙台国際センター シンポジウム 7、糖尿病合併症と脂質異常 前澤 善朗 脂質異常と糸球体ポドサイトのバイオロジー

2. 前澤 善朗 シンポジウム『糖尿病性腎症の病態研究における新たな展開』ポドサイトの機能異常-転写因子 Tcf21 の役割を中心に- 第 28 回糖尿病性腎症研究会 2016 年 12 月 3 日 都市センターホテル 3 階 コスモスホール I、東京

3. Yoshiro Maezawa, Koutaro Yokote. The role of Tcf21 in Glomerular Development and Diabetic Nephropathy The 8th Annual Scientific Meeting of Cardio-Diabetes Study Group March 1st and 2nd 2014, Tokyo Japan

4. Yoshiro Maezawa, Tuncer Onay , Rizaldy Scott , Lindsay Keir , Henrik Dimke , Chengjin Li , Vera Eremina , Yuko Maezawa , Marie Jeansson , Asish Ghosh , Jeffrey Miner , Seppo Vainio , Susan Quaggin The bHLH transcription factor Tcf21 regulates Podocyte function.

14th International Vascular Biology Meeting 2014 April 14-17 Kyoto, Japan

5. 前澤 善朗、Tuncer Onay、Rizaldy Scott、Lindsay Keir、Henrik Dimke、竹本 稔、横手 幸太郎、Jeffrey H Miner、Seppo Vainio、Susan E. Quaggin 転写因子 Tcf21 のポドサイトにおける欠損は糖尿病性腎症の増悪をもたらす 日本糖尿病学会学術集会 2014 年 5 月 22-24 日 大阪

6. ポドサイトにおける転写因子 Tcf21 の欠損はポドサイトの分化障害と糖尿病性腎症の増悪をもたらす。前澤 善朗、竹本 稔、Susan E. Quaggin、横手 幸太郎

第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日-6 日 横浜

7. Loss of Tcf21 in Podocytes leads to Enhanced Diabetic Nephropathy.

Yoshiro Maezawa, Tuncer Onay, Rizaldy P. Scott, Lindsay Keir, Henrik Dimke, Minoru Takemoto, Koutaro Yokote, and Susan E. Quaggin 9th Metabolic syndrome, type 2 diabetes and Atherosclerosis Congress. Sept 12-14th, 2014. Kyoto, Japan

8. New Insights into genetic diseases. Transcription Factor Regulation in Congenital Anomaly of Kidney and Urinary Tract (CAKUT). Yoshiro Maezawa. International Academy of Pathology, Bangkok, Thailand, Oct 5-10th, 2014

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

前澤 善朗 (MAEZAWA YOSHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80436443

(2)研究分担者

竹本 稔 (TAKEMOTO MINORU)

千葉大学・大学院医学研究院

・特任教授

研究者番号：60447307

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者

()