

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04594

研究課題名(和文)オルガネラ局在水チャネル機能阻害による腎障害発症機序のシステム生物学を用いた解析

研究課題名(英文) Systems biology analysis of the pathogenesis of kidney injury caused by deficiency of a water channel protein localized in the endoplasmic reticulum

研究代表者

池田 正浩 (Ikeda, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60281218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：オルガネラ(小胞体)に局在するアクアポリン-11(AQP11)の機能阻害は、腎障害を発症する。しかし、この腎障害発症メカニズムは不明のままである。本研究では、この障害メカニズムを明らかにする目的で、AQP11ノックアウトマウスなどの腎臓をsystems biology解析によって調べた。その結果、AQP11ノックアウトにより、NADPH oxidase 2 (NOX2) - 酸化ストレス - アポトーシスの経路を介して障害が生じる可能性を発見した。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin-11 (AQP11), a member of a family of transmembrane channel proteins, is known to be localized in the endoplasmic reticulum. So far, studies with AQP11-deficient mice have suggested that loss of function of AQP11 caused kidney injury, characterized by formation of cysts. However, the mechanism underlying the kidney injury remains unclear. In this study, in order to clarify the mechanism, we examined the kidneys from AQP11-deficient mice using systems biology. Finally, we found that the pathway of NADPH oxidase 2 (NOX2) - reactive oxygen species - apoptosis might be involved in the AQP11-deficient-induced kidney injury.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：アクアポリン-11 systems biology 小胞体 NOX2 酸化ストレス アポトーシス

1 . 研究開始当初の背景

脂質二重膜である生体膜を水分子が透過するチャネルとして同定されたアキュアポリン (aquaporin , 以下 AQP とする) は , 現在までに 13 種類 (AQP0 ~ AQP12) が哺乳動物において知られている . ほとんどの AQP ファミリー分子は細胞膜に局在して , 水や中性分子を細胞内外へ輸送する機能を持つ . 哺乳動物の AQP の中で申請者のグループは AQP11 を世界に先駆けて発見した (文献) . この AQP11 は他の AQP 分子とは異なり , 細胞膜ではなく , 細胞内 , 特に小胞体に局在するというユニークな性質を持っていた . そして , AQP11 ノックアウトマウスにおいて , 誕生時には正常であるが , 乳児期において腎嚢胞が形成され , ほとんどの個体が生後 4 週間以内に死亡することを観察した . 以上から , AQP11 はオルガネラ局在型水チャネル分子で , 生後の腎の発達に必須なものであることが考えられる . しかし AQP11 が , どのような分子と関連しながら腎の正常な発達を支えている , その破綻がどうして腎障害発症に結びつくのかについては不明のままである .

網羅的解析技術としてオミクステクノロジーが開発され , この技術により様々な分子の機能解明とその機能破綻による病態発症機序の理解が飛躍的に進むことが期待された . しかしこれまでに , 思ったような成果は得られていない . この原因の一つは , オミクステクノロジー解析の結果が , 遺伝子やタンパク質の発現パターンの差を単に羅列するだけの情報しか与えてくれないために , 分子間の因果関係が不明瞭なことにある . 2007 年に , Chuang 等は , この問題を systems biology (システム生物学) 手法によって解決できる可能性を報告した (文献) . この手法を用いると , 分子間ネットワークが明確になるため , オミクステクノロジーの問題点が解決される .

2 . 研究の目的

本研究では , AQP11 機能阻害による腎障害発症メカニズムを解明することを目的とする . この目的を達成するために , 我々の研究室で確立してきた網羅的タンパク質・遺伝子解析技術と分子間ネットワーク解析技術とを組み合わせた systems biology 手法により , AQP11 ノックアウトマウスなどを解析する .

3 . 研究の方法

宮崎大学で行う動物実験については , すべて宮崎大学動物実験委員会の承認を得て実施した .

用いた動物は , AQP11 ノックアウトマウスおよび DBA/2FG-*pcy* マウスで , コントロール動物としては , AQP11 ノックアウトマウスの場合には同腹子の野生型を , DBA/2FG-*pcy* マウスの場合には DBA マウスをそれぞれ用いた . 本研究では , 腎嚢胞形成が顕著となる動物を解析した . すなわち , AQP11 ノックアウト動物では主として 4 週令を , DBA/2FG-*pcy* マウスでは 20 週令の動物をそれぞれ解析した .

本研究における実験項目は大きく 2 つに分けられる . すなわち , (1) systems biology 解析と (2) 実証研究の 2 つである . 最終的には , これらの結果に基づいて総合的に考察して , AQP11 機能阻害による腎障害発症メカニズムを理解することを試みた .

