

課題番号 : 23 指 104

研究課題名 : 糸球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系の腎機能に対する役割の
検討

主任研究者名 : 鎌木康志

分担研究者名 : 松本道宏、浜崎辰夫

キーワード : 糖尿病腎症、糸球体上皮細胞、インスリンシグナル伝達系

研究成果 :

糖尿病腎症は我が国における腎不全の原疾患の第一位であり、患者数は年々増加しているものの、糖尿病腎症の発症・進展を防止する十分な治療法は確立されていない。本研究の目的は、糸球体上皮細胞 (podocyte) におけるインスリン (Ins) シグナル伝達系の障害が、蛋白尿を伴う糖尿病腎症の発症・進展に関与するかどうかを遺伝子改変マウスにより検討することにある。そこで本研究は、Ins シグナル伝達系において重要な役割を果たしている分子の podocyte 特異的なノックアウト (KO) マウスを Cre-loxP システムを用いて作製し、腎症の発症・進展に関する表現型を解析した。Podocyte 特異的 Cre recombinase 発現マウスと TSC2、または PDK1 遺伝子 flox マウスとの交配により、腎糸球体上皮細胞特異的 TSC2 (または PDK1) 欠損マウスならびに対照としての TSC2-flox (または PDK1-flox) マウスを作製した。磁気ビーズを用いた灌流法により Pod 特異的 KO マウス、対照 PodCre Tg マウス、対照 flox/flox マウスより腎糸球体単離を行い、単離腎糸球体における TSC2 mRNA (あるいは Cre mRNA) 発現を real-time PCR 法により検討した。Pod 特異的 TSC2 KO マウス単離糸球体における TSC2 mRNA 発現レベルは対照とした PodCre Tg マウス、TSC2 (flox/flox) マウスに比べて有意に減少しており、また、Pod 特異的 PDK1 KO マウス単離糸球体における Cre mRNA 発現レベルは対照とした PDK1 (flox/flox) マウスに比べて有意に上昇していた。このことから、作製した Pod 特異的 KO マウスでは podocyte 特異的に当該遺伝子が発現抑制されていると判断した。PodTSC2 KO マウス、PodPDK1 KO マウスともにメンデルの法則に従って生まれ、また外観上顕著な異常は観察されていない。一方、尿中アルブミン量の解析では 3 週齢以降の KO マウスのアルブミン・クレアチニン比 (U-ACR) が flox/flox 対照マウスや PodCre Tg 対照マウスに比べて有意な高値を示した。SDS-PAGE 解析では約 60kDa のアルブミンが PodTSC2 KO や PodPDK1 KO マウスにおいて多量に検出された。PodTSC2 KO マウス、PodPDK1 KO マウスの腎組織を光顕にて病理学的に解析したところ、尿細管における蛋白円柱の存在、ならびにメサンギウム基質の拡大を認めた。これらの解析結果から、podocyte における TSC2, PDK1 は糸球体機能維持に重要な役割を果たしていることが示された。

次に podocyte における Ins シグナル伝達障害に対する後期糖化反応生成物 (AGE) の作用と糖尿病腎症発症との関連を解析する目的で podocyte 特異的 AGE 受容体 (RAGE) トランスジェニックマウスを作製した。Podocin プロモーターを有するマウス RAGE 遺伝子発現ベクターを構

築し、約 400 個の C57BL/6J マウス受精卵に遺伝子コンストラクトを注入し出産させた結果、2 系統 (B252 系統, B313 系統) が自然交配可能なマウスとして確立された。磁気ビーズを用いた灌流法により PodRAGE Tg (B252 系統) より腎糸球体を単離し、腎糸球体における RAGE mRNA 発現量を real-time PCR により検討した。PodRAGE Tg 腎糸球体における RAGE mRNA 発現量は対照 C57BL/6J マウスに比べ有意に上昇していた。なお、PodRAGE Tg マウス (B252 系統)、PodRAGE Tg マウス (B313 系統) からの単離糸球体における RAGE mRNA レベルは両系統間で発現差異を認めなかった。PodRAGE Tg マウスはメンデルの法則に従って生まれ、外観上顕著な異常は観察されていない。6, 12 週齢における PodRAGE Tg マウス, 対照 C57BL/6J マウスの体重、随時血糖、絶食時血清インスリンレベル、尿中アルブミン・クレアチニン比に有意差は認められなかった。そこで 8 週齢 PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウスそれぞれにストレプトゾトシンを投与し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病における腎機能の変化を解析した。ストレプトゾトシン投与 4, 8 週後の PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウスにおける血糖値、体重は両群間で差異を認めなかった。一方、PodRAGE Tg マウスの尿中アルブミン・クレアチニン比はストレプトゾトシン投与 4 週後、8 週後のいずれも対照 C57BL/6J マウスに比べ有意な高値を示した。ストレプトゾトシン投与 8 週後の PodRAGE Tg マウス腎臓の病理学的所見では、対照 C57BL/6J マウスに比べて腎糸球体領域における軽度のメサンギウム基質拡大が認められた。これらの解析結果から、podocyte における RAGE 発現上昇は糸球体上皮細胞のバリア機能障害を引き起こし、糖尿病腎症の病態を増悪化に作用することが示された。

最後に、podocyte の補充療法が糖尿病腎症治療に有効かを検証する目的で、Osr1、WT1 をはじめとする podocyte 分化に関与する遺伝子を高発現した脂肪前駆細胞の作製と、さらにこの細胞を糸球体上皮細胞へと培養系で誘導した後に糸球体腎炎モデルマウスに移植することで、podocyte 前駆細胞補充の糖尿病腎症治療としての可能性を検討した。脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC) に Osr1、あるいは WT1 のいずれかを単独導入、および同時導入したのち、DMEM/FBS 培地で一週間培養して細胞の変化を観察したところ、Osr1、ならびに Osr1/WT1 を導入した ASC では一部細胞の形態がより上皮細胞様な形態に変化した。また、遺伝子導入された細胞から腎構成細胞への分化を示す Wnt4、Six2、Foxc2 と Podxl 等の遺伝子発現が検出された。Osr1/WT1 遺伝子導入後の Nephin、Podxl、Foxc2、Pax2、Lmx1、Wnt4、Six2、CD24、CD133、CDH11 発現の経時的解析の結果、Osr1/WT1 遺伝子導入 3 日後の ASC が podocyte 前駆細胞の特性にもっとも類似し細胞移植に適していると判断した。そこで、Osr1/WT1 遺伝子を導入した ASC および遺伝子導入を行っていない ASC を adriamycin 投与による糸球体腎炎モデルマウスの尾静脈に注入し、移植された細胞の腎臓への生着率および尿中タンパク質量の変化を検討した。Osr1/WT1-ASC および ASC を移植したマウス群では、非細胞投与マウス群に比べて尿中タンパク濃度の低下が認められた。ところが、細胞を移植したマウス腎臓の組織学的解析では GFP 発現 ASC の局在は腎組織内にはほとんど認められなかった。さらに ASC の腎組織内への生着率を検討するために、Osr1/WT1-ASC および ASC を adriamycin 腎症モデルマ

ウスの尾静脈および腎皮膜下に注入し、一週間後マウスの腎臓を摘出して GFP 発現細胞の局在を調べたものの、Osr1/WT1-ASC および ASC 投与マウスの腎組織内では GFP の発現はごく僅かしか検出されず、移植された細胞の腎組織内への定着はほとんど認められなかった。以上の検討から、ASC への Osr1/WT1 遺伝子導入により podocyte 分化に関与する遺伝子群の発現と上皮細胞様の形態変化が引き起こされ、podocyte 前駆細胞への誘導が可能となった。しかしながら、Osr1/WT1-ASC を用いた糸球体腎炎モデルマウスへの細胞移植実験の結果からは podocyte 前駆細胞としての分化は不完全であると考えざるを得ない。遺伝子導入する際にメチル化を抑制し epigenetic な変化を促す方法や、Osr1/WT1 のような podocyte 前駆細胞分化の初期に関与する遺伝子のみならず podocyte 前駆細胞の分化に関与する遺伝子群を追加導入することにより podocyte 前駆細胞への分化誘導効率を高める工夫が必要とされる。また、糸球体腎炎モデルマウス腎組織における移植細胞のホーミング効果が低いことについては、adriamycin が投与されたマウスにおいては腎臓以外の部位で炎症が起き、移植された ASC が腎臓以外の部位に誘導されたため、腎臓への定着が相対的に低かった可能性が考えられる。細胞誘導療法をより確実に評価するためには、腎障害モデルの作製法も今後改善の余地がある。

Subject No. : 23 指 104

Title : The role of insulin signaling system in podocytes in the development of diabetic nephropathy

Researchers : Yasushi Kaburagi, Michihiro Matsumoto, Tatsuo Hamazaki

Key word : Diabetic nephropathy, podocytes, insulin signaling system

Abstract :

In the last decade diabetic nephropathy has become an increasingly important cause of end-stage renal disease leading to dialysis in Japan. The earliest clinically detectable sign of overt diabetic nephropathy is the excretion of high levels of protein in the urine, followed by progressive loss of glomerular filtration rate. Tight glycemic control, control of blood pressure by the blockade of renin-angiotensin system, and control of lipid has been shown to slow progression of diabetic nephropathy, but there are no specific therapies for blocking or reversing diabetic nephropathy. Recent papers suggest that impaired insulin signaling in the glomerular podocyte may be another critical mechanism leading to diabetic nephropathy. In this study, we focus on the insulin signaling molecules in podocytes, and examine the effects of insulin signaling molecules in podocytes on the development of diabetic nephropathy.

