

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09241

研究課題名(和文) 転写因子異常による巣状糸球体硬化症発症機序の解明

研究課題名(英文) The role of MafB in CKD.

研究代表者

森戸 直記 (Morito, Naoki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70463825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MAFBは糸球体上皮細胞(podocyte)に発現しており、その変異が糸球体上皮細胞障害をきたす可能性が考えられるが、その証明はなされていない。MafB^{-/-}マウスは生後すぐ死んでしまうため、MafB^{+/-}マウスを長期間観察し、野生型マウスと比較した。MafB^{+/-}マウスは25週齢では蛋白尿はみられないが50週齢を超えた頃から、蛋白尿を呈した。電子顕微鏡写真では糸球体上皮細胞足突起の癒合を認めた。また、RT-PCRでは足突起関連分子の発現低下を認めた。以上からMafBは糸球体上皮細胞の維持に重要であり、そのハプロ不全は糸球体上皮細胞障害をきたし蛋白尿を呈した。

研究成果の概要(英文)：Analysis of MafB deficient (MafB^{-/-}) mice revealed that MafB is essential for podocyte differentiation and its foot process formation. However, the role of MafB in adult kidneys was not well known. Because MafB^{-/-} mice die during the perinatal period, we used MafB heterozygote (MafB^{+/-}) mice in this study. We found that MafB^{+/-} mice developed overt albuminuria at 50 week-old of age. By the electron microscopy analysis, we observed podocyte foot process effacement in MafB^{+/-} mice. RT-PCR analysis revealed the Nephron and Podocin glomerular expressions were decreased in MafB^{+/-} mice compared to wild-type animals. We exploited transgenic mice expressing MafB in podocytes using Nephron promoter (NPHS1-MafB TG mice). We found that the NPHS1 MafB transgene successfully restored MafB mice to normal albuminuria at 50 week-old of age. Conclusions: MafB is essential for the maintenance of podocytes. MafB could be a therapeutic target in chronic kidney disease.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糸球体上皮細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

大 Maf 群転写因子は、ほ乳類において MafA、MafB、c-Maf、Nrl の 4 種類が知られている。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; maf recognition element) へと結合することによって遺伝子発現を制御している。そのひとつである MafB は膵内分泌細胞の発生、内耳の形成、マクロファージの機能分化に重要であることが報告されている。MafB ノックアウト (MafB ^{-/-}) マウスの解析から、MafB は腎臓で糸球体上皮細胞のみに特異的に発現し、糸球体上皮細胞の成熟、足突起の形成に必須であることが分かった (Mol. Cell. Biol. 26: 5715-5727, 2006)。しかし、MafB ^{-/-} マウスは中枢性呼吸不全で生後すぐ死んでしまうため、成体での機能解析は困難であった。

最近のエクソーム解析から、MCTO (Multicentric Carpotarsal Osteolysis; 多中心性手根足根骨溶解症) の患者に、MAFB の点変異が存在することが報告された (Am J Hum Genet. 2012; 90:494-501)。MCTO の骨病変は破骨細胞における MAFB の機能不全が考えられているが、興味深いことに MCTO は半数以上の例で腎機能障害をきたし蛋白尿の出現から 1 年から 17 年で腎不全に至る。腎生検をしえた例では巣状糸球体硬化症の報告例がある (Am J Kidney Dis. 2007; 50:649-654)。一方、家族歴を示す巣状糸球体硬化症では糸球体上皮細胞に発現する種々の遺伝子の変異、欠損が報告されている事実から糸球体上皮細胞障害が巣状糸球体硬化症をもたらすという説が受け入

られている。これらの事実から MafB は成体でも糸球体上皮細胞の維持に必須である可能性が高いと推測した。

2. 研究の目的

MafB の発現は、腎発生期のみならず、成体の糸球体上皮細胞でもその発現は続いている。しかし、成体での MafB の機能は不明であった。そこで MafB の機能を明らかにし、巣状糸球体硬化症をはじめとした慢性腎臓病における MafB の役割を解明することが研究の目的である。これらの解明から MafB が慢性腎臓病の治療ターゲットとなる可能性がある。

3. 研究の方法

巣状糸球体硬化症をはじめとした種々の慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症など、慢性腎臓病の MAFB の免疫染色を行った。あわせて糸球体上皮細胞特異的転写因子の一つである WT1 の免疫染色も行い、糸球体上皮細胞での MAFB の発現を評価した。

MafB^{+/-} マウスの解析 (MafBハプロ不全が糸球体上皮細胞障害を来すかどうか)

MafB^{+/-} マウスの尿タンパク量、血清クレアチニン、尿素窒素などを測定した。腎組織評価もあわせて行った。予備実験では MafB^{+/-} マウスは 50 週齢で尿タンパクがみられたが、糸球体上皮細胞以外の MafB 欠損の影響も否定できない。そこで MafB^{+/-} マウスに糸球体上皮細胞特異的 MafB トランスジェニックマウス (Nephrin Promoter MafB TG マウス) をかけ合わせることで MafB の発現を補い、尿タンパクの出現が rescue されるかどうかの確認を行った。