(1) の研究は , 次のように行った . まず , 対象動物の腎から核酸などを抽出して , アレイ解析 (Taqman Custom Arrays-Mouse , Applied Biosystems , Foster City , CA) やリアルタイム PCR 解析を行った . その後 , それらの結果を , コントロール動物の結果と比較しながら , 変化の度合い , 有意性などの観点から遺伝子を選択した . 選択した遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis® (IPA) (QIAGEN Redwood city , www.qiagen.com/ingenuity) を用いて , 障害に關与する分子経路のカテゴリー候補を

抽出した。そしてその妥当性について、以下の(2)の実験で検証した。

(2)については、(1)の結果を踏まえて、実験方法を選別して行った。実験手技としては、ウェスタンブロット法や免疫組織化学などの手法を用いた。

以上の解析に用いた抗体やキットの主なものは次の通りである：抗 NADPH oxidase 2 (NOX2) 抗体, #sc-130543, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 抗 IBA1 抗体, #PA527436, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; 抗 α -tubulin 抗体, #T5168, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO; タンパク質のカルボニル化, #ROIK03, SHIMA Laboratories, Tokyo, Japan; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), #N45.1, JaiCA, Shizuoka, Japan.

4. 研究成果

(1) systems biology 解析

本研究を開始する時点で、AQP11 と直接あるいは間接的に結合するタンパク質として 322 種類のタンパク質を同定していた。そして、同定した 322 種類のタンパク質を機能カテゴリーごとに整理すると、カテゴリーに含まれる分子の種類が多いものとして、1) トランスポーター関連タンパク質、2) 細胞周期、3) アポトーシス、4) タンパク質合成などがリストアップされた。AQP11 が物質輸送体であることを考えれば、1) のカテゴリーが上位に来ることは妥当であるように思われる。一方で、それ以外のカテゴリーからは、AQP11 が単純に物質輸送体として機能するだけでなく、他のタンパク質などと複合体を作り、細胞の生存や死を調節することが強く示唆される。そこで、細胞の生存にかかわるような遺伝子に着目して、AQP11 ノックアウトマウスの腎において、コントロール動物と比べて変化する遺伝子を、トランスクリプトーム解析(酸化ストレス、低酸素、アポトーシス

などの関連遺伝子)によって調べた。そして、その結果において2倍以上変化した 35 遺伝子を用いて、IPA による systems biology 解析を行った。その結果を表1に示す。表から明らかのように、AQP11 の機能が阻害されると、酸素ホメオスターシスに直接関連するカテゴリーが変化することが分かった。

表1. 抽出されたカテゴリー

カテゴリー	-log(p-value)
低酸素シグナリング(心血管系)	8.92
HIF1 シグナリング	7.64
関節炎経路	7.55
がん分子メカニズム	5.87
Aryl Hydrocarbon 受容体シグナリング	5.61
異物代謝シグナリング	5.39
腎がんシグナリング	5.11
肝線維化	5.09
Endothelin-1 シグナリング	4.89
膵がんシグナリング	4.52
NRF2 介在性酸化ストレス反応	3.72
マクロファージにおける NO, 活性酸素産生	3.66
白血球遊走シグナリング	3.52
Protein Kinase A シグナリング	3.48
VEGF シグナリング	3.24

赤字は酸素ホメオスターシスに関連するカテゴリー。

さらに、これら 35 種の中で特に変化量が大きかった上位 4 遺伝子が、p47phox (44 倍)、p40phox (33 倍)、Nox2 (23 倍)、p67phox (15 倍)であった。これらの遺伝子翻訳物(タンパク質)は、複合体を作り、活性酸素種を生成することが知られている(文献)。

以上の結果を踏まえて、AQP11 の機能阻害により、NOX2 - 酸化ストレス - アポトーシスの経路が活性化しており、この活性化が腎障害に重要であることが考えられた。次に、この仮説について、以下の検証実験を行った。

(2) 実証研究

NOX2 遺伝子の増加がタンパク質レベルで見られるかどうかについて、ウェスタンブロッ

ト法及び免疫組織化学の手法で調べた。その結果、AQP11 ノックアウトマウスの腎において、NOX2 タンパク質の発現量が腎間質で増加していることを見出した。

次に、NOX2 経路が活性化すると、活性酸素種の産生が亢進することが考えられる。そこで、AQP11 ノックアウトマウスの腎において実際に活性酸素種の産生が亢進しているかどうかについて、タンパク質のカルボニル化を指標に検討した。その結果、AQP11 ノックアウトマウスの腎においてタンパク質のカルボニル化が亢進していることが分かった。次に活性酸素産生が亢進していた部位を明らかにする目的で、抗 8-OHdG 抗体を用いて、免疫組織化学を行った。その結果、主として腎の間質において 8-OHdG 陽性細胞が見られた。以上から、AQP11 ノックアウトマウスの腎において、NOX2 活性化 - 酸化ストレス亢進が生じていることが分かった。

