

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590944

研究課題名 (和文) 転写因子 MafB による糖尿病性腎症の制御

研究課題名 (英文) Prevention of diabetic nephropathy by MafB

研究代表者

森戸 直記 (MORITO NAOKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70463825

研究成果の概要 (和文)：転写因子 MafB の糸球体上皮細胞での機能解析を行った。ネフリンとポドシンの制御領域に Maf 認識配列が存在し、ゲルシフトアッセイとレポーターアッセイにより MafB 蛋白が結合し転写活性化を行う可能性を示した。糖尿病性腎症を発症したマウスにおいてネフリンの発現低下がみられ、さらにそれらの発現を制御している MafB の発現低下もみられている。よって、腎糸球体上皮細胞に MafB を高発現させることにより糖尿病性腎症を抑制する可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：We have investigated the function of MafB in glomerular epithelial cells. By database surveillance, we have found Maf recognition element (MARE) in the regulatory region of nephrin and podocin gene. Gel mobility shift assays identified that MafB binds to the MARE of the nephrin and podocin gene. Reporter assay also showed MafB could activate the nephrin gene transcription through the MARE. The expression of MafB was decreased in murine diabetic nephropathy models, as well as the expression of nephrin. Diabetic nephropathy might be prevented by overexpression of MafB in glomerular epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：糖尿病性腎症、大 Maf 群蛋白質、糸球体上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性人工透析患者は27万人、透析にかかる医療費も1兆円を超え腎臓病の進行を予防することは、社会的、医療経済的にも性急な課題である。特に、透析導入の原因となる第一の疾患である糖尿病性腎症の治療法を開発することは医療費減少に大きく寄与する。しかしながら、糖尿病性腎症を確実に抑制する有効な治療はないのが実情である。一方、1

大 Maf 群転写因子は、レトロウイルス AS42 から単離された癌遺伝子 v-maf の細胞関連遺伝子であり、ヒトとマウスではこれまでに MafA, MafB, c-Maf, Nrl の4種類が同定されている。大 Maf 群転写因子は、その N 末端側に転写活性化能を有する酸性ドメインを持ち、これを持たない小 Maf 群転写因子とは区別される。また C 末端側には塩基性ドメインとロイシンジッパードメインからなる bZIP ドメインを持っており、この bZIP ドメインを介してホモダイマーやヘテロダイマーを形成し、Maf 認識配列(MARE)へと結合することによって遺伝子発現を制御している。

我々は、糸球体上皮細胞に発現する大 Maf 群転写因子である MafB に着目し、MafB ノックアウトマウスを作製した(Mol. Cell. Biol. 26: 5715-5727, 2006)。このマウスは足突起が癒合するというユニークな糸球体上皮細胞の発生異常を呈した。さらに糸球体上皮細胞に発現する種々の分子の発現を調べたところ、ネフリン、ポドシン、CD2AP といった糸球体上皮細胞足突起構成分子の発現が劇的に減少していた。

本研究では転写因子 MafB の糸球体上皮細胞での機能を明らかとし、糖尿病性腎症の進行防御にどのように関わっているかを

解明することである。さらに将来的には、MafB を制御することにより糖尿病性腎症を治療可能となるような創薬につなげるのが最終的な目標である。

2. 研究の目的

(i) 転写因子 MafB の糸球体上皮細胞での機能解析を行い、さらに (ii) 糖尿病性腎症における MafB の機能を明らかにすることである。これにより、MafB が新規の糖尿病性腎症の治療ターゲットとなる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) データベース上でネフリン、ポドシン遺伝子の制御領域を調べ Maf 認識配列(MARE)があるかどうかを調べる。

(2) ゲルシフトアッセイ

ネフリンとポドシンの制御領域に MafB 蛋白が結合するかどうか、ゲルシフトアッセイを用いて証明する。

(3) レポーターアッセイ

ネフリンとポドシンの制御領域にルシフェラーゼの結合した構築を作製する。それを細胞にトランスフェクションした後、MafB を細胞に共発現することによってレポーター蛋白の発現が上昇するかどうかを検討する。また、ネフリンとポドシンの Maf 認識配列(MARE)を除いた構築、変異を加えた構築を作製し、レポーター蛋白の発現への影響をみる。