4. 研究成果

慢性腎臓病の腎生検検体における MAFB および WT1 で免疫染色を、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症、IgA 腎

症、糖尿病性腎症間で行い、比較を行った。糸球体における MAFB 陽性細胞数は、巣状糸球体硬化症と糖尿病性腎症で有意に減少が認められた。さらに、WT 1 陽性細胞を糸球体上皮細胞として補正すると、糸球体上皮細胞での MAFB 発現は巣状糸球体硬化症でのみ、有意に他の腎疾患群と比べ減少していた。これは、巣状糸球体硬化症発症が MAFB 低下と関わっている可能性が考えられた。糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞障害はその脱落が多いため、MAFB 発現細胞の低下は糸球体上皮細胞の減少を反映したものと考えられた。

MafB +/- マウスは 25 週齢では蛋白尿はみられないが、50 週齢を超えた頃から、蛋白尿を呈した。光学顕微鏡での腎の組織変化は乏しかったが、50 週齢の MafB +/- マウスの腎電子顕微鏡写真では糸球体上皮細胞の足突起の癒合を認めた。また、野生型マウスと比較すると腎臓の RT-PCR では Nphs1(Nephrin)、Nphs2(Podocin)などの糸球体上皮細胞足突起関連分子の発現低下を認めた。一方、MafB +/- マウスに Nephrin Promoter MafB TG マウス) をかけ合わせた MafB +/-:: Nephrin Promoter MafB TG マウスにおいては蛋白尿を呈さず、腎電子顕微鏡写真でも所見はみられなかった。以上の結果から、MafB は podocyte の維持に必要であり、そのハプロ不全は podocyte 障害をきたし蛋白尿を呈した。

【結論】MafB は糸球体上皮細胞の維持に必須であり、その発現低下は蛋白尿をきたし巣状糸球体硬化症をはじめとした慢性腎臓病の原因となりうる。また、それが治療のターゲットになる可能性がある。

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 3 件)

(1) Morito N, Yoh K, Usui T, Oishi H, Ojima M, Fujita A, Koshida R, Shawki HH, Hamada M, Muratani M, Yamagata K, Takahashi S. Transcription factor MafB may play an important role in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2018;93(1):54-68.doi:10.1016/j.kint.2017.06.023.(査読有り)

(2) Usui T, Kai H, Noguchi K, Morito N, Usui J, Saito C, Uesugi N, Nagata M, Yamagata K. Effectiveness of Plasmapheresis in a Patient with Anti-glomerular Basement Membrane Antibody Glomerulonephritis with Advanced Kidney Dysfunction. *Intern Med.* 2017 Sep 15;56(18):2475-2479. doi: 10.2169/internalmedicine.8571-16. (査読有り)

(3) Kai H, Shinozaki Y, Nishikubo A, Watanabe M, Tawara T, Iwase M, Tsunoda R, Moriyama N, Usui T, Kawamura T, Nagai K, Hagiwara M, Saito C, Morito N, Usui J, Yamagata K. Two autosomal dominant polycystic kidney (ADPKD) cases with advanced renal dysfunction, effectively treated with tolvaptan. *CEN Case Rep.* 2016;5(1):87-90.doi:10.1007/s13730-015-0198-6.(査読有り)

〔 学会発表 〕 (計 6 件)

1, Usui T, Morito N, Hamada M, Takahashi S, Yamagata K. The transcription factor MafB is essential for the maintenance of podocytes. *ISN Frontiers Meetings 2018*, Tokyo (2018 年 2 月 22 日 -25 日)

2, Usui T, Morito N, Hamada M, Fujita A, Yoh K, Yokoi H, Kasahara M, Usui J, Takahashi S, Yamagata K. MAFB IS ESSENTIAL FOR THE MAINTENANCE OF PODOCYTES IN BOTH MICE AND HUMANS. 54th ERA-EDTA Congress Madrid, SPAIN (2017年6月2日-5日)

3, Morito N, Usui T, Yoh K, Takahashi S, Yamagata K. MAFB MUTANT SHOWS PODOCYTE INJURY WITH AGING. 53rd ERA-EDTA Congress Vienna, AUSTRIA. (2016年5月21日-24日)

4, 巣状分節性糸球体硬化症発症における MafB の役割 臼井俊明、森戸直記、横井秀基、笠原正登、藤田亜紀子、楊川堯基、臼井丈一、高橋智、山縣邦弘 第60回日本腎臓学会学術総会 仙台(2017年5月26日-28日)

5, 転写因子 MafB による副甲状腺ホルモンの制御 森戸直記、臼井俊明、藤田亜紀子、楊景堯、山縣邦弘 第59回日本腎臓学会学術総会 横浜 (2016年6月17日-19日)

6, 転写因子 Mafb のハプロ不全は podocyte 障害をもたらす。 森戸直記、楊景堯、臼井俊明、藤田亜希子、山縣邦弘 第58回日本腎臓学会学術総会 名古屋 (2015年6月5日-7日)

〔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・医学医療系・講師

研究者番号：20590944

(4)研究協力者

臼井 俊明 (USUI, TOSHIAKI)

筑波大学・医学医療系・講師