First, we investigated on the role of TSC2, one of the important molecules involved in the insulin signaling pathway, in the podocytes. We tried to generate podocyte-specific TSC2 knockout mice (PodTSC2 KO) by crossing floxed TSC2 mice with podocyte-specific Cre recombinase mice (PodCre Tg) driven by the podocin promoter. PodTSC2 KO mice were born with normal Mendelian frequency and initially appeared entirely normal. We went on to prove whether the TSC2 gene was specifically knocked down in the podocytes of the PodTSC2 KO mice. We isolated the podocytes explanted from the glomeruli of PodTSC2 KO mice, and analyzed the expression level of TSC2 mRNA by real-time RT-PCR analysis. The level of TSC2 mRNA in the podocytes of PodTSC2 KO mice were at least 90% decreased compared with those in PodCre Tg and floxed TSC2 mice. Tissue distribution of TSC2 mRNA in PodTSC2 KO mice was examined, and the levels of TSC2 mRNA in the examined tissues (heart, liver, kidney, skeletal muscle, epididymal fat) were comparable with those in PodCre Tg and floxed TSC2 mice. At 3, 5, 7 weeks of age, PodTSC2 KO showed albuminuria although the levels of blood glucose and body weight were comparable with those in PodCre Tg and floxed TSC2 mice. At 7 weeks of age, BUN level in PodTSC2 KO mice were significantly increased compared with that of PodCre Tg and floxed TSC2 mice. Next, we investigated the role of PDK1, another important molecule involved in the insulin signaling pathway, in podocytes. We tried to generate podocyte-specific PDK1 knockout mice

Researchers には、分担研究者を記載する。

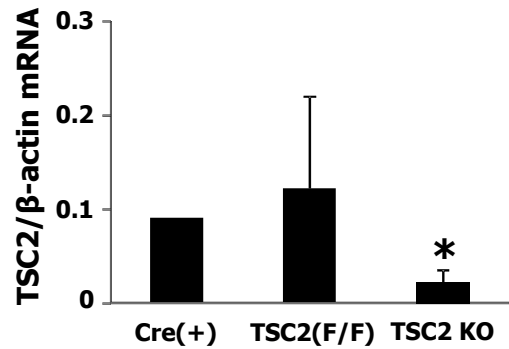
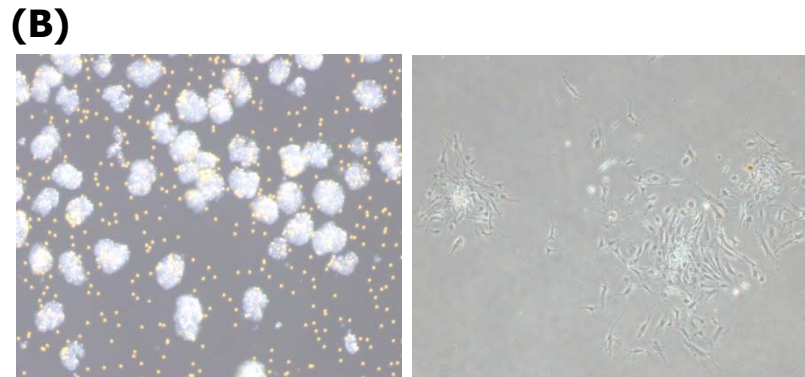
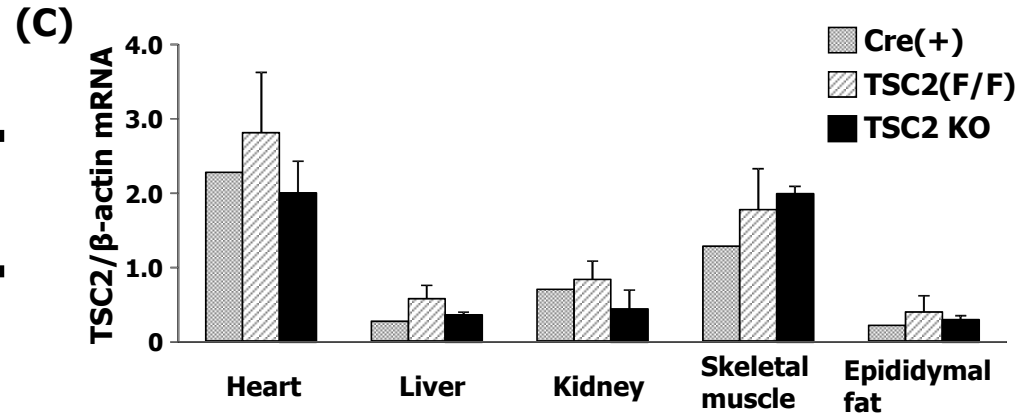
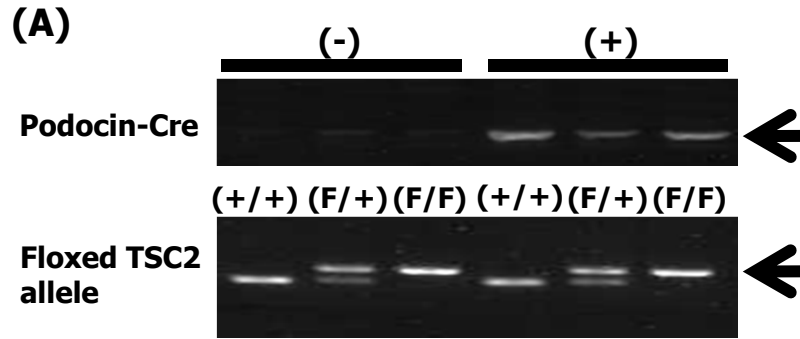
(PodPDK1 KO) by crossing floxed PDK1 mice with PodCre Tg. PodPDK1 KO mice were born with normal Mendelian frequency and initially appeared entirely normal. The expression of Cre mRNA in the podocytes isolated from the PodPDK1 KO mice were significantly increased with that in floxed PDK1 mice, which showed the PDK1 gene was specifically knocked down in the podocytes of the PodPDK1 KO mice. At 3 weeks of age, PodPDK1 KO mice showed albuminuria although the levels of blood glucose and body weight were comparable with those in PodCre Tg and floxed PDK1 mice. BUN level in PodTSC2 KO mice were significantly increased compared with that of PodCre Tg and floxed TSC2 mice. Significant histological changes were present in PodPDK1 KO mice. These histological changes included many renal casts in tubules, and increased levels of glomerulosclerosis. The current findings revealed TSC2 and PDK1 play important roles in the maintenance of podocyte function, and that the dysregulation of the molecules in the podocytes may be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

Advanced glycation end products (AGEs) are a complex and heterogeneous group of compounds that are formed when reducing sugars or reactive carbonyls react non-enzymatically with free amino groups through the Maillard reaction. AGEs are spontaneously produced in human tissues and in circulation, and the formation and accumulation of AGEs have been known to progress in a normal aging process and at an accelerated rate under diabetes. Recent studies have revealed that AGEs and receptor for AGEs (RAGE) interaction elicits oxidative stress generation in various types of cells and subsequently evokes vascular inflammation, macrophage and platelet activation, and thrombosis, thereby playing an important role in the development and progression of vascular complications in diabetes. Moreover, it has recently been revealed that AGEs could also play a role in the pathogenesis of insulin resistance by evoking inflammatory reactions. To determine whether AGEs- RAGE system play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy, we generated the transgenic (Tg) mice overexpressing RAGE gene specifically in podocytes, and examined the effects of RAGE overexpression in podocytes on the development of diabetic nephropathy. We constructed RAGE-containing plasmids under the control of podocin promoter, and successfully established two Tg founders (B252 and B313 lines). RAGE Tg mice were born with normal Mendelian frequency and initially appeared entirely normal. We isolated the glomeruli from the RAGE Tg mice, and confirmed RAGE mRNA was significantly induced in the glomeruli of RAGE Tg mice compared with that in non-Tg control mice. At 6 weeks of age, RAGE Tg mice were comparable in size to their littermates, were normoglycemic, and had comparable serum insulin levels. RAGE Tg mice were not albuminuric and the kidney size of RAGE Tg mice was indistinguishable from their

