

平成 22 年 4 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590933

研究課題名（和文）新規 Maf 群転写因子関連糖尿病性腎症モデルマウスの作製および解析

研究課題名（英文）A novel mouse model of diabetic nephropathy: MafA-deficient and beta cell-specific MafK-overexpressing hybrid transgenic

研究代表者

楊 景堯 (YOH KEIGYOU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：90323302

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規糖尿病性腎症モデルの確立を目的に行い、インスリンの産生を制御する Maf 群タンパク質を遺伝子改変し、MafAKO/MafKTg マウスを作製した。MafAKO/MafKTg マウスは、生後より糖尿病を発症し、腎障害が進行することを確認した。また片腎摘出を行った結果、マウスモデルでは再現が困難と考えられていたヒト糖尿病性腎症の典型的な 3 つの所見（結節性病変、滲出性病変、びまん性病変）を呈し、糖尿病性腎症モデルとして有用であることを確認した。

研究成果の概要（英文）：We generated hybrid transgenic mice that were MafA-deficient and also overexpressed MafK specifically in beta cells (MafA-/-MafK+). MafA-/-MafK+ mice developed severe overt diabetes mellitus within 5 weeks old. Furthermore, after uninephrectomy, these mice demonstrated three characteristics of human diabetic nephropathy: diffuse, nodular, and exudative lesions. MafA-/-MafK+ mice might be a useful model for the analysis of human diabetic nephropathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腎臓内科学

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：糖尿病、糖尿病性腎症、Maf 群タンパク質、転写因子

1. 研究開始当初の背景

本研究では新規転写因子関連糖尿病腎症モデルの確立を研究目的としている。現在、日本の透析医療の患者数は 28 万人を越え、医療費が 1 兆円以上にのぼる。その導入原因疾患の第一位は糖尿病性腎症であり、対策が緊急に求められている。糖尿病研究では、さま

ざまなアプローチから研究が進められているが、疾患モデル、とりわけ糖尿病性腎症研究に適したモデルが求められている。Maf 群タンパク質に属する転写因子 MafA が、インスリンプロモーター領域である RIPE3b/C1 の転写制御に関与していることが知られている (PNAS 99:6737-6742, 2002; J Biol

Chem 277:49903-49910, 2002)。bZip 構造をもつ Maf 群タンパク質は大 Maf 群タンパク質と小 Maf 群タンパク質に分類され、ファミリーを構成している。大 Maf 群タンパク質は c-Maf、MafB、NRF1、MafA で構成され、小 Maf 群タンパク質は MafK、MafF、MafG で構成される。Maf 群タンパク質は二量体を形成して Maf recognition element (MARE) に結合する。大 Maf 群タンパク質はホモ二量体、または他の bZip タンパク質とヘテロ二量体を形成し、転写の促進に働く。一方、小 Maf 群タンパク質は bZip 領域で他の転写因子とヘテロダイマーを形成し転写促進に働くが、ホモダイマーを形成しているときは転写を抑制する。その中で MafA は、膵臓のランゲルハンス細胞の β 細胞に発現し、インスリン遺伝子の発現制御をしている可能性が明らかになった。代表研究者の所属研究室では Maf 群タンパク質の糖代謝における機能を明らかにする目的で、MafA ノックアウトマウス(Mol Cell Biol 25:4969-4976, 2005)、および MafK トランスジェニックマウス(BBRC 346:671-680, 2006)を作製した。MafA ノックアウトマウスは、糖負荷試験で、野生型のマウスと比較して、血中グルコース濃度の優位な上昇が認められ、高血糖が持続した。しかし、有力な糖尿病モデルマウスである MafA ノックアウトマウスの長期評価はまだ行われておらず、また、それに伴う糖尿病腎症についての検討が求められている。また、ラ氏島 β 細胞における Maf 群タンパク質の相互作用が明らかにされていないため、MafA ノックアウトマウスでは、他の Maf 群タンパク質による転写活性化の関わりが考えられていた。そのため、小 Maf 群タンパク質 MafK をインスリンプロモーターにて過剰に発現させ、ホモダイマーの形成を利用し、ドミナントネガティブ的手法によるシスエレメントターゲティングを行った MafK トランスジェニックマウスを研究代表者らは作製した(BBRC 346:671-680, 2006)。MafK トランスジェニックマウスでは、若年期に糖尿病発症を呈することが明らかになった。MafA ノックアウトマウスと MafK トランスジェニックマウスの両遺伝背景をともに持つ糖尿病マウスを作製することにより、大 Maf 群タンパク質の関与を排除した、さらに完成度の高い糖尿病モデルの作製が可能と考えられ、また、これにより生じる糖尿病性腎症の検討を通じて、新たな知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では前述のように新規転写因子関連糖尿病腎症モデルの確立を研究目的としている。MafA、MafK の遺伝子改変により、ヒト糖尿病性腎症に類似した新規糖尿病性腎

