

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07763

研究課題名(和文) イヌ尿管上皮細胞のStat1による三次元管腔形成の制御

研究課題名(英文) Regulation of three dimensional formation of renal tubule by Stat1

研究代表者

新井 克彦 (Arai, Katsuhiko)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：60175940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ尿管上皮由来MDCK細胞を用い、転写因子Stat1の三次元培養下での管腔形成に及ぼす作用について、野生型(wt)並びにドミナントネガティブ型(dn) Stat1を安定発現するMDCK株を用いて検討したところ、wt型並びにdn型Stat1安定発現MDCK株の管腔形成について検討したところ、wt-MDCKでは、腎特異的カドヘリン16の発現を上昇させた細い管腔の形成が促進されたが、dn-MDCKでは拡張型の異常管腔が観察された。

研究成果の概要(英文)：Effect of wild-type or dominant negative form of Stat1 on tubule formation of canine renal epithelial cell-derived MDCK cells was examined. Wild-type Stat1 upregulated expression of kidney-specific cadherin 16 and induced formation of rigid and narrow tubule, while dominant negative Stat1-transfectant formed dilated and thin-walled tubule.

研究分野：獣医生化学

キーワード：尿管上皮 Stat1 MDCK カドヘリン16

1. 研究開始当初の背景

イヌ等で発生する嚢胞性腎疾患(嚢胞腎)は、腎臓に嚢胞を形成し徐々に嚢胞が拡大していくことで腎組織を圧迫し慢性腎臓病の原因となり、その素因として尿細管の形成異常があるが詳細は不明である。一方、ヒトで見られる多発性嚢胞腎では、尿細管上皮と細胞外マトリックスとの相互作用の異常により嚢胞が形成されるとされ、matrix metalloproteinase-9をはじめとするマトリックス代謝酵素の上昇が報告されている。イヌ腎尿細管上皮細胞由来細胞株 MDCK はコラーゲンゲル内で培養を行うことにより管腔構造が形成され、HGF 存在下でその管腔形成は Stat1 依存性に促進されることが報告されており、さらに最近、尿細管上皮細胞の肥大に関わる分子として Slp2-a が同定され、嚢胞腎との関連性が提起されたが、尿細管上皮と細胞外マトリックスとの相互作用の異常の観点から管腔形成における Stat1 の機能を検討した研究は無い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Stat1 を制御した MDCK 細胞株を用いて、三次元細胞培養系により形態の異なる腎尿細管を作製することにより、腎尿細管に関する動物実験代替モデルを提供することであり、この研究成果は近年開発中の iPS 細胞からの分化細胞の誘導法や iPS 細胞由来分化細胞を用いた薬剤スクリーニングへも貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イヌ・CDH16 遺伝子上の Stat1 制御領域の同定

イヌ・CDH16 ゲノムの転写開始点の上流 2 キロベースから第 2 イントロンまでの Stat1 結合領域を含むの遺伝子断片を、MDCK 細胞より調製したゲノム DNA を鋳型とした LA-PCR により増幅する。

増幅した断片は pGL4-luc ベクターにサブクローニングし、このコンストラクトを元に推定された Stat1 結合領域を含む様々なデリベーション・ミュータントを作製した後に MDCK 細胞株にトランスフェクションし、HGF 添加後のルシフェラーゼ活性を測定することで、CDH16 遺伝子制御領域上の Stat1 制御領域を推定し、EMSA および ChIP により結合領域を特定する。

(2) Stat1-Tet-On および Tet-Off MDCK 安定発現株の樹立

テトラサイクリン調節ベクター (pTet-On 或いは pTet-Off) を MDCK 細胞にトランスフェクションし、G418 により選択し Tet-On および Tet-Off MDCK 安定発現株を樹立する。

wt-或いは dn- (Y701F 置換)Stat1 をテトラサイクリン応答発現ベクター に対してディレクショナルクローニングを行う。

wt-並びに dn-Stat1 がサブクローニングさ

れた pTRE3-Tight を Linear hygromycin selection marker と共に、1)で作製した pTet-On-MDCK 細胞或いは pTet-Off-MDCK 細胞へトランスフェクションする。

ハイグロマイシンにより選択し二重安定発現株を樹立する。wt-および dn-Stat1 の発現量については、realtime PCR により解析する。

(3) コラーゲンゲル内培養による管腔形成

Stat1-Tet-On 或いは Stat1-Tet-Off 二重安定発現 MDCK 細胞は、コラーゲンゲル内に包埋培養を行う。

次に 50 ng/mL HGF を含んだ無血清培地 (DMEM) を加えゲルを浮遊させた後、異なる濃度のテトラサイクリンを添加し培養を開始する。

(4) mRNA 並びにタンパク質発現解析

mRNA 発現は、total RNA 抽出、DNaseI 処理、逆転写の後、realtime PCR で解析する。

タンパク質については、RIPA buffer 中でゲルを破碎後、タイトジャンクション、接着結合構成分子、基底膜構成分子およびマトリックス分解酵素群を解析する。

(5) レーザー顕微鏡による形態学的解析

細胞を含んだコラーゲンゲルはホルムアウト免疫染色に供する。一次抗体洗浄後に、蛍光標識二次抗体/DAPI 混合液とコラーゲンゲルを 24 時間反応させる。蛍光標識には主に Alexa Fluor 488 および 633 を用いる。