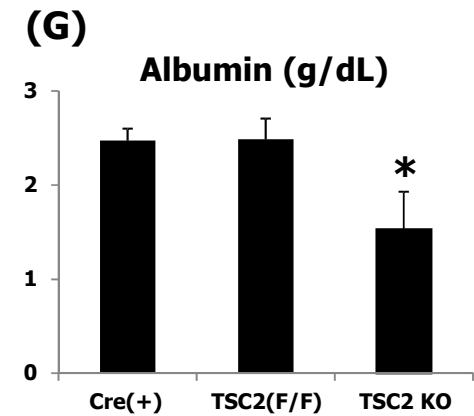
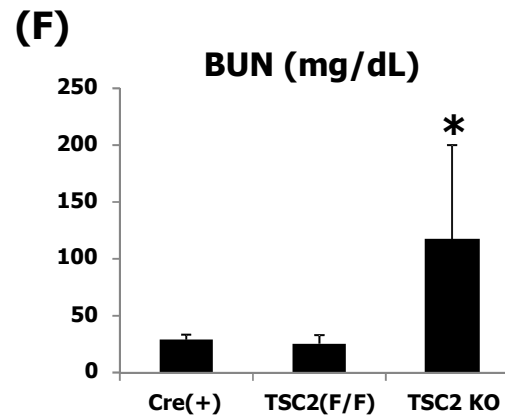
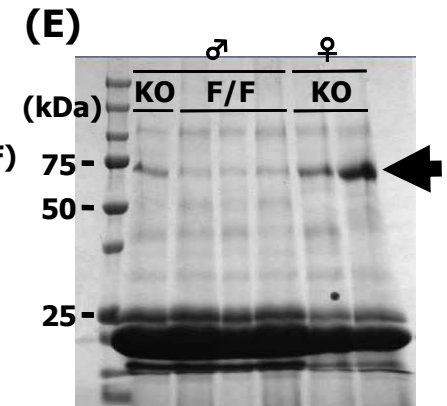
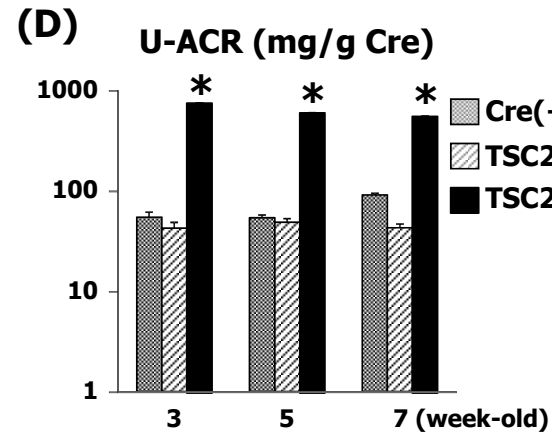
controls. RAGE Tg mice and control littermates were rendered diabetic at 8 weeks of age via intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin for 5 consecutive days. Fasting blood glucose concentrations in RAGE Tg and control mice were within diabetic ranges following injection of streptozotocin, and there were no significant differences between two groups. Four weeks after the injection of streptozotocin, RAGE Tg mice started to develop albuminuria. At 8 weeks after the injection of streptozotocin, significant levels of albuminuria and histological changes were present in RAGE Tg mice. The current findings revealed RAGE play important roles in the maintenance of podocyte function, and that the induction of RAGE in podocytes may be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy although further deep mechanistic investigation is needed.

Injury to the podocyte results in proteinuria and often leads to progressive kidney disease. As podocytes have limited ability to repair and/or regenerate, the extent of podocyte injury is a major prognostic determinant in diabetic nephropathy. In this study, we hypothesized that cells derived from the stromal fraction of adipose tissue (ASC) could therapeutically rescue early stage glomerulonephropathy features. Introduction of *Ors1* and *WT1* gene into ACS lead to the morphological changes in ASC, which resembles the epithelial-like cells. Gene expression analysis revealed that co-overexpression of *Ors1* and *WT1* in ACS (*Ors1*/*WT1* ACS) increased the podocyte-related genes such as *pax2*, *lmx1*, *wnt4*, *nephrin*, and *foxc2*. We administered *Ors1*/*WT1* ACS or ACS intravenously into the proteinuric mice with adriamycin-induced nephropathy and found the level of urinary protein were reduced in the *Ors1*/*WT1* ACS or ACS treated mice, otherwise the saline treated mice (served as control) still showed significant proteinuria. Although further study to elucidate the underlying mechanism is required, this study implicated ASC had a therapeutic potential even when administered in a more clinically relevant setting into a proteinuric glomerulonephropathy mice.

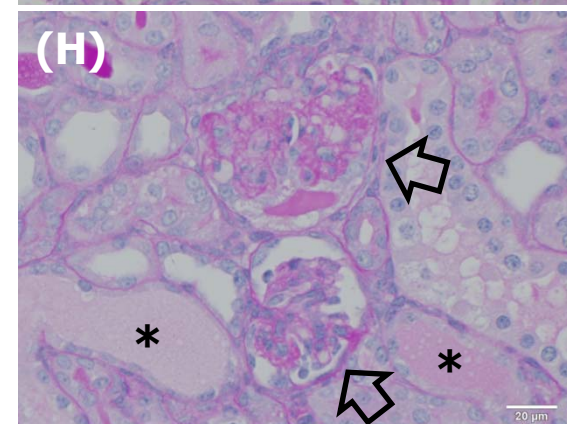
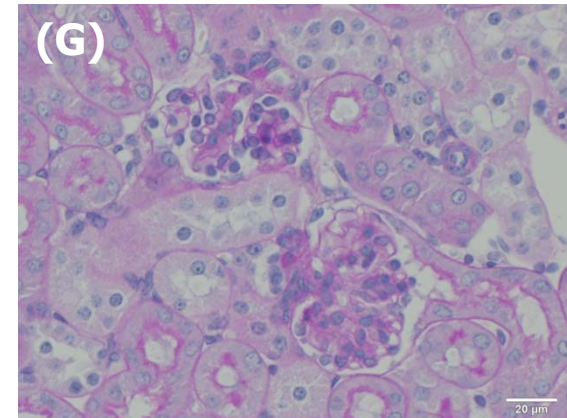
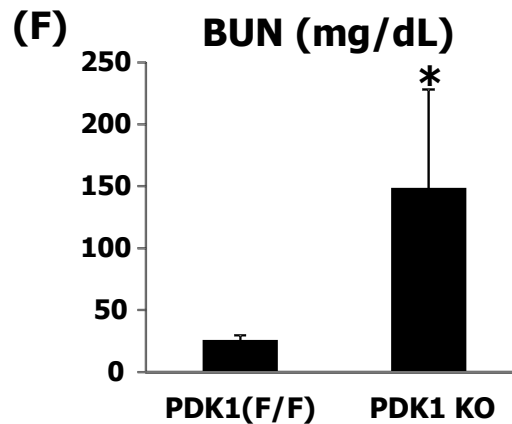
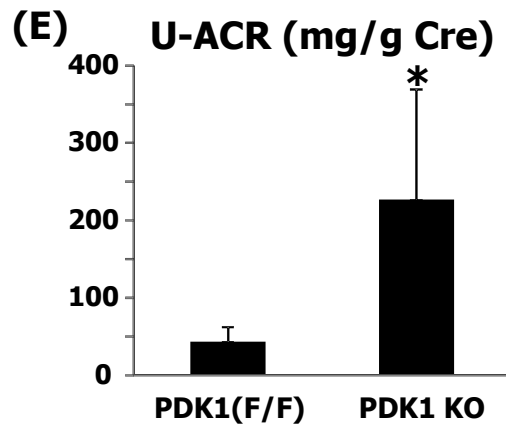
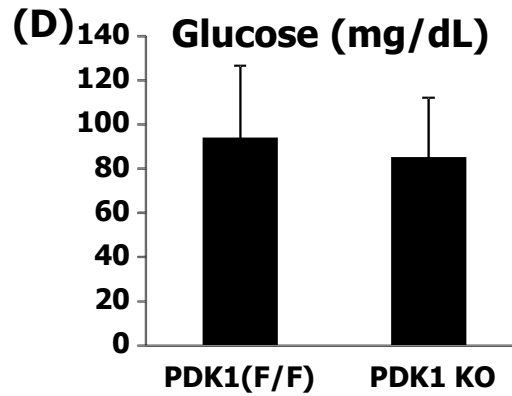
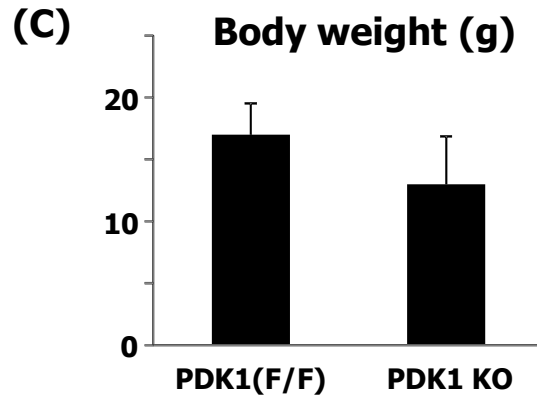
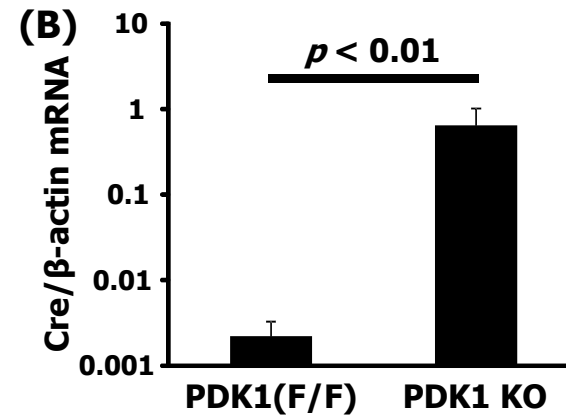
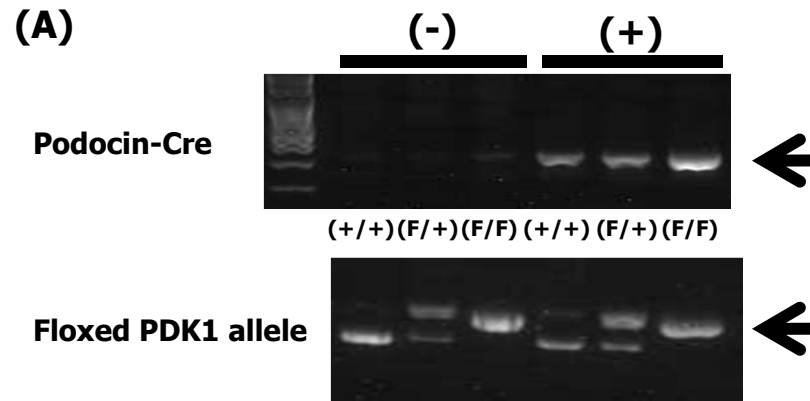
Generation of the mice with specific deletion of TSC2 from their podocytes



*: $p < 0.05$ vs corresponding controls



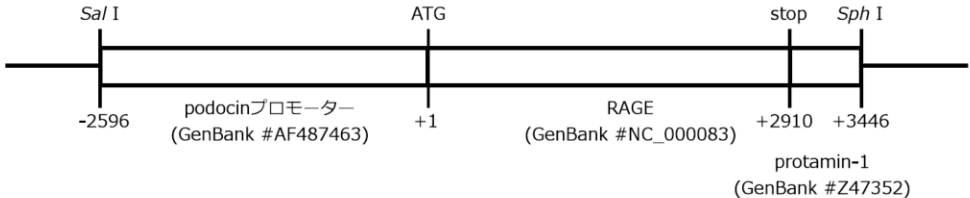
Generation of the mice with specific deletion of PDK1 from their podocytes



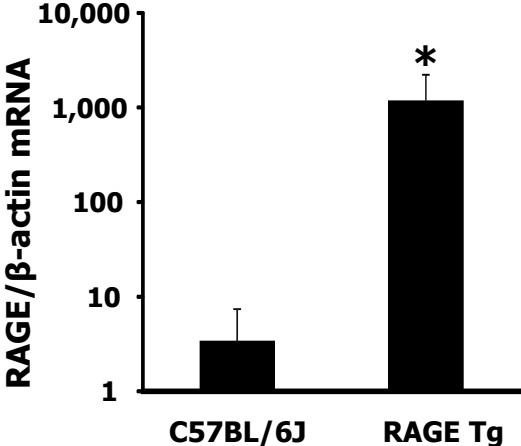
*: $p < 0.05$ vs corresponding controls

Transgenic mice expressing receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) gene under the control of the podocin promoter

(A)

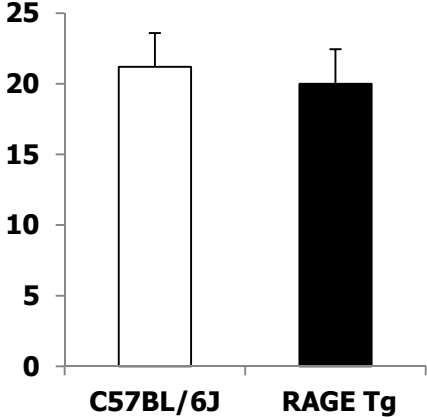


(B)



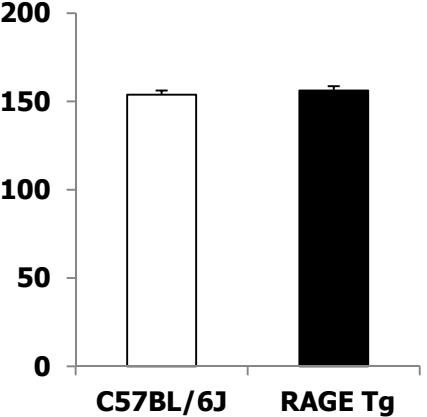
(C)

Body weight (g)



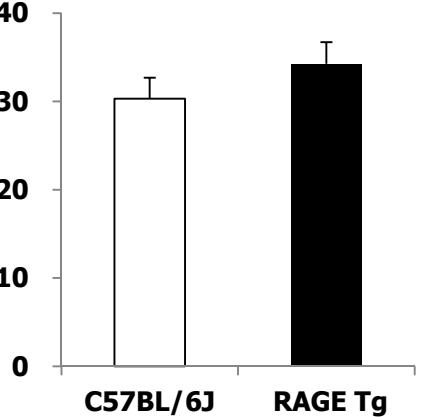
(D)

Glucose (mg/dL)



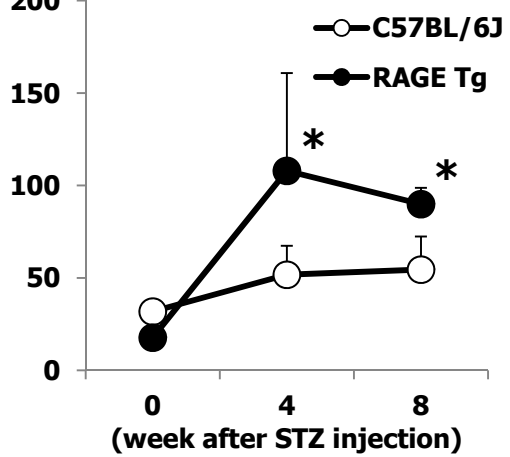
(E)

U-ACR (mg/g Cre)



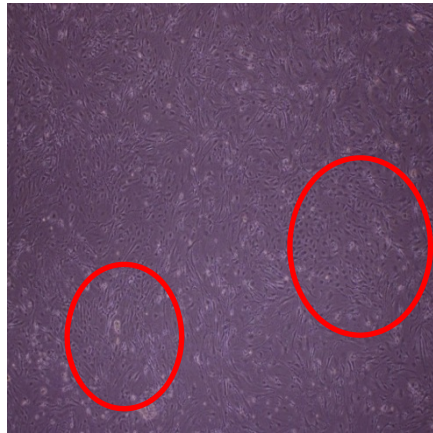
(F)

U-ACR (mg/g Cre)



*: $p < 0.05$ vs corresponding controls

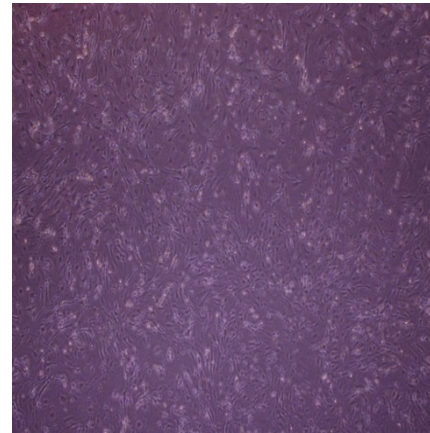
Osr1/WT1遺伝子を導入されたマウスASC細胞



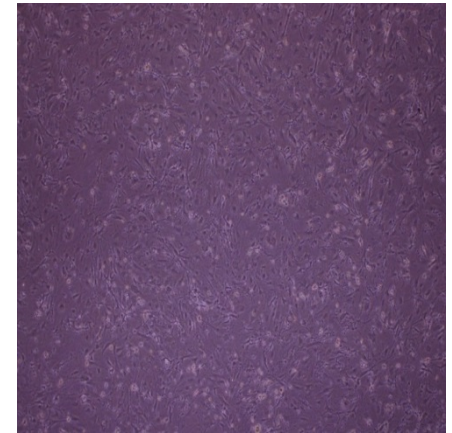
Osr1+WT1 introduced ASC
7 days



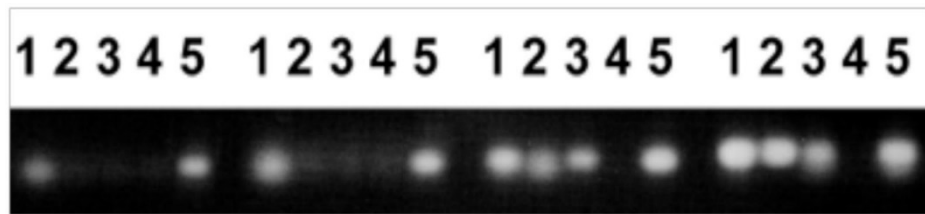
Osr1 introduced ASC
7 days



WT1 introduced ASC
7 days



ASC



Foxc2

Podxl

WT1

Osr1

(Endogenous) (Endogenous)

- 1: Osr1+WT1 introduced ASC (3 days)
- 2: Osr1 introduced ASC (3 days)
- 3: WT1 introduced ASC (3 days)
- 4: ASC (3 days)
- 5: 15 dpc mouse embryos