元来、NOX2 の腎での発現量は少ないことが知られている。また、systems biology 解析の結果、腎に浸潤したマクロファージが NOX2 発現増加をもたらした可能性が示唆されている。そこで、AQP11 ノックアウトマウスの腎においてマクロファージの浸潤がみられるかどうかについて検討した。マクロファージマーカーである IBA1 の特異抗体を用いて調べたところ、AQP11 ノックアウトマウスの腎間質において、IBA1 陽性細胞数の増加が観察された。

活性酸素種の増加は、アポトーシスをもたらす。そこで、AQP11 ノックアウトマウスの腎において、アポトーシスが亢進していたかどうかを、DNA の断片化を指標に調べた。その結果、コントロールマウスと比べて、AQP11 ノックアウトマウスの腎において、顕著な DNA 断片化陽性細胞数の増加が観察された。

DBA/2FG-psy マウスは、Aqp11 以外の Nphp3 遺伝子の変異による嚢胞腎発症マウス

である。世界的にも嚢胞腎のモデル動物として治療薬開発研究などに用いられている（文献）。このマウスにおいても、AQP11 ノックアウトマウスと同様に NOX2 - 酸化ストレス - アポトーシスの経路による腎障害が見られるのかどうかについて検討した。その結果、DBA/2FG-psy マウスでは、腎嚢胞が著明に形成され、腎機能障害が見られる週令において、p47phox (29 倍)、p40phox (26 倍)、Nox2 (6 倍)、p67phox (6 倍) の発現量が著しく増加していた。また、DBA/2FG-psy マウスの腎において、NOX2 タンパク質の発現量が間質で増加していることを確認した。この DBA/2FG-psy マウスの主として腎間質において、タンパク質のカルボニル化の増加、8-OHdG 陽性細胞数の増加も観察された。さらに IBA1 陽性細胞数の増加、および DNA 断片化陽性細胞数も増加していた。以上から、DBA/2FG-psy マウスの腎においても NOX2 活性化 - 酸化ストレス亢進 - アポトーシス誘導が生じていることが考えられた。

以上をまとめたものを図 1 に示す。AQP11 ノックアウトにより、NOX2 - 酸化ストレス - アポトーシスの経路が活性化して障害が生じる可能性、そしてこの経路の活性化は Nphp3 遺伝子の変異によっても見られることが分かった。おそらくこれらの経路は、Aqp11 や Nphp3 遺伝子に変異が生じると、腎にマク

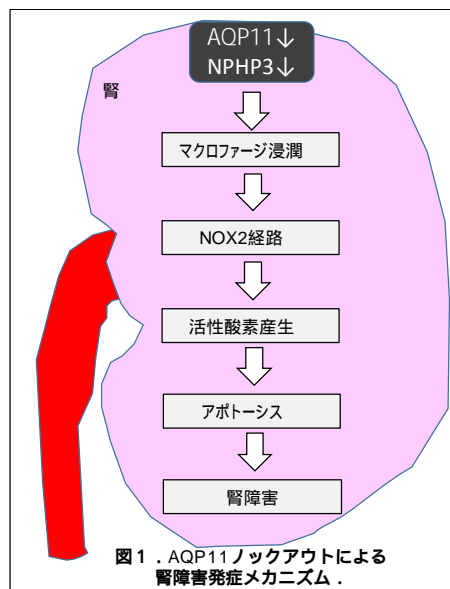


図 1 . AQP11 ノックアウトによる腎障害発症メカニズム。

ロファージが浸潤してもたらされることも考えられた。これらのことより、AQP11は酸化ストレスを適切に調節して、腎の生後の正常な発達に関与しており、その破綻が腎障害をもたらすと言える。今後においては、マクロファージの関与をより明確にすること、また、マクロファージの浸潤機序などを明らかにする必要がある。

<引用文献>

Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol* 25: 7770-7779, 2005.

Chuang HY, Lee E, Liu YT, Lee D, Ideker T. Network-based classification of breast cancer metastasis. *Mol Syst Biol* 3: 140, 2007.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313, 2007.

Aihara M, Fujiki H, Mizuguchi H, Hattori K, Ohmoto K, Ishikawa M, Nagano K, Yamamura Y. Tolvaptan delays the onset of end-stage renal disease in a polycystic kidney disease model by suppressing increases in kidney volume and renal injury. *J Pharmacol Exp Ther* 349: 258-267, 2014.