ゲルはグリセリンで透明化した後、2 フォトン共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM-710) 並びにコヒレント社製 Chameleon を用いて、ゲル深部まで観察、撮影を行う。

(6) 生体模倣ゲルを用いて三次元培養による管腔形成実験

コラーゲン・スポンジ内培養; 市販のスポンジを PBS 洗浄後に用いる。

アルギン酸三次元培養; MDCK 細胞をアルギン酸ナトリウム溶液に懸濁した後に、塩化カルシウムを滴下し、ゲル化させた後、ゲルを PBS 洗浄後に管腔形成実験に供する。

各種ハイドロゲルの作製は、メーカーの使用法に準じる。

4. 研究成果

(1) MDCK 細胞における TNF 依存性 MMP-9 発現制御機構の解析

MDCK 細胞に TNF による濃度依存的 MMP-9 の酵素発現をゼラチンザイモグラフィにより、mRNA 発現を定量的 PCR によって検討した。その結果、TNF 濃度依存的な MMP-9 の特異的な発現の上昇が確認された。この結果を受け、TNF による細胞への刺激を与える前に 5 種類のシグナルインヒビターを添加し MMP-9 発現が減少、もしくは消失する経路について検討した。その結果、JAK1/2 インヒビターである Ruxilitinib と JAK2 インヒビターであ

る AG-490 において MMP-9 特異的な発現消失が確認された。さらに mRNA における TNF 依存性 MMP-9 発現への AG-490 の影響を検討した際にも、コントロールと比べ MMP-9 の発現が抑制されていた。

(2) 転写制御領域解析

MDCK 細胞における TNF 依存性 MMP-9 発現への JAK-STAT 経路の関与の可能性を受け、イヌ MMP-9 上の STAT1 結合領域をプロモータ解析により同定した。ルシフェーザアッセイによる実験では、TNF の濃度依存的にプロモーター活性が上昇しているのに対し、配列の一部に変異を導入したミュータントプロモータを用いた結果では活性上昇が見られなかった。また、元の配列を基に人工合成した STAT1 プロンプを用いたゲルシフトアッセイにおいても STAT1 の結合が確認される一方で、ミュータントプロモータでは結合が確認されなかった。このことから、同定された領域に STAT1 が結合することが分かった。さらに、クロマチン免疫沈降における結果でも、MMP-9 遺伝子制御領域上には STAT1、リン酸化 STAT1、CBP が結合し、MDCK 細胞の TNF 依存性 MMP-9 発現は STAT1 によって制御される可能性が示された。

(3) STAT1 の機能解析

MMP-9 発現に STAT1 が関与する可能性をもとに、STAT1 の野生型と、ドミナントネガティブ型のプラスミドを導入した MDCK 細胞株を作成し、TNF 依存性 MMP-9 発現に STAT1 が及ぼす影響を検討した。その結果、コントロール並びに野生型 STAT1 導入株では TNF の濃度依存的に MMP-9 の発現上昇が見られる一方で、STAT1 の発現が抑制されたドミナントネガティブ型 STAT1 導入株では MMP-9 の発現が特異的に抑制されていることが分かった。さらに、コアクティベータである CBP (CREB Binding Protein) と STAT などの結合性を調べるために、マウス CBP 発現プラスミドを導入した MDCK 細胞株を作成し、もっとも CBP 反応性の高いクローンである 12-2 を用いて実験を進めた。CBP 発現 MDCK 細胞株を用いて TNF 10ng/mL 処理後経時的に細胞を回収して mCBP 抗体で免疫沈降し、リン酸化 STAT1 の抗体でウェスタンブロットングした。その結果、TNF 処理後 120 分でリン酸化 STAT1、すなわち活性化した STAT1 の発現が上昇していることが分かった。また、STAT とともにシグナルを伝達する JAK についても同様にウェスタンブロットングを行った結果、TNF 処理後 5 分から 30 分にかけて発現が見られた。IRF (Interferon Regulatory Factor)-1 のドミナントネガティブ型プラスミドを導入した MDCK 細胞株を用いて STAT1 同様に、TNF 依存性 MMP-9 発現への影響を、酵素発現をゼラチンゼイモグラフィーにて、mRNA 発現を定量的 PCR にて検討した。その結果ドミナントネガティブ型 STAT1 細胞株同様、MMP-9