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 23指104

研究課題名：糸球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系の腎機能に対する役割の検討

主任研究者名：鏑木康志

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Increased serum leukocyte cell- derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver.	Okumura A, Unoki-Kubota H, Matsushita Y, Shiga T, Moriyoshi Y, Yamagoe S, Kaburagi Y.	BioScience Trends.	7 (6)	2013年
Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is induced by high glucose in retinal pigment epithelial cells and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells.	Yokouchi H, Eto Koki, Nishimura W, Takeda N, Kaburagi Y, Yamamoto S, Yasuda K.	Acta ophthalmologica.	91 (4)	2013年
Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK-A ^y mouse model using the iTRAQ technique.	Takahashi E, Okumura A, Unoki-Kubota H, Hirano H, Kasuga M, Kaburagi Y.	J Proteomics	84	2013年
Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein.	Okumura A, Suzuki T, Miyatake H, Okabe T, Hashimoto Y, Miyakawa T, Zheng H, Unoki-Kubota H, Ohno H, Dohmae N, Kaburagi Y, Miyazaki Y, Tanokura M, Yamagoe S.	FEBS Lett.	587 (5)	2013年
The miR-17/92 cluster is targeted by STAT5 but dispensable for mammary development	Yamaji D 他	Genesis	50 (9)	2013年
Histidine Augments the Suppression of Hepatic Glucose Production by Central Insulin Action	Kimura K, Matsumoto M, Inoue H 他	Diabetes	62 (7)	2013年
Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration	Yamaji D, 他	Nucleic Acids Research	41 (3)	2013年
Mammary-specific gene activation is defined by progressive recruitment of STAT5 during pregnancy and the establishment of H3K4me3 marks	Yamaji D 他	Mol Cell Biol	34 (3)	2014年

研究発表及び特許取得報告について

Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin.	Asahara S, Matsumoto M, Kido Y.	Diabetologia	56(5)	2013年
Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration.	Yamaji D, 他	Nucleic Acids Res.	41(3)	2013年
InsP3R-Ca(2+) signaling takes center stage in the hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis.	Matsumoto M	Cell Res.	22(11)	2012年
CITED2 links hormonal signaling to PGC-1 α acetylation in regulation of gluconeogenesis.	Sakai M, Matsumoto M 他	Nature Medicine	18(4)	2012年
Endoplasmic Reticulum Stress Inhibits STAT3-Dependent Suppression of Hepatic Gluconeogenesis via Dephosphorylation and Deacetylation.	Inoue H, Matsumoto M 他	Diabetes	61(1)	2012年
Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant.	Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Le Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N	BMC Infect Dis	11	2011年
Role of the podocyte signal-transduction	Kaburagi Y, Unoki-Kubota H	Diabetol Int	2	2011年
Overexpression of KLF15 in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion.	Nagare T, Matsumoto M 他	J Biol Chem	286(43)	2011年
Ablation of TSC2 Enhances Insulin Secretion by Increasing the Number of Mitochondria through Activation of mTORC1.	Inoue H, Matsumoto M 他	PLoS One	6(8)	2011年
Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain	Konno, M. Masui, S. Hamazaki, T.S. Okochi, H.	J. Biotechnol.	Vol. 154, No. 4	2011年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
------	-----	-----	----	----

研究発表及び特許取得報告について

Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein: the monomeric forms are stabilized by the zinc ion.	Okumura A, Suzuki T, Miyatake H, Miyakawa T, Zheng H, Unoki-Kubota H, Dohmae N, Kaburagi Y, Tanokura M, Yamagoe S.	第36回日本分子生物学会年会	神戸	2013. 12. 3
血中LECT2濃度は肥満と脂肪肝の予測因子となりうるか	奥村 彰規、久保田 浩之、松下 由実、志賀 智子、森吉 百合子、鏑木 康志	第34回日本肥満学会	東京	2013. 10. 11
定量的プロテオミクスを用いた2型糖尿病関連因子の探索	久保田 浩之、高橋 枝里、奥村 彰規、平野 久、鏑木 康志	第28回日本糖尿病合併症学会	旭川	2013. 9. 13
Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography for Profiling of Human Urine Shotgun Proteome	Takakura M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y.	HUPO 12th Annual World Congress	横浜	2013. 9. 14
iTRAQ-Based Quantitation and Validation by Multiple Reaction Monitoring to Identify Diabetes-Related Biomarkers in Sera from KK-A ^y Diabetes Mice	Takahashi E, Unoki-Kubota H, Okumura A, Hirano H, Kaburagi Y	HUPO 12th Annual World Congress	横浜	2013. 9. 14
Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 は新規の肥満関連因子である	奥村 彰規、久保田 浩之、松下 由実、志賀 智子、森吉 百合子、鏑木 康志	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013. 5. 16
蛍光ディフレンシャル二次元電気泳動による糖尿病腎症患者のプロテオーム解析	鏑木 康志、山下 亮、本間 綾香、梶尾 裕、野田 光彦、久保田 浩之	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013. 5. 16
The transcriptional coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation by interacting with retinoblastoma protein	松本 道宏 他	12th International Congress on Obesity	クアラルンプール・マレーシア	2014年3月17日
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	松本 道宏 他	第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会シンポジウム2	宮崎	2014年2月15日
The histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through a CITED2-dependent substrate switch	松本 道宏 他	Keystone Symposia, Challenges and Opportunities in Diabetes Research and Treatment	バンクーバー・カナダ	2014年1月14日

研究発表及び特許取得報告について

The histone acetyltransferase GCN5 is an essential regulator of hepatic gluconeogenesis	酒井 真志人 他	International Symposium on Transcription and Metabolism	淡路夢舞台国際会議場	2013年11月12日
The Transcriptional Coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation and lipid accumulation	山地 大介 他	International Symposium on Transcription and Metabolism	淡路夢舞台国際会議場	2013年11月12日
Central Role of Fasting Inducible CITED2-GCN5 Interaction in Hepatic Gluconeogenesis	松本 道宏 他	International Symposium on Transcription and Metabolism 2013	淡路夢舞台国際会議場	2013年11月11日
Central Role of Fasting Inducible CITED2-GCN5 Interaction in Hepatic Gluconeogenesis	松本 道宏 他	Asia-Pacific Diabetes and Obesity (APDO) Study Group symposium 2013	東京	2013年10月12日
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構の解明	酒井 真志人 他	第34回日本肥満学会・若手研究奨励賞審査口演	東京	2013年10月11日
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第34回日本肥満学会	東京	2013年10月11日
転写調節分子CITED2による代謝制御機構	松本 道宏 他	国立健康・栄養研究所 所内セミナー	国立健康・栄養研究所・東京	2013年10月10日
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構	酒井 真志人	The 7th Kobe Diabetes Night Seminar	神戸	2013年10月4日
肝臓における2型糖尿病治療標的の同定への試みー肝糖産生亢進と脂肪肝を中心にー	松本 道宏 他	日本医科大学老人病研究所セミナー	日本医科大学老人病研究所・川崎	2013年9月26日
The Histone Acetyltransferase GCN5 is an Essential Regulator of hepatic Gluconeogenesis	酒井 真志人 他	1st Annual Helmholtz-Nature Medicine Diabetes Conference	ミュンヘン・ドイツ	2013年9月
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第18回アディポサイエンスシンポジウム	東京	2013年8月24日
転写調節分子CITED2による代謝制御機構の解明	松本 道宏	第34回 Osaka Diabetes Forum - Paradigm Conversion for Diabetes-	大阪	2013年8月22日
肝インスリン抵抗性による病態の分子機構-肝糖産生亢進と脂肪肝を中心に-	松本 道宏	第6回 Metabolic-Hepatology 研究会	仙台	2013年7月30日
CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis	松本 道宏 他	2nd Annual World Congress of Diabetes-2013	西安・中国	2013年5月20日
ヒスチジンは、中枢神経を介してインスリン作用による肝糖産生抑制を増強する	木村 久美, 松本 道宏 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月18日
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	松本 道宏 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会特別シンポジウム3; インスリン作用研究の進化と展望	熊本	2013年5月17日

研究発表及び特許取得報告について

転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月17日
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会・若手研究奨励賞審査口演	熊本	2013年5月16日
CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis	松本 道宏 他	1st Korea-Japan Diabetes Forum, 26th Spring Congress of Korean Diabetes Association	済州島・韓国	2013年5月11日
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構	酒井 真志人 他	第86回日本内分泌学会学術総会	仙台	2013年4月27日
転写調節因子CITED2の脂肪細胞分化における役割の解析	松本 道宏 他	第86回日本内分泌学会学術総会	仙台	2013年4月26日
ヒストジンは中枢作用を介して肝糖新生を抑制する	木村 久美, 松本 道宏 他	第86回日本内分泌学会学術総会	仙台	2013年4月25日
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第50回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2013年4月12日
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第50回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2013年4月12日
尿プロテオーム解析による糖尿病腎症関連因子の探索	鏑木康志、山下亮、本間綾香、佐藤（三城）恵美、久保田浩之	第27回日本糖尿病合併症学会	福岡	2012年11月
Identification of Differential Proteomes Associated with the Development of Type 2 Diabetes in the KK-A ^y Mice Using iTRAQ Technique	Unoki-Kubota H, Takahashi E, Okumura A, Hirano H, Kaburagi Y	9th IDF WPR Congress& 4th AASD Scientific Meeting	京都	2012年11月
2DICALを用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索	高橋枝里、久保田浩之、本間綾香、平野久、鏑木康志	日本プロテオーム学会2012年大会	東京	2012年7月
尿プロテオーム解析による糖尿病性腎症のバイオマーカー探索	佐藤 恵美、加納 圭子、本間綾香、高橋枝里、奥村彰規、久保田 浩之、鏑木 康志	第55回日本糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月
糖尿病性網膜症の発症プロセスに関与する血中タンパク質	奥村彰規、佐藤恵美、久保田浩之、鏑木 康志	第55回日本糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月