(4) MafB トランスジェニックマウスの作製

ネフリンプロモーターを用いて腎糸球体上皮細胞に MafB を過剰発現させたマウスを作製する。それらのマウスに STZ (ストレプトゾトシン) による糖尿病を誘導し、糸球体上皮細胞における MafB 過剰発現により糖尿病性腎症が抑制されるかを観察する。

4. 研究成果

(1) データベース上でネフリン、ポドシン遺

伝子の制御領域を調べてみたところ、ヒト、マウス間で高度に保存された領域を発見した。その領域には MafB の結合しうる Maf 認識配列(MARE)が含まれていた。これは MafB が直接ネフリン、ポドシンの発現制御をしている可能性を示唆した。

(2)ゲルシフトアッセイ

上記の MARE を用いたゲルシフトアッセイにより MafB がネフリン、ポドシンの制御領域 MARE に結合する可能性が示された。

(3)レポーターアッセイ

上記の MARE を用いたルシフェラーゼアッセイにより MafB が同部位に結合し転写を活性化する可能性が示された。

(4)MafB トランスジェニックマウスへの STZ 糖尿病の誘導ネフリンプロモーターを用いて腎糸球体上皮細胞に MafB を過剰発現させたマウスを作製し STZ による糖尿病を誘導した。MafB 過剰発現により糖尿病性腎症の発症の抑制に寄与するかどうか解析を行っている。

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)

1: Morito N, Yoh K, Maeda A, Nakano T, Fujita A, Kusakabe M, Hamada M, Kudo T, Yamagata K, Takahashi S. A novel transgenic mouse model of the human multiple myeloma chromosomal translocation t(14;16)(q32;q23). *Cancer Res.* 2011 15;71(2):339-48. 査読有

2: Sakai K, Morito N, Usui J, Hagiwara M, Hiwataishi A, Fukuda K, Nanmoku T, Toda T, Matsui N, Nagata M, Yamagata K. Focal segmental glomerulosclerosis as a complication of hepatitis B virus

infection. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Jan;26(1):371-3. 査読有

3: Baudino L, Yoshinobu K, Morito N, Santiago-Raber ML, Izui S. Role of endogenous retroviruses in murine SLE. *Autoimmun Rev.* 2010;10(1):27-34. 査読有

4: 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 13;389:235-40. 査読有

5: Yoshinobu K, Baudino L, Santiago-Raber ML, Morito N, Dunand-Sauthier I, Morley BJ, Evans LH, Izui S. Selective up-regulation of intact, but not defective env RNAs of endogenous modified polytropic retrovirus by the Sgp3 locus of lupus-prone mice. *J Immunol.* 2009 15;182(12):8094-103. 査読有

6: Shimohata H, Yamada A, Yoh K, Ishizaki K, Morito N, Yamagata K, Takahashi S.

Overexpression of T-bet in T cells accelerates autoimmune glomerulonephritis in mice with a dominant Th1 background. *J Nephrol.* 2009 22:123-9. 査読有

7: Sakai K, Usui J, Kai H, Hagiwara M, Morito N, Saito C, Yoh K, Tsuruoka S, Hirayama K, Aita K, Nagata M, Yamagata K. Secondary membranous glomerulonephritis associated with recipient residual lymphoma cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Exp Nephrol.* 2009 13:174-8. 査読有

8: Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi S, Morito N,

Nakano T, Ojima M, Shimohata H, Itoh K, Takahashi S, Yamamoto M. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. Genes Cells. 2008;13(11):1159-70. 査読有

9: Baudino L, Yoshinobu K, Morito N,

Kikuchi S, Fossati-Jimack L, Morley BJ, Vyse TJ, Hirose S, Jørgensen TN, Tucker RM, Roark CL, Kotzin BL, Evans LH, Izui S.

Dissection of genetic mechanisms governing the expression of serum retroviral gp70 implicated in murine lupus nephritis. J Immunol. 2008

15;181(4):2846-54. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Morito N, Yoh K, Fujita A, Yamagata K, Takahashi S: New murine model of renal involvement in multiple myeloma ; World Congress of Nephrology (Milan, Italy), 23 May 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.tsukuba-kidney.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森戸 直記 (MORITO NAOKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号 : 70463825

(2) 研究分担者

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