発現の抑制が確認されたため、MDCK 細胞株における TNF 依存性 MMP-9 発現には IFN、STAT1 が係わる可能性が示された。

(4) コラーゲンゲル内培養における STAT1 の管腔形成への影響

MDCK 細胞はコラーゲンゲルを利用した 3 次元培養において管腔を形成することが知られており、これを用いた研究も多く行われている。そのことから STAT1 導入株をもちいて、STAT1 と MMP-9 の管腔形成に与える影響について検討した。まず、培養上清中に分泌される MMP-9 発現をゼラチンゼイモグラフィーにて、mRNA レベルでの MMP-9 の発現について定量的 PCR にて検討した結果、単層培養同様に、コントロール、野生型 STAT1 発現株では TNF によって MMP-9 発現が上昇し、ドミナントネガティブ型 STAT1 発現株では抑制されていた。さらに、単層培養時に比べ平均値が上昇していた。また、MDCK 細胞による管腔形成実験において管腔の形成を促進される因子としてよく用いられる HGF (Hepatocyte Growth Factor) を添加したコラーゲンゲルではすべての細胞株において MMP-9 発現レベルの変化は見られなかった。1 週間コラーゲンゲル内で培養した細胞についてホルマウント免疫染色によって形態を観察した。コントロール細胞株では HGF 添加により管腔の伸長が観察され、野生型 STAT1 発現株ではコントロールより管の直径が細く、さらに細胞間接着因子であるカドヘリンの発現が HGF によって、より明瞭になっている様子が観察された。ドミナントネガティブ型 STAT1 発現株では管腔の直径が大きく、HGF の添加により管の分岐や上皮の重層化などの形態異常が確認された。なお、いずれの細胞株においても TNF による形態形成への影響は見られなかった。コラーゲンゲル内で形成された管腔について、接着結合の因子である腎特異的カドヘリン/カドヘリン 16、密着結合の因子であるオクルディン、そして管周囲にあるコラーゲンとの相互作用に関わる因子の 4 型コラーゲンの mRNA 発現を検討した。腎特異的カドヘリンは野生型 STAT1 発現 MDCK 細胞株において高い値を示した。また、この結果は、形態学的解析においてカドヘリン免疫染色の結果と一致する。オクルディンはドミナントネガティブ型 STAT1 発現 MDCK 細胞株でやや低い値であったが大きな差は見られなかった。4 型コラーゲンは野生型 STAT1 発現 MDCK 細胞株において、コントロールやドミナントネガティブ型よりやや高い値を示し、TNF のみで処理した場合に特に高い値を示した。

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 5 件)

1. Kobayashi, S, Morimoto, Y, Kondo, S,

Sato, T, Suganuma, H, Arai, K, Watanabe, G. Sex Differences and the Heritability of Scute Pattern Abnormalities in the Green Sea Turtle from the Ogasawara Archipelago, Japan. *Zoological Sci.* 34: 281-286 (2017)

2. Fujikawa, H, Nagaoka, K, Arai, K. Degradation of staphylococcal enterotoxin A by a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from raw milk. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81:1436-1443 (2017)

3. Kobayashi S, Wada S, Fujimoto R, Kumazawa Y, Arai K, Watanabe G, Saito T. The effects of nest incubation temperature on embryos and hatchlings of the loggerhead sea turtle: Implications of sex difference for survival rates during early life stages. *J Exp Mar Bio Ecol.* 486:274-281, (2017)

4. Arahara K, Matsumoto T, Morimatsu F, Arai K. Fibronectin modified expression of Sonic hedgehog in ATRA-mediated neuronal differentiation. *J Vet Med Sci.* 77:1503-1506 (2015)

5. Sasao T, Fukuda Y, Yoshida S, Miyabara S, Kasashima Y, Kuwano A, Arai K. Population doubling level-dependent change of secreted glycosaminoglycan in equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Equine Sci.* 26:73-80 (2015)

[学会発表](計18件)

1. H. Sekimukai, N. Iwata-Yoshikawa, A. Fukuma, S. Fukushi, H. Tani, M. Kataoka, K. Arai, K. Niikura, H. Hasegawa, N. Nagata. Development of a vaccine against human coronavirus using gold nanoparticles. *ConBio 2017* (2017)
2. A. Shindo, H. Yamada, M. Kusuata, S. Hattori, K. Arai. Cell adhesion inhibitory protein in the nematocyte of *Aurelia* sp. *ConBio2017* (2017)
3. K. Arai, K. Tsukimori. Molecular cloning of mesoglein, jellyfish-specific ECM protein. *ConBio 2017* (2017)
4. H. Sekimukai, N. Iwata-Yoshikawa, A. Fukuma, S. Fukushi, H. Tani, K. Arai, K. Niikura, C. Takeuchi, K. Nanbara, M. Takeda, H. Hasegawa, N. Nagata. Expression and characterization of human coronavirus spike proteins associated with severe pneumonia. *XIVth International Nidovirus Symposium* (2017)
5. Y. Kasashima, N. Tamura, A. Tomita, K. Fukuda, T. Kuroda, T. Tabata and K. Arai. Stem cell therapy for tendon injury of racehorses in Japan: Present

conditions and future prospects.
Havemeyer conference on regenerative medicine II (2017)

ほか13件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 克彦 (Arai Katsuhiko)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：60175940