研究発表及び特許取得報告について

糖尿病性細小血管症バイオマーカー探索の試み	鏑木康志、佐藤恵美、本間綾香、加納圭子、高橋枝里、奥村彰規、中村直子、佐伯久美子、湯尾明、平野久、久保田浩之	第55回日本糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月
KK-A ^y マウス血清を用いた2型糖尿病関連因子の探索	高橋枝里、久保田浩之、奥村彰規、佐藤恵美、平野久、鏑木康志	第55回日本糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月
糖尿病腎症の進展に対する低分子量ヘパリンの効果の検討	久保田浩之、岩田和希子、山本靖彦、岡本宏、山本博	第55回日本糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月
KK-A ^y マウス血清を用いた2型糖尿病関連因子の探索	高橋枝里、久保田浩之、奥村彰規、佐藤恵美、平野久、鏑木康志	第49回日本臨床分子医学会学術集会	京都	2012年4月
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構.	酒井真志人, 松本道宏 他	第7回炎症・脂質代謝/メタボリサーチフォーラム	東京	2013年1月
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構.	酒井真志人, 松本道宏 他	第24回分子糖尿病学シンポジウム	東京	2012年12月
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構.	酒井真志人, 松本道宏 他	第35回日本分子生物学会年会	福岡	2012年12月
転写調節因子CITED2はRb蛋白との相互作用を介して脂肪細胞分化を制御する.	辻村 知子, 松本道宏 他	第35回日本分子生物学会年会	福岡	2012年12月
The Role of CITED2 in the Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis.	松本道宏 他	第85回日本生化学会	福岡	2012年12月
CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis.	Matsumoto M.	2012 International Conference on Diabetes and Metabolism	Seoul, Korea	2012年11月
CITED2 links hormonal signaling to PGC-1 α acetylation in regulation of gluconeogenesis.	3. Sakai M, Matsumoto M, 他	9th IDF-WPR Congress / 4th AASD Scientific Meeting	Koyto, Japan	2012年11月
転写調節因子CITED2の脂肪細胞分化における役割の解析.	松本道宏, 辻村知子 他	第33回日本肥満学会	京都	2012年10月
ヒスチジンは中枢作用を介して肝糖新生を抑制する.	松本道宏, 井上啓 他	第33回日本肥満学会	京都	2012年10月
転写調節因子CITED2の脂肪細胞の分化調節における役割の解析.	松本道宏 他	第55回糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月
CITED2はホルモン応答性にPGC-1 α のアセチル化を調節し肝糖新生を制御する.	酒井真志人, 松本道宏 他	第55回糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月

研究発表及び特許取得報告について

CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis.	Matsumoto M.	2012 Asia-Pacific Diabetes and Obesity (APDO) Study Group Symposium	Seoul, Korea	2012年4月
CITED2はホルモン応答性にPGC-1 α のアセチル化を調節し肝糖新生を制御する.	酒井真志人, 松本道宏 他	第49回日本臨床分子医学会	京都	2012年4月
転写調節因子CITED2の脂肪細胞の分化調節における役割の解析.	松本道宏 他	第85回日本内分泌学会学術総会	名古屋	2012年4月
転写共役因子CITED2によるNF κ B活性調節を介した炎症制御機構.	酒井真志人, 松本道宏 他	第85回日本内分泌学会学術総会	名古屋	2012年4月
尿プロテオーム解析による糖尿病性腎症のバイオマーカー探索	佐藤 恵美、加納 圭子、久保田 浩之、鏑木 康志	第23回糖尿病性腎症研究会	東京	2011年12月
血清プロテオーム解析による2型糖尿病関連因子の探索	高橋枝里、奥村彰規、加納圭子、久保田浩之、岡村匡史、平野久、鏑木康志	第34回日本分子生物学会年会	横浜	2011年12月
2型糖尿病関連血清タンパク質が網膜血管内皮細胞に及ぼす影響の解析	奥村彰規、高橋枝里、久保田浩之、平野久、岡村匡史、鏑木康志	第34回日本分子生物学会年会	横浜	2011年12月
結核患者における血漿ペプチドーム解析によるバイオマーカー探索	田中 崇裕、櫻田紳策、加納圭子、佐藤恵美、鏑木康志、小林信之、慶長直人	第34回日本分子生物学会年会	横浜	2011年12月
MRM法を用いた糖尿病性細小血管症バイオマーカーの探索	本間綾香、加納圭子、佐藤恵美、高橋枝里、奥村彰規、佐伯久美子、湯尾明、久保田浩之、鏑木康志	日本プロテオーム機構第9回大会	新潟	2011年7月
糖尿病性細小血管症バイオマーカー探索の試み	加納圭子、本間綾香、佐藤恵美、高橋枝里、奥村彰規、佐伯久美子、湯尾明、久保田浩之、鏑木康志	第54回日本糖尿病学会年次学術集	札幌	2011年5月
糖尿病モデルLEA/Sendaiラット血清のプロテ	高橋枝里、岡村匡史、加納圭子、奥村彰規、久保田浩之、平野久、安田和樹、鏑木康志	第54回日本糖尿病学会年次学術集	札幌	2011年5月
CITED2 links hormonal signals to PGC-1 α acetylation for regulating fasting gluconeogenesis.	Matsumoto M, Sakai M 他	Keystone Symposia	Santa Fe, New Mexico, USA	2012年1月
Effect of cilostazol on lymphatic endothelial cells in vitro and lymph flow in vivo.	Kimura T, Hamazaki, T.S, Sugaya, M, Fukuda, S, Sato, S, Okochi, H.	第36回研究皮膚科学会	京都	2011年12月

研究発表及び特許取得報告について

Do adipose tissue derived stem cells (ASCS) promote tumor growth?	Tokuhara, M. Ishiguro, M. Fukuda, S. Hamazaki, T.S. Okochi, H.	IFATS 2011	Miami Beach, U. S. A.	2011年11月
脂肪細胞における転写因子KLF15の過剰発現はSCD1発現を抑制し、インスリン分泌を増加させる	永礼智基、松本道宏 他	第32回日本肥満学会	淡路	2011年9月
CITED2はホルモン応答性にPGC-1 α のアセチル化を調節し、肝糖産生を制御する	酒井真志人、松本道宏 他	第32回日本肥満学会	淡路	2011年9月
CITED2 links hormonal signals to PGC-1 α acetylation for regulating fasting gluconeogenesis.	Sakai M, Matsumoto M 他	47th EASD Annual Meeting	Lisbon, Portugal	2011年9月
転写共役因子CITED2による肝臓の糖代謝制御機構の解明	松本道宏	第84回日本内分泌学会学術総会	神戸	2011年4月
転写共役因子CITED2はPGC-1 α の活性調節を介して肝糖代謝を制御する	酒井真志人、松本道宏 他	第84回日本内分泌学会学術総会	神戸	2011年4月
小胞体ストレスは、アセチル化抑制を介して、STAT3依存性の肝糖新生系酵素遺伝子発現抑制を阻害する	木村久美、松本道宏、井上啓他	第84回日本内分泌学会学術総会	神戸	2011年4月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
特別シンポジウム3 インスリン作用研究の進歩と展望	松本 道宏	第56回日本糖尿病学会年次学術集会 Official News Flash No. 3 Report	熊本	2013年5月18日
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構の解明	酒井 真志人	第56回日本糖尿病学会年次学術集会 Official News Flash No. 2 Report	熊本	2013年5月17日
血糖上げるたんぱく	松本道宏 他	読売新聞	夕刊7面 科学	2012年5月10日
Cbp/p300-interacting Transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2)	松本道宏 他	Science-Business eXchange (BioCwntury)	5(14)	2012年4月5日
高血糖 肝臓たんぱく質関与	松本道宏 他	朝日新聞	朝刊31面 科学	2012年3月26日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
(糖尿病腎症の発症または発症リスクの検出方法及びキット)	(特願2013-173382)	(鏑木康志、久保田浩之、高倉美智子)	(2013年8月23日)	(日本)
(糖尿病治療用医薬組成物及びその有効成分のスクリーニング方法)	(特願2012-258468)	(松本道宏)	(2012年11月27日)	(日本)

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと

課題番号 : 23指104

研究課題名 : 腎糸球体上皮細胞特異的PDK1, TSC2遺伝子改変マウスの作製と表現型解析

主任研究者名 : 鎌木 康志

分担研究者名 : 鎌木 康志

キーワード : 糖尿病腎症、糸球体上皮細胞

研究成果 :

