

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461239

研究課題名(和文)ポドサイトにおけるRac1が糖尿病性腎症の発症・進展に及ぼす影響についての検討

研究課題名(英文) Podocyte-specific deletion of Rac1 leads to aggravation of renal injury in STZ-induced diabetic mice

研究代表者

合田 朋仁 (Tomohito, Gohda)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20365604

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)：Rac1は低分子量G蛋白質であり、主に細胞骨格の構築、細胞移動・成長の制御に関わることが報告されている。しかし、ポドサイト特異的Rac1欠損(Rac1 KO)マウスの腎障害については悪化あるいは改善と一致した見解は得られていない。今回、ストレプトゾトシン(STZ)で1型糖尿病を誘発させたRac1 KOマウスでは、腎症の進展にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

その結果、1型糖尿病マウスにおいてポドサイトにおけるRac1欠損は、ポドサイトの形態変化をもたらし、高血糖刺激によるアポトーシスの誘発が腎症の進展に関わっている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Rac1, which is one of the GTPases of the Rho subfamily, has crucial role for cytoskeletal architecture and the regulation of cell migration and growth. However, renal injury in mice with podocyte-specific deletion of Rac1 has yet to be elucidated fully due to conflicting findings. Here, we identified the possible role for Rac1 in podocytes of streptozotocin (STZ) induced diabetic mice.

Our results provided the evidence that podocyte-specific deletion of Rac1 results in morphological alteration in podocyte, and induction of apoptosis or decreased expression of the slit diaphragm proteins by hyperglycemic stimuli are associated with progression of diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：Rac1 Diabetic nephropathy Podocyte Foot process effacement Apoptosis

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性腎症は、末期腎不全の原因として最も頻度が高く、糖尿病性腎症による透析導入患者は 1998 年に糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎との間で首位の座が入れ替わって以来、増加の一途を辿っている。日本透析医学会の 2012 年末統計調査によると、新規透析導入患者の 44.1% (16,119 名) が糖尿病性腎症であり、その進展を抑制することは重要でかつ早急な課題である。

(2) ポドサイト(足細胞)は、糸球体における血中蛋白質の最終的な濾過障壁(最終バリア)として機能している終末分化細胞である。解剖学的には、ポドサイトはアクチンを基本とした複雑な細胞骨格を有している。その障害の早期には足突起間に存在するスリット膜の分子構造に変化が認められ、足突起のアクチン骨格の分布が変化する。次いで足突起(噛み合わせ構造)が消失する結果として蛋白尿を生じると考えられている。ポドサイトは終末分化細胞であるが故に再生しないことから、その持続した障害は不可逆的な構造変化を惹起する。その結果、ポドサイトの脱落や糸球体硬化をきたし、最終的には慢性腎不全へと進展する。一般に糖尿病性腎症では、比較的早期からポドサイトの障害が観察されるため、その障害を抑制することは腎症の治療において重要であると考えられている。

(3) ポドサイトの機能維持には、細胞骨格を保つことが重要である。低分子量 G タンパク質の一種である Rho ファミリーに属する Rac1、CDC42、RhoA は、主に細胞骨格の制御に関わることが報告されている。ポドサイトにおける過剰な RhoA 活性化は巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)を引き起こすが、Rac1 は RhoA の活性化をダウンレギュレーションさせることより、そのバランス調節に深く関わっている。ポドサイト特異的に CDC42 を KO したコンディショナルマウスでは、生後すぐに死亡する。一方、ポドサイト特異的に Rac1 を KO したマウスでは、その構造や機能に影響を及ぼすことはないと報告されている。しかし、ポドサイト特異的に Rac1 を KO したマウスに片腎摘することで高血圧を惹起させたマウスでは、腎障害の進展は加速されたとの報告がある。実際、我々のグループも Rac1 を KO したマウスにアドリアマイシンを用いたネフローゼモデルでも腎糸球体における硬化病変を悪化させることを確認している。また、その一方で、Rac1 を活性化させた状態のマウスでは大量のアルブミン尿を認め、糸球体硬化が認められたが、Rac1 特異的阻害薬を用いるとアルブミン尿が改善し、糸球体硬化の割合も減少したとの相反する報告もある。これらのことより、ポドサイトにおける Rac1 が腎疾患に及ぼす影響については疾患によっても異なり、十分に

解明されていない。糖尿病性腎症はネフローゼ症候群をきたす頻度の高い疾患であり、ヒトやマウス糖尿病でもポドサイト障害が観察される。

2. 研究の目的

ポドサイト障害が腎疾患における蛋白尿漏出に関与していると考えられているが、そのメカニズムは十分に解明されていない。その機能維持には、細胞骨格を保つことが重要であり、Rho ファミリーに属する Rac1、CDC42、RhoA などが主にその制御に関与している。ポドサイト特異的に Rac1 をノックアウト(KO)したマウスでは、その構造や機能に影響を及ぼすことはないと報告されている。一方で片腎摘高血圧モデルでは、その KO は病変を悪化させるとの報告もあり、ポドサイトにおける Rac1 の役割は十分に解明されていない。今回、糖尿病で観察されるポドサイト障害において Rac1 が及ぼす影響を解明するために、ポドサイト特異的に Rac1 を KO したマウスに 1 型糖尿病を誘導させて蛋白尿の推移や腎組織的变化を検討する。

3. 研究の方法

(1) ポドサイト特異的 Rac1 KO マウスの作成
Rac1 特異的な flox マウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) とポドサイト特異的 Cre 発現マウスを交配して作成したコンディショナル KO マウスを実験に用いた。ポドサイト特異的 Cre 発現マウスは Holzman 教授より供与されたものを用いた。Rac1 特異的な flox マウスとポドサイト特異的 Cre 発現マウスは、それぞれ Balb/c マウスと 4 世代戻し交配し、継代した。マウスはプラスチックケースで飼育し、食事(rodent pellet diet NMF; 348 kcal/100g, containing 5.5% crude fat) と水は自由に摂取可能とした。部屋は 12 時間毎に明暗が切り替わるものとし、室温は 24 ± 1 とした。

(2) マウスの選別

マウスの尾から DNA を抽出して Cre と Flox マウスを特異的に認識するプライマー(Cre マウス: 5' -CGG AGA ACC TGC GTG CAA TCC-3', 5' -TGC CCC TTC ACT ATC CAG GTT ACG GA-3', flox/flox マウス: 5' -TCC AAT CTG TGC TGC CCA TC-3', 5' -GAT GCT TCT AGG GGT GAG CC-3') を用い PCR 反応を行うことにより、ジェノタイピングを行った。PCR で増幅した DNA 断片は、2% アガロース上で電気泳動を行った。Cre(+) マウスでは 1kbp に 1 本バンドを認めるが、Cre(-) マウスでは増幅バンドは認められない。一方、Rac1 flox(+) / flox(+) マウスは 242bp に 1 本バンドを認め、flox(+) / flox(-) マウスは 242bp と 115bp に 1 本ずつバンドを認め、flox(-) / flox(-) マウスは 115bp に 1 本バンドが認められる。

(3)1型糖尿病の誘発

上記の方法によって得られた8週齢のRac1 KO マウスに STZ 200mg/kg を腹腔内に単回投与し、1週間後の随時血糖で 300mg/dl 以上となったマウスのみを糖尿病と診断し実験に用いた。また、STZ の代わりに蒸留水を投与したものを、その対象として実験に用いた。

(4)表現形質の測定

マウス各群において血糖値(arkray 自己検査用グルコカード使用)、HbA1c(SIEMENS DCA Vantage Analyzer 使用)、尿中アルブミン・クレアチニン比(SIEMENS DCA Vantage Analyzer 使用)、血圧(ソフトロン BP-98A 使用)を8週齢から4週ごとに測定した。

(5)腎組織所見

16週齢時に解剖を行い、腎臓を採取し保存した。腎臓は4% paraformaldehyde で灌流後、パラフィン包埋した。切片は3 μ mの厚さに薄切し、各種免疫染色を行い評価した(Olympus BX41, オリンパス、東京、日本)。また、電子顕微鏡(HIT7700, Hitachi High-Technologies Corporation、東京、日本)にてポドサイトの足突起の癒合の割合について比較検討した。具体的には、各群から4匹のマウスの5つの糸球体から5つの毛細血管を任意に選択した。その後、ImageJ 1.48t software (National Institutes of Health, rsb.info.nih.gov/ij) を用いて(Koop et al., 2003)、各糸球体係締壁における足突起消失の割合を測定し、グラフ化した。

(6)免疫蛍光染色

クリオスタットを用い各群の組織を3 μ mの厚さに薄切した。ブロッキングソリューション(phosphate-buffered saline [PBS, pH 7.2] containing 2% bovine serum albumin, 2% fetal calf serum, and 0.2% fish gelatin)によるブロッキングを行った切片は、各一次抗体溶液に常温で1時間浸した。2重染色が必要な場合は切片を一旦洗浄し、4で一晚浸した。その後、切片を一旦洗浄し、二次抗体溶液に常温で1時間浸した。さらに4',6-diamidino-2-phenylindole (blue) に常温で10分浸した。切片は共焦点顕微鏡(Olympus FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。実験に用いた一次抗体を以下に示す。

polyclonal mouse anti-Rac1 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA)
polyclonal guinea pig anti-Nephrin (Progen, Heidelberg, Germany)
monoclonal mouse anti-caspase-3(ASP175, Cell Signaling, Beverly, MA)
guinea pig anti-dendrin (our laboratory)

(7)ウエスタンブロット法

糸球体を graded sieving 法によって単離

し、単離糸球体を用いてウエスタンブロット法によるタンパクの発現を確認した。実験に用いた一次抗体を以下に示す。
rabbit anti-podocin (our laboratory)

(8)TUNEL 染色

各群のパラフィン包埋した切片を3 μ mの厚さに薄切し、ApopTag Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit (Cat# 17-141; Upstate Technology, Lake Placid, NY, USA) を用いて染色を行った。

4. 研究成果

(1) Rac1 KO マウスにおいてはこれまでの野生型マウスと比較し、表現系の変化や形態学的変化は認められないと報告されているが、今回、足突起消失と蛋白尿の増加が見られた。今までの報告では、Rac1 flox/flox マウスとポドシン特異的 Cre 発現マウスは今回と同様なものが用いられているが、Rac1 KO マウスは Mix background であった。今回の実験では、Rac1 KO マウスを Balb/ca マウスに戻し交配し、Balb/ca background としたため、フェノタイプに違いがみられた可能性もある。また電子顕微鏡所見から WT 群と比較し、KO 群では足突起消失が有意に多かったことから、Rac1 の欠失によるポドサイトの構造的変化により、糸球体からの蛋白の漏出が起こることが示唆された。低分子量 G タンパク質は主にアクチン骨格の制御に関わり、Rac1 は葉状仮足を誘導することが言われている。ポドサイト特異的に Rac1 を KO することにより、ポドサイトにおける葉状仮足の誘導の過程に障害が起こり、ポドサイトの足突起が消失した可能性も考えられるため、今後は Rac1 を介した葉状仮足の誘導にかかわる下流分子の発現等をみて行く必要があると考えている。

(2) 今回マウスにストレプトゾトシン(STZ)を投与することにより1型糖尿病を誘発させ、投与後8週の段階で比較検討を行ったが、DM/WT 群では WT 群と比較し、足突起消失やアポトーシスの誘発に有意味な差はみられないものの、ポドシンの発現低下が見られた。糖尿病腎症において、スリット膜蛋白であるポドシンの発現が低下すると報告されている。今回はストレプトゾトシン(STZ)投与後8週という糖尿病の初期段階での検討であり、糖尿病腎症の初期においては糸球体の形態学的変化を起こすことなく、スリット膜蛋白の発現低下を一因とする尿蛋白漏出が起きたのではないかと考えられた。また、DM/KO 群と DM/WT 群の蛋白尿の差は WT 群と KO 群と比較し顕著になり、DM/KO 群では DM/WT 群と比較し、ポドシンの発現の低下を認めた。以前の研究で、Rac1 の活性化によりスリット膜タンパクの発現が低下するといった報告があるが、今回の結果と合わせて考えると、Rac1 を介するシグナル伝達回路がポドサイ

トの細胞骨格の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

(3) 糖尿病腎症においてはポドサイトの数は減少すると言われており、その一因としてポドサイトのアポトーシスがあげられている。今回、TUNEL 染色、Cleaved Caspase3 染色によってアポトーシスの有無を確認したところ、どちらも陽性細胞が有意に増加していたことから、アポトーシスが誘発されることが示唆された。また、8週間という短期間の高血糖刺激だけでは WT マウスにおいてはポドサイトの脱落はもたらされなかったが、DM/KO マウスでは他の3群のマウスと比較し、WT1 陽性細胞数の減少を認めたため、ポドサイトにおける Rac1 の欠失されたマウスにおいては短期間の高血糖刺激でもポドサイトの脱落がもたらされることが示唆された。

以上より、Rac1 欠失でもたらされたポドサイトの構造的変化に高血糖による刺激が加わることにより、スリット膜タンパクの発現低下やアポトーシスが惹起され、ポドサイトの脱落をきたし、腎症進展を惹起させる可能性が示唆された。

(4) 糖尿病性腎症の多くは、進行とともに蛋白尿が増加し、最終的には腎機能が低下する。蛋白尿の程度は将来の末期腎不全発症と強く関連している。このため、糖尿病性腎症の進展を予防するために、いかに蛋白尿を減らすかは、臨床上極めて重要である。インスリンや RAS(アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬)などの薬剤は、血糖や血圧をコントロールすることで二次的に蛋白尿を減少させることに成功しているが、直接的に蛋白尿を低下させる薬剤は今尚欠如している。糖尿病性腎症のみならず、蛋白尿を呈する全ての腎疾患において、糸球体ではポドサイトが蛋白の尿への漏出を防止する最終バリアとなっている。今回、ポドサイトの機能維持には、複雑な細胞骨格を保つことが不可欠であることに着目し研究を行う点は独創的であった。本研究の結果、糖尿病性腎症においてポドサイトにおける Rac1 の欠損がポドサイトの細胞骨格を維持するためのアクチン関連蛋白やスリット膜蛋白の発現に影響を与えるために、蛋白尿漏出や腎障害悪化をさせることが示唆されたため、今尚、特異的な治療薬のない糖尿病性腎症の治療分野に道が開ける可能性が示された。慢性腎臓病患者の多くを占める糖尿病性腎症患者に与える波及効果は非常に大きく、年間 1.3 兆円といわれている透析医療費にも歯止めがかかり、医療経済的にも多大なる貢献が期待できる可能性がある。

<引用文献>

S. Akilesh, et al., Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form

is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest*. 121 (2011) 4127-4137.

G. Wolf, et al., From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 54 (2005) 1626-1634.

P. Catanuto, et al., In vivo 17beta-estradiol treatment contributes to podocyte actin stabilization in female db/db mice. *Endocrinology*. 153 (2012) 5888-5895.

S. Shibata, et al., Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: Implication in proteinuric kidney disease. *Nature Medicine*. 14 (2008) 1370-1376.

Yi I. Wu, et al., A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*. 461 (2009) 104-108.

R. Scott, et al., Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 23 (2012) 1149-1154.

M. Sakoda, et al., Podocytes as a target of prorenin in diabetes. *Current Diabetes Reviews*. 7 (2011) 17-21.

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)

石坂匡則、合田朋仁、高木美幸、表敬介、苑田祐二、Juan Alejandro Oliva Trejo、浅尾りん、日高輝夫、浅沼克彦、堀越 哲、富野康日己、Podocyte-specific deletion of Rac1 leads to aggravation of renal injury in STZ-induced diabetic mice、*Biochemical and Biophysical Research Communications*、査読：有、467 巻、2015、549-555
DOI : 10.1016/j.bbrc.2015.09.158

〔学会発表〕(計3件)

石坂匡則、合田朋仁、高木美幸、表敬介、苑田祐二、Juan Alejandro Oliva Trejo、浅尾りん、日高輝夫、浅沼克彦、富野康日己、糖尿病腎症の発症・進展におけるポドサイト特異的 Rac1 の影響、日本糖尿病性腎症研究会、2014年12月7日、ベルサール神田(東京都・千代田区)

発表者名:石坂匡則、合田朋仁、高木美幸、
表敬介、苑田祐二、Juan Alejandro Oliva
Trejo、浅尾りん、日高輝夫、浅沼克彦、富
野康日己、糖尿病腎症の発症・進展における
ポドサイト特異的 Rac1 の影響、東京糖尿病
性腎症セミナー、2015年3月25日、興和株
式会社東京支店(東京都・中央区)

発表者名:石坂匡則、合田朋仁、高木美幸、
表敬介、苑田祐二、Juan Alejandro Oliva
Trejo、浅尾りん、日高輝夫、浅沼克彦、富
野康日己、糖尿病腎症の発症・進展における
ポドサイト特異的 Rac1 の影響、日本糖尿病
学会、2015年5月21日、シーモールパレス(山
口県・下関市)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

合田 朋仁 (GOHDA, Tomohito)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号:20365604

(2)研究協力者

石坂 匡則 (ISHIZAKA, Masanori)