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4件)

Asvapromtada S, Sonoda H, Kinouchi

M, Oshikawa S, Takahashi S, Hoshino Y, Sinlapadeelerdkul T, Yokota-Ikeda N, Matsuzaki T, Ikeda M. Characterization of urinary exosomal release of aquaporin-1 and -2 after renal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F584-F601, 2018. 査読有

Oshikawa S, Sonoda H, Ikeda M. Aquaporins in urinary extracellular vesicles (exosomes). *Int J Mol Sci* 17: pii: E957, 2016. 査読有

Abdeen A, Sonoda H, Oshikawa S, Hoshino Y, Kondo H, Ikeda M. Acetazolamide enhances the release of urinary exosomal aquaporin-1. *Nephrol Dial Transplant* 31: 1623-1632, 2016. 査読有

Kaneko Y, Torisu S, Kobayashi T, Mizutani S, Tsuzuki N, Sonoda H, Ikeda M, Naganobu K. Arterial blood gas anomaly in canine hepatobiliary disease. *J Vet Med Sci* 77: 1633-1638, 2016. 査読有

[学会発表](計9件)

Moeko Koga, Ayaka Kato, Hiroko Sonoda, Sayaka Oshikawa, and Masahiro Ikeda: Endoplasmic reticulum stress induces aminoaciduria. American Society of Nephrology 51st Annual Meeting, Nov. 4, 2017, New Orleans, LA.

星野雄也, 古賀萌子, 三小田伸之, 園田紘子, 池田正浩: 2種類の嚢胞腎モデルマウスにおけるシステムズバイオロジーを用いた腎障害発症メカニズムの推定. 第160回日本獣医学会, 2017年9月13日, 鹿児島.

星野雄也, 古賀萌子, 喜舎場愛, 三小田伸之, 園田紘子, 池田正浩: ネフロン癆モデル動物の腎における低酸素および酸化ストレスに関連した病態発症メカニズムの検討. 第60回日本腎臓学会学術総会, 2017年5月27日, 仙台.

星野雄也, 古賀萌子, 喜舎場愛, 三小田伸之, 園田紘子, **池田正浩**: Investigation of molecules concerning the oxidative stress condition in animal models of polycystic kidney disease (PKD). 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 15 日, 長崎.

星野雄也, 古賀萌子, 喜舎場愛, 三小田伸之, 園田紘子, **池田正浩**: 多発性嚢胞腎モデルマウスを用いた酸化ストレスに関連した病態発症メカニズムの検討. 第 9 回トランスポーター研究会九州部会, 2016 年 10 月 1 日, 宮崎.

三小田伸之, 園田紘子, 押川さやか, **池田正浩**: 嚢胞腎モデルマウスにおける尿濃縮能低下メカニズムに関する検討. 第 67 回日本薬理学会西南部会, 2015 年 11 月 21 日, 下関.

池田正浩, 星野雄也, 園田紘子: 小胞体膜に局在するアクアポリン-11 機能に関するシステム生物学による解析. 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2015 年 11 月 20 日, 熊本.

Yuya Hoshino, Hiroko Sonoda, Kenichi Ishibashi and **Masahiro Ikeda**: Involvement of NADPH oxidase 2 in the kidney injury of aquaporin-11 KO mouse. American Society of Nephrology 49th Annual Meeting, Nov. 5, 2015, San Diego, CA.

星野雄也, 園田紘子, 石橋賢一, **池田正浩**: アクアポリン 11 欠損による多発性嚢胞腎における酸化ストレスの関与についての検討. 第 158 回日本獣医学会, 2015 年 9 月 7 日, 十和田.

〔図書〕(計 1 件)

園田紘子・**池田正浩**, 尿中細胞外小胞(エクソソーム)と腎疾患. 生体の科学 67: 406-407, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ

(<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/VetPharmacol/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正浩 (IKEDA, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 60281218

(2) 研究協力者

石橋 賢一 (ISHIBASHI, Kenichi),

松崎 利行 (MATSUZAKI, Toshiyuki),

園田 紘子 (SONODA, Hiroko),

池田 直子 (YOKOTA-IKEDA, Naoko)

永延 清和 (NAGANOBU, Kiyokazu),

鳥巢 至道 (TORISU, Shidow),

金子 泰之 (KANEKO, Yasuyuki),

高橋 早樹 (TAKAHASHI, Saki),

押川 さやか (OSHIKAWA, Sayaka),

三小田 伸之 (MIKODA, Nobuyuki),

ASVAPROMTADA Siree,

星野 雄也 (HOSHINO, Yuya),

SINLAPADEELERDKUL, Thitaporn,

加藤 綾華 (KATO, Ayaka),

木内 みなみ (KINOUCHI, Minami),

古賀 萌子 (KOGA, Moeko),

喜舎場 愛 (KISHABA, Ai)