糖尿病の大部分を占める2型糖尿病ではインスリン(Ins)分泌障害とIns抵抗性が病態の基礎にあり、近年、内臓脂肪蓄積とIns抵抗性との関連が注目されている。Welshらは、腎糸球体上皮細胞(podocyte)特異的にIns受容体を欠損するノックアウト(KO)マウスを用いて、糖尿病腎症の発症・進展にIns受容体シグナルが関与することを初めて報告した(Welsh G. et al., Cell Metabolism, 2010)。そこで本研究は、Insシグナル伝達系において重要な役割を果たしている分子のpodocyte特異的なKOマウスをCre-loxPシステムを用いて作製し、腎症の発症・進展に関する表現型を解析することを目的とした。

まず、podocyte特異的Cre recombinase (Cre)発現マウスとTSC2遺伝子floxマウスとの交配により、podocyte特異的TSC2欠損マウス(PodTSC2KO)ならびに対照としてのTSC2-floxマウスの作製を試みた。Podocyte特異的Cre発現マウスにはpodocinプロモーターを有するCreトランスジェニックマウス(PodCre Tg)を用い、TSC2遺伝子floxマウスとの交配により産まれたマウス尻尾よりゲノムDNAを抽出しCre、ならびにflox配列の導入をPCR法により検討した。複数回の交配を繰り返した後、Cre遺伝子を有しホモ接合型でTSC2遺伝子領域にflox配列が挿入されたPodTSC2KOマウス(Cre(+), TSC2(flox/flox))が産出された(スライド1(A))。対照マウスとしてPodCre Tgマウス(Cre(+), TSC2(+/+))、ならびにホモ接合型TSC2遺伝子floxマウス(Cre(-), TSC2(flox/flox))も併せて作製した。PodCre Tgマウス、TSC2(flox/flox)マウス、PodTSC2KOマウスより糸球体を単離しTSC2 mRNA発現量を解析したところ、PodCre Tgマウス、TSC2(flox/flox)マウスに比べPodTSC2KOマウスにおいてTSC2 mRNAの有意な発現減少が認められた(スライド1(B))。一方、PodTSC2KOマウス心臓、肝臓、腎臓(皮質部)、骨格筋、傍精巣上体脂肪におけるTSC2 mRNAレベルは対照PodCre Tgマウス、TSC2(flox/flox)マウスと比べて有意差を認めなかった(スライド1(C))。PodTSC2KOマウスはメンデルの法則に従って生まれ、また外観上顕著な異常は観察されなかった。3, 5, 7週齢において、PodPDK1KOマウス、PDK1(flox/flox)マウス、PodCre Tgマウスの体重、ならびに血糖レベルに有意差は認められなかった。一方、PodTSC2KOマウスの尿中アルブミン・クレアチニン比はPodCre Tgマウス、TSC2(flox/flox)マウスに比べて有意な高値を示し(スライド1(D))、SDS-PAGE解析により尿中に多量のアルブミンが排泄されていることが明らかとなった(スライド1(E))。また、7週齢PodTSC2KOマウスでは、PodCre Tgマウス、

TSC2(flox/flox)マウスに比べて有意な BUN 値の上昇、ならびに有意な血中アルブミン値の低下を認め、腎機能の低下が示唆された(スライド 1 (F)-(G))。

次に、podocyte 特異的 Cre recombinase (Cre) 発現マウスと PDK1 遺伝子 flox マウスとの交配により、podocyte 特異的 PDK1 欠損マウス (PodPDK1KO) ならびに対照としての PDK1-flox マウスの作製にも取り組んだ。Podocyte 特異的 Cre 発現マウスには podocin プロモーターを有する Cre トランスジェニックマウス (PodCre Tg) を用い、PDK1 遺伝子 flox マウスとの交配により産まれたマウス尻尾よりゲノム DNA を抽出し Cre、ならびに flox 配列の導入を PCR 法により検討した。複数回の交配を繰り返した後、Cre 遺伝子を有し ホモ接合型で PDK1 遺伝子領域に flox 配列が挿入された PodPDK1KO マウス (Cre(+), PDK1 (flox/flox)) が産出された(スライド 2 (A))。対照マウスとして PodCre Tg マウス (Cre(+), PDK1 (+/+))、ならびにホモ接合型 PDK1 遺伝子 flox マウス (Cre(-), PDK1 (flox/flox)) も併せて作製した。PodPDK1KO マウス、ホモ接合型 PDK1 遺伝子 flox マウスより糸球体を単離し Cre mRNA 発現量を解析したところ、PodPDK1KO マウスにおいて Cre mRNA の有意な発現上昇が認められた(スライド 2 (B))。PodPDK1KO マウスはメンデルの法則に従って生まれ、また外観上顕著な異常は観察されなかった。3 週齢において、PodPDK1KO マウス、PDK1 (flox/flox) マウス、PodCre Tg マウスの体重、ならびに血糖レベルに有意差は認められなかった(スライド 2 (C)-(D)) もの、PodPDK1KO マウスの尿中アルブミン比は PDK1 (flox/flox) マウスに比べて有意な高値を示した(スライド 2 (E))。また、3 週齢 PodPDK1KO マウスでは、PodCre Tg マウス、PDK1 (flox/flox) マウスに比べて有意な BUN 値の上昇(スライド 2 (F))、ならびに有意な血中アルブミン値の低下が認められ、腎機能の低下が示唆された。PDK1 (flox/flox) マウス腎臓の光顕による病理学的所見では明らかな異常を認めないのに対し(スライド 2 (G))、PodPDK1KO マウス腎臓では尿細管腔内の蛋白円柱の存在、ならびにメサンギウム基質の拡大が認められた(スライド 2 (H))。

本研究により podocyte における TSC2, PDK1 は糸球体機能維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、TSC2, PDK1 による糸球体機能破綻のより詳細な分子機序が解明されれば、糖尿病腎症の病態把握のみならず糖尿病腎症の新規治療法開発に結び付くことが期待される。

課題番号 : 23指104

研究課題名 : 腎系球体におけるインスリンシグナル伝達系、ならびに糖尿病腎症の発症・進展に及ぼすAGE-AGE受容体(RAGE)の作用の検討

主任研究者名 : 鎌木康志

分担研究者名 : 松本道宏

キーワード : 糖尿病腎症、後期糖化反応生成物(Advanced Glycation Endproducts: AGE), AGE 受容体(receptor for AGE: RAGE)

研究成果 :

糖尿病腎症は我が国における腎不全の原疾患の第一位であり、患者数は年々増加しているものの、糖尿病腎症の発症・進展を防止する十分な治療法は確立されていない。近年、糖尿病における持続的な高血糖状態において促進的に形成される後期糖化反応生成物(AGE)は、骨格筋脂肪や脂肪細胞におけるインスリン(Ins)シグナル伝達系の障害を引き起こし、Ins抵抗性の発症に関与することが明らかになりつつある(Unoki H et al., Curr Pharm Des, 2008)。そこで糸球体上皮細胞(podocyte)における Ins シグナル伝達障害に対する AGE の作用、ならびに腎症発症との関連を *in vivo* の系で解析することを目的に podocyte 特異的 AGE 受容体(RAGE)トランスジェニックマウスを作製し、糖尿病腎症の発症、進展に関連する病理学的、生化学的解析を行った。

Podocyte 特異的に RAGE を発現するトランスジェニックマウスを作製する目的で podocin プロモーターを有するマウス RAGE 遺伝子発現ベクターを構築し、podocyte 特異的に RAGE を過剰発現するトランスジェニック(PodRAGE Tg)マウスの作製を行った(スライド3(A))。約400個のC57BL/6Jマウス受精卵に遺伝子コンストラクトを注入し、それらを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた結果、雄2匹、雌2匹のfounder4系統が得られた。このうち2系統(B252系統, B313系統)が自然交配可能であったため繁殖し解析を行った。磁気ビーズを用いた灌流法により PodRAGE Tg(B252系統)より腎系球体を単離し、腎系球体における RAGE mRNA 発現量を real-time PCR により検討した。PodRAGE Tg 腎系球体における RAGE mRNA 発現量は対照 C57BL/6J マウスに比べ有意に上昇していた(スライド3(B))。なお、PodRAGE Tg マウス(B252系統)、PodRAGE Tg マウス(B313系統)からの単離糸球体における RAGE mRNA レベルは両系統間で発現差異を認めなかった。

PodRAGE Tg マウスはメンデルの法則に従って生まれ、外観上顕著な異常は観察されていない。6週齢における PodRAGE Tg マウス, 対照 C57BL/6J マウスの体重、随時血糖、絶食時血清インスリン値は両群間で有意差を認めなかった(スライド3(C)-(E))。また、PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウスの尿中アルブミン・クレアチニン比も両群間で有意差を認めず、これは、PodRAGE Tg マウスの血糖値、ならびに血中後期糖化産物(AGE)濃度が対照マウスと同程度であるため、AGE 受容体である RAGE が podocyte で過剰発現していても podocyte や腎

臓の機能には大きな影響を及ぼさないためであると考えられた。そこで8週齢 PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウスそれぞれにストレプトゾトシンを投与し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病における腎機能の変化を解析した。ストレプトゾトシン投与4週後の PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウス血糖値はそれぞれ 417 ± 71 mg/dL、 390 ± 153 mg/dL、ストレプトゾトシン投与8週後の PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウス血糖値はそれぞれ 420 ± 84 mg/dL、 448 ± 32 mg/dL であり、いずれの週齢でも両群間での有意な差は認められなかった。また、ストレプトゾトシン投与4~8週後の PodRAGE Tg マウス、対照 C57BL/6J マウス体重も両群間で有意な差は認められなかった。一方、PodRAGE Tg マウスの尿中アルブミン・クレアチニン比はストレプトゾトシン投与4週後、8週後のいずれも対照 C57BL/6J マウスに比べ有意な高値を示した(スライド3(F))。PodRAGE Tg マウスの光顕による病理学的所見では、対照 C57BL/6J マウスに比べて腎糸球体領域における軽度のメサンギウム基質の拡大が認められた。

本研究により podocyte における RAGE の発現上昇は糸球体上皮細胞のバリア機能障害を引き起こし、糖尿病腎症の病態を増悪化させることが示唆された。今後、RAGE 発現上昇による糸球体機能破綻のより詳細な分子機序が解明されれば、糖尿病腎症の病態把握のみならず糖尿病腎症の新規治療法開発に結び付くことが期待される。

課題番号 : 23指104
研究課題名 : Podocyte前駆細胞補充療法による糖尿病性腎症治療の試み
主任研究者名 : 鏑木 康志
分担研究者名 : 浜崎 辰夫

キーワード : 糸球体上皮細胞、脂肪前駆細胞、移植、糸球体腎炎モデルマウス
研究成果 :

1. 研究目的

糸球体上皮細胞 (podocyte) の補充療法が糖尿病腎症治療に有効かを検証する目的で、Osr1、WT1 をはじめとする podocyte 分化に関与する遺伝子を高発現した脂肪前駆細胞を作製する。さらにこの細胞を糸球体上皮細胞へと培養系で誘導し、これを糖尿病腎症モデルマウスに移植することで、podocyte 前駆細胞補充の糖尿病腎症治療としての可能性を検討する。

2. 研究方法

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC) から podocyte 前駆細胞へ分化誘導する方法の確立

Podocyte 前駆細胞を作製するために、podocyte 前駆細胞の分化に必要な遺伝子を有し Multipotency な細胞である ASC を用いた。GFP 遺伝子を導入した成体 BALB/c トランスジェニックマウスから皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理により得られた ASC 細胞に、腎臓の初期発生過程において重要な遺伝子である Osr1 および糸球体、podocyte 等の発生に重要な遺伝子である WT1 を導入した。10 日間培養し、細胞の形態変化および腎構成細胞への分化を示す Wnt4、Six2、Foxc2 と Podxl 等の遺伝子発現変化を調べた。

Adriamycin による糸球体腎炎モデルマウスの作製

糖尿病腎症モデル動物の作製にあたり現在までに報告されている種々のモデル動物を検討した結果、adriamycin 投与による糸球体腎炎モデルマウスが安価かつ簡単に作成できると考え、BALB/c マウスへの adriamycin 投与による糸球体腎炎モデルマウスの作製を試みた。BALB/c マウスに対して一匹当たり 5mg/kg body weight、10mg/kg body weight および 20mg/kg body weight の adriamycin を尾静脈に注射したのち、マウスの体重、ならびに Bradford Assay にて尿タンパク質量の経時変化を観察した。さらに adriamycin 投与後のマウスより腎臓を採取し、顕微鏡による病理学的評価を行った。対照マウス群には PBS 投与を行った。

糸球体腎炎マウスへの間葉系幹細胞移植効果の検討

GFP 遺伝子トランスジェニックマウスより調製した ASC に Osr1/WT1 遺伝子を導入後、adriamycin 投与した糸球体腎炎モデルマウスに ASC を尾静脈より投与した。対照マウス群には尾静脈より PBS 投与を行った。細胞移植後、両群のマウスの体重と尿タンパク質量の推移を計測するとともに、マウス腎臓の組織学的解析を行い、ASC 投与の影響を検討した。

3. 研究結果

脂肪組織由来間葉系幹細胞から podocyte 前駆細胞へ分化誘導する方法の確立

ASC に Osr1、あるいは WT1 のいずれかを単独導入、および同時導入したのち、DMEM/FBS 培地で一週間培養して細胞の変化を観察したところ、Osr1、ならびに Osr1/WT1 を導入した ASC では一部細胞の形態がより上皮細胞様な形態に変化した(スライド4、上段)。また、遺伝子導入された細胞から腎構成細胞への分化を示す Wnt4、Six2、Foxc2 と Podxl 等の遺伝子発現が検出された(スライド4、下段)。

遺伝子導入された ASC を細胞移植に用いるタイミングを検討するために、Osr1 または Osr1/WT1 を導入した ASC の状態と性質をより詳しく解析した。ASC に遺伝子を導入した 30 分、24 時間、72 時間、7 日、14 日後に Nephin、Podxl、Foxc2、Pax2、Lmx1、Wnt4、Six2、CD24、CD133、CDH11 発現を解析したところ、Pax2 と Lmx1、Wnt4、Nephin、Foxc2 は Osr1 または

Osr1/WT1 導入 24 時間以降から発現が検出され、3~7 日目までに発現がピークに達した後に 14 日目で発現が低下した。CD133 の発現は遺伝子導入後 3 日目でピークに達したあと 7 日目から低下した。CD24 および CDH11 は採取したいずれの時期でも発現が検出された。また、Pax2 と Lmx1、Wnt4、Nephrin、Foxc2 の発現は Osr1/WT1 導入細胞に比べ Osr1 導入細胞で発現が強かった。これらの結果から、Osr1/WT1 遺伝子導入 3 日後の ASC が podocyte 前駆細胞の特性にもっとも類似し細胞移植に適していると判断した。

Adriamycin による糸球体腎炎モデルマウスの作製

BALB/c マウスに対して一匹当たり 5 mg/kg body weight、10mg/kg body weight および 20mg/kg body weight の adriamycin を尾静脈に注射したのち、マウスの体重及び尿タンパク質量を経時的に計測した。5mg/kg body weight および 10mg/kg body weight adriamycin を投与した BALB/c マウス群では、対照 BALB/c マウス群に比べて体重の減少、および尿中タンパク質量の増加が認められた。また、腎臓の病理学的解析から adriamycin 投与 BALB/c マウス群では腎糸球体のメサンギウム領域の拡大が認められた。なお、20mg/kg body weight の adriamycin 投与群では一部のマウスが死亡した。

糸球体腎炎マウスへの間葉系幹細胞移植効果の検討

Osr1/WT1 遺伝子導入による ASC から podocyte 前駆細胞への誘導と糸球体腎炎モデルマウスの確立に成功したため、Osr1/WT1 遺伝子を導入した ASC および遺伝子導入を行っていない ASC を 10mg/ kg body weight の adriamycin 投与マウスの尾静脈に注入し、移植された細胞の腎臓への生着率および尿中タンパク質量の変化を検討した。Osr1/WT1-ASC および ASC を移植したマウス群では、非細胞投与マウス群に比べて尿中タンパク量の低下が認められた。ところが、細胞を移植したマウス腎臓の組織学的解析では GFP 発現 ASC の局在は腎組織内にはほとんど認められなかった。さらに ASC の腎組織内への生着率を検討するために、Osr1/WT1-ASC および ASC を adriamycin 腎症モデルマウスの尾静脈および腎皮膜下に注入し、一週間後マウスの腎臓を摘出して GFP 発現細胞の局在を検討した。Osr1/WT1-ASC および ASC 投与マウスの腎組織内では GFP の発現はごく僅かしか検出されず、移植された細胞の腎組織内への定着はほとんど認められなかった。また、より重症度の高い糸球体腎炎マウスとして 15mg/ kg body weight の adriamycin を投与した BALB/c マウス群を作製し、Osr1/WT1-ASC および ASC を投与しても腎組織内への定着はほとんど観察されなかった。

4. 考察とまとめ

ASC への Osr1/WT1 遺伝子導入により podocyte 分化に関与する遺伝子群の発現と上皮細胞様の形態変化が引き起こされ、podocyte 前駆細胞への誘導が可能となった。しかしながら、Osr1/WT1-ASC を用いた糸球体腎炎モデルマウスへの細胞移植実験の結果からは podocyte 前駆細胞としての分化は不完全であった。遺伝子導入の際にメチル化を抑制し epigenetic な変化を促す方法や、Osr1/WT1 のような podocyte 前駆細胞分化の初期に関与する遺伝子のみならず podocyte 前駆細胞の分化に関与する遺伝子群を追加導入することにより podocyte 前駆細胞への分化誘導効率を高める工夫が必要とされる。

糸球体腎炎モデルマウス腎組織における移植細胞のホーミング効果が低いことについては、adriamycin が投与されたマウスにおいては腎臓以外の部位で炎症が起き、移植された ASC が腎臓以外の部位に誘導されたため、腎臓への定着が相対的に低かった可能性が考えられる。また、作製した adriamycin 腎症モデルマウスでは尿タンパクの出現が認められるものの腎障害の程度が低いいため、移植した細胞に対するホーミング誘導効果が十分ではなかった可能性も考えられる。細胞誘導療法をより確実に評価するためには、腎障害モデルの作製法も今後改善する余地がある。