症モデルの作製が可能か否かを検証する。そして、作製したモデルマウスを用いて、糖尿病性腎症の病態解明および創薬治療への応用が本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究は以下の手順にて行った。すでに作製済みの MafA ノックアウトマウス、MafK トランスジェニックマウスの糖尿病性腎障害の評価を行った。次に MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスを作製し、同様に糖尿病性腎障害を評価した。

(1) MafA ノックアウトマウスの糖尿病性腎症の評価

①糖尿病、腎障害の評価

作製したマウスを 5 週ごとに、採血と蓄尿を行い血糖値、血清クレアチニン、尿タンパク、尿糖、血圧を測定し、腎障害を評価した。

②腎組織の評価

10 週ごとにそれぞれの群の腎臓を採取し、腎サイズ(重量)と腎組織の評価を行った。組織評価の項目として、糸球体腫大の有無(イメージング処理による糸球体面積の評価)、糸球体硬化像の有無の評価を行った。

(2) MafK トランスジェニックマウスの糖尿病性腎症の評価

上記 MafA ノックアウトマウス同様に行った。

(3) MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスの作製:MafA ノックアウトマウスと MafK トランスジェニックマウスを掛け合わせ、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスの作製し、糖尿病性腎症の評価した。

(4) MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスの片腎摘出を行い、腎障害の評価を行った。

4. 研究成果

MafA ノックアウトマウス、MafK トランスジェニックマウス、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの 4 系統の糖尿病および腎障害について評価した。

(1) 糖尿病について

MafA ノックアウトマウス、MafK トランスジェニックマウスはいずれも野生型マウスと比較し、顕著な高血糖を示すことはなかったが、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスでは、生後直後より高血糖を示し、生後 5 週以降は血糖 900mg/dL 前後を観察期間である週齢 30 週まで維持していた。また、インスリン分泌に関する検討では、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスでは膵島におけるインスリン産生細胞の著しい減少が認められた。生存率を評価したところ、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニ

ックマウスは 30 週齢での生存率が 37.5%であるのに対し、他の群は 100%であり、糖尿病による死亡率の上昇が考えられた。血糖値などのデータは以下の通り：

(*：野生型と比較し有意に上昇、 $P<0.05$)

週齢 10 週の血糖 (mg/dl) およびインスリン値 (ng/ml)：

野生型マウス (N=8)：173.0 \pm 8.2、0.93 \pm 0.09

MafK トランスジェニックマウス (N=7)：193.6 \pm 1.1、1.49 \pm 0.2*

MafA ノックアウトマウス (N=7)：167.6 \pm 8.8、0.66 \pm 0.2

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=6)：999.4 \pm 104.2*、0.28 \pm 0.10*

(2) 糖尿病性腎症について

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスは週齢 10 週の時点で、他の群と比較し血清アルブミンの低下、血清クレアチニン、尿素窒素とコレステロールの上昇が認められ、尿蛋白も有意に増加していた。観察期間の 20 週でも同様の結果であった。また 20 週齢における腎体重比を評価したところ、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスでは有意に腎肥大が確認された。

週齢 10 週、20 週の血清アルブミン (mg/dl)：

野生型マウス (N=7)：2.0 \pm 0.0、2.6 \pm 0.1

MafK トランスジェニックマウス (N=6)：2.2 \pm 0.0、2.1 \pm 0.1

MafA ノックアウトマウス (N=5)：2.4 \pm 0.1、2.2 \pm 0.1

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=5)：1.9 \pm 0.1*、1.8 \pm 0.1*

週齢 10 週、20 週の血清クレアチニン (mg/dl)：

野生型マウス (N=7)：0.35 \pm 0.01、0.34 \pm 0.04

MafK トランスジェニックマウス (N=6)：0.34 \pm 0.02、0.37 \pm 0.06

MafA ノックアウトマウス (N=5)：0.38 \pm 0.02、0.41 \pm 0.03

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=5)：0.42 \pm 0.02*、0.48 \pm 0.04*

週齢 10 週、20 週の尿素窒素 (mg/dl)：

野生型マウス (N=7)：20.6 \pm 1.1、26.3 \pm 3.5

MafK トランスジェニックマウス (N=6)：23.4 \pm 0.9、30.9 \pm 6.7

MafA ノックアウトマウス (N=5)：24.3 \pm 3.1、27.0 \pm 3.0

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=5)：39.6 \pm 3.5*、45.0 \pm 7.8*

週齢 10 週、20 週の血清コレステロール

(mg/dl)：

野生型マウス (N=7)：155.2 \pm 4.5、124.0 \pm 6.1

MafK トランスジェニックマウス (N=6)：104.0 \pm 7.7*、98.3 \pm 19.3

MafA ノックアウトマウス (N=5)：143.0 \pm 30.3、142.5 \pm 10.6

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=5)：207.8 \pm 23.8*、260.0 \pm 30.5*

週齢 10 週、20 週の尿蛋白 (mg/day)：

野生型マウス (N=7)：3.5 \pm 0.6、4.9 \pm 1.6

MafK トランスジェニックマウス (N=6)：3.7 \pm 1.0、5.7 \pm 0.8

MafA ノックアウトマウス (N=5)：4.4 \pm 1.7、3.9 \pm 1.8

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=5)：10.8 \pm 2.4*、8.8 \pm 2.3

週齢 20 週の腎体重比 (%)：

野生型マウス (N=7)：0.7 \pm 0.1

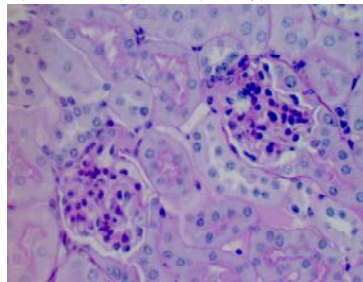
MafK トランスジェニックマウス (N=6)：0.8 \pm 0.1

MafA ノックアウトマウス (N=5)：0.8 \pm 0.1

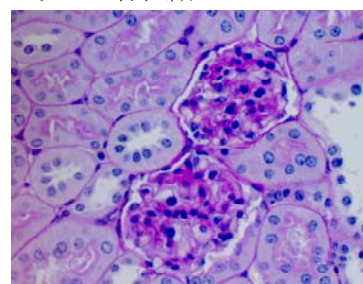
MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=5)：1.9 \pm 0.3*

腎組織については、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスでは他の群と比較し、メサンギウム領域の拡大を認めた。以上より、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスでは糖尿病性腎症が発症していることが確認された。

野生型マウス 腎組織



MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス 腎組織



さらに、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスの 8 週にて片腎摘出を行い、腎負荷を行ったところ、腎機能のさらなる増悪および顕著な腎腫大を呈した他、20 週の組織ではヒト糖尿病性腎症の典型的な像である結節性病変、滲出性病変、びまん性病変が認められた。

腎摘出後 20 週の血清クレアチニン (mg/dl) :
野生型マウス (N=3) : 0.37 ± 0.03

MafK トランスジェニックマウス (N=5) : 0.37 ± 0.02

MafA ノックアウトマウス (N=3) : 0.35 ± 0.06

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=3) : $0.52 \pm 0.04^*$

腎摘出後 20 週の腎体重比 (%) :

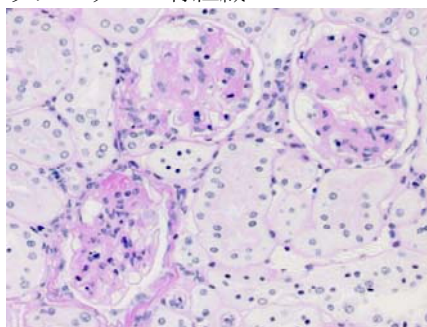
野生型マウス (N=3) : 1.1 ± 0.0

MafK トランスジェニックマウス (N=5) : 0.9 ± 0.1

MafA ノックアウトマウス (N=3) : 1.1 ± 0.1

MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス (N=3) : $2.4 \pm 0.3^*$

片腎 MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウス 腎組織



これまで、上記ヒト糖尿病性腎症の典型像はマウスでは比較的再現が困難であると考えられていた。MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスでは、重篤な糖尿病を発症するとともに、片腎モデルではヒト糖尿病性腎症の典型的な組織型を呈することが確認できた。

本研究結果より、MafA ノックアウト/MafK トランスジェニックマウスは、ヒト糖尿病性腎症を再現できる有用なマウスと考えられる。本マウスを使用し、糖尿病性腎症の発症機序の解明に役立つと考えられる。また、本マウスを用いた治療法開発も今後進めることができるため、創薬治療への貢献も期待できる。

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 1 件)

1. Shimohata H, Yoh K, Fujita A, Morito N, Ojima M, Tanaka H, Hirayama K, Kobayashi M, Kudo T, Yamagata K, Takahashi S. MafA-deficient and beta cell-specific MafK-overexpressing hybrid transgenic mice develop human-like severe diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 389(2):235-40. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 藤田亜紀子、楊 景堯、下畑誉、森戸直記、山縣邦弘 : MafAKO : MafKTg compound mouse は重篤な糖尿病性腎症を呈する、第 1 回 Advans 研究会、2009 年 12 月 26 日、名古屋
2. N. Morito, H. Shimohata, Y. Hashimoto, K. Yoh, K. Yamagata, S. Takahashi : MafA-deficient/MafK transgenic hybrid mice develop severe diabetic nephropathy, American Society of Nephrology Renal Week, 2007 年 11 月 2 日, San Francisco , USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 景堯 (YOH KEIGYOU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授

研究者番号 : 90323302

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし