

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06750

研究課題名(和文)Dent病のエンドサイトーシス障害機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of impaired endocytosis to develop new treatment options for Dent's disease

研究代表者

佐藤 信彦 (Sato, Nobuhiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80572552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管エンドサイトーシス障害を本態とするDent病について、原因遺伝子であるCLCN5のナンセンス変異に対するPTC124のリードスルー効果を検証すると共に、CLC5/V-ATPase機能的共役とエンドサイトーシス障害の関連を検討した。HEK293細胞発現系において国内外で共通に報告されるナンセンス変異R704Xに対するリードスルー効果が観察され、PTC124がナンセンス変異を原因とするDent病に有効である可能性が示唆された。また、マウス近位尿細管と細胞内pH測定系を用いた検証により、インスリンがPI3K/Akt経路を介してV-ATPaseを活性化させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We examined the readthrough effect of PTC124(ataluren) on nonsense mutation of CLCN5, the causative gene of Dent's disease with impaired endocytosis in renal proximal tubules. Further, we examined the relationship between the functional coupling of CLC5/V-ATPase and defective endocytosis. In HEK293 cells, a certain read-through effect on nonsense mutation R704X, which is commonly reported both domestically and abroad, was observed, suggesting that PTC 124 was effective for Dent's disease caused by nonsense mutations. Intracellular pH measurement in mouse renal proximal tubules revealed that insulin activates V-ATPase via PI3K / Akt pathway.

研究分野：腎生理学

キーワード：Dent病 CLC5 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

Dent 病は 2Cl/H 交換輸送体 CLC-5 の遺伝子変異を原因とし、低分子量蛋白尿や腎石灰化に端を発し、末期腎不全に至る極めて予後不良な難治性疾患である。申請者は CI ゲーティング機構の中核 E211 の新規病原変異体である E211Q が、CLC-5 の機能様式を 2Cl/H 交換輸送体から CI チャネルへ変化させることで Dent 病を発症させることを世界で初めて見出し、エンドゾーム酸性化における V-ATPase/CLC5 機能的共役の重要性を報告した。申請者がその機能解析結果を報告した E211Q 新規病原変異体を含めて 190 以上同定されている CLC-5 変異にはミスセンス変異 (36%) 以外にもナンセンス変異 (17%) も知られており、膜発現量低下や CI 電流の減少・消失による機能喪失が病態生理学的機序と考えられている。PTC124 は未熟終始コドンを読み超えて翻訳を行わせるリードスルーという薬理作用によりこのようなナンセンス変異型遺伝子疾患に対する特異的な治療薬として注目されている。PTC124 は Duchenne 型筋ジストロフィーや嚢胞性線維症への臨床応用の他、申請者の所属する研究室でも NBCe1 W516* 変異ノックインマウスにおけるリードスルーによる酸血症改善効果が確認されている。そこで申請者のこれまでの研究成果を発展させ、既知の CLC-5 ナンセンス変異の中で国内外において共通に報告される W279X, R648X, R704X に対する PTC124 の効果を検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は申請者のこれまでの研究を発展させ、未だ解明されていない Dent 病や家族性若年発症糖尿病 (MODY3) などに共通する近位尿管管エンドサイトーシス障害と V-ATPase/CLC-5 機能的共役機構の関連を明らかにし、新規治療法の開発へとつなげることである。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系における二電極膜電位固定法による輸送体の機能解析と、(2) HEK293 細胞発現系における微小灌流装置を用いた細胞内 pH 測定と Western blotting 法による蛋白半定量、(3) C57BL6 マウス単離近位尿管管と (2) と同様の手法を用いた細胞内 pH 測定。

4. 研究成果

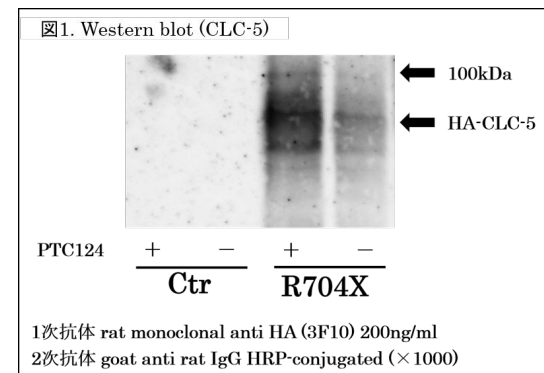
(1) *CLCN5* 遺伝子配列を含む HA タグ付きプラスミド (pcDNA 3.1) に Quick change II site-directed mutagenesis kits[®] を用いて国内外で共通に報告される既知のナンセンス遺伝子変異 (W279X, R648X, R704X) をそれぞれ導入し、cRNA を in vitro (mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit[®]) で作成した。作成した cRNA 5ng をマニピュレーターを用いてアフリカツメガエル卵母細胞にマ

イクロインジェクションし、16 で 3-4 日培養することで同細胞に CLC-5 蛋白を発現させた後、機能解析を行った。

二電極膜電位固定法を用いて CLC-5 蛋白を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞における電流-電圧 (IV) 曲線を描くことで各々の変異体の電気特性を同定したところ、wild type CLC-5 を発現させた卵母細胞では、典型的な強い外向き整流性の IV 曲線が得られた。一方、各種ナンセンス変異体の IV 曲線では整流性を認めず、電流も微小であった。アフリカツメガエル卵母細胞の内因性 CI コンダクタンスと異なり、この電流には一価の陰イオン選択性 (I^- , NO_3^- , Br^-) を認めたことから、ナンセンス変異導入により CLC-5 電流が減少・消失したと考えられた。

次に、cRNA マイクロインジェクション後の卵母細胞培養時に PTC124 を添加して 72 時間後に、同様に IV 曲線を描いたが、リードスルーによる CLC-5 電流の回復は認められなかった。PTC124 の添加量を増やすことでリードスルー効果の顕在化を期待したが、アフリカツメガエル卵母細胞系における PTC124 の EC₅₀ 値は明らかではなく、溶質の析出あるいは溶媒である DMSO の細胞毒性増加により卵母細胞の生存率が極端に低下したため、電流測定が困難となった。

(2) 次に、HEK293 細胞と PTC124 を用いてリードスルー効果を検証した。(HEK293 細胞における PTC124 の EC₅₀ 値は 0.1 μM である。) 上記のように作成した CLC-5 コンストラクトを Lipofectamine[®] 2000 を用いて PTC124 (3 μM) 存在/非存在下で HEK293 細胞にトランスフェクションし、Western blotting 法により CLC-5 蛋白 (約 90 kDa) の半定量を行った。R279X と R648X では PTC124 によるリードスルー効果は明らかではなかった。一方、R704X では PTC124 3 μM による CLC-5 蛋白発現量の回復を認めた (図 1)。



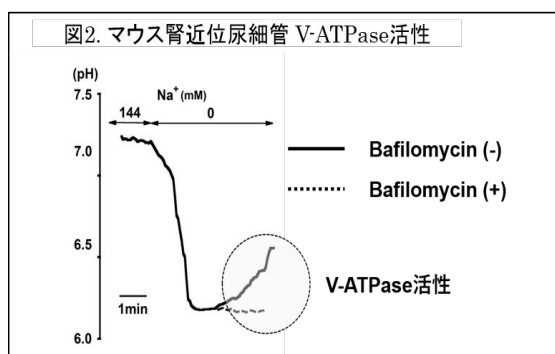
そして、申請者が既報で用いた低浸透圧 (210 mOsm) 誘導性 V-ATPase 活性測定法により、R704X 発現 HEK293 細胞の V-ATPase 活性を測定したところ、PTC124 のリードスルー効

果によると考えられる V-ATPase 活性の回復を認めた。

次に、実際のエンドゾーム内部の酸性化およびメガリン依存性エンドサイトーシスの障害の有無について、内因性メガリン高発現ラット卵黄嚢由来 L2 細胞を用いた検討を試みたが、添付文書記載通りの培養環境を再現したにも関わらず同細胞の増殖を認めず、継代が困難であった。以上より、代替細胞の検索に一部課題を残すが、PTC124 はナンセンス変異を原因とする Dent 病に有効である可能性が示唆された。

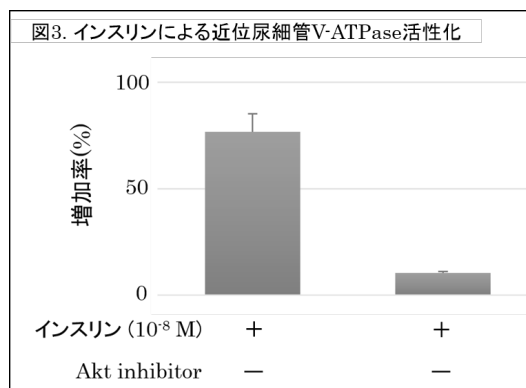
(3) 次に、Dent 病と同様に遺伝性近位尿細管エンドサイトーシス障害を共通の特徴とする MODY3 と V-ATPase/CLC-5 機能的共役機構の関連について検証を行った。MODY3 は進行性のインスリン分泌低下による重篤な糖尿病と微小血管合併症の多発を特徴とするが、まず腎近位尿細管におけるインスリンと V-ATPase の関連を明らかにするため、マウス単離近位尿細管と蛍光色素 BCECF-AM を用いた細胞内 pH 測定を行った。

細胞接着剤(Cell Tak®)を塗布した 6mm カバーガラスに単離したマウス近位尿細管を置き、HEPES 緩衝液で溶解した BCECF-AM で 5~10 分ローディングを行い、倒立蛍光顕微鏡で観察を行った。チャンバー内の還流液を HEPES 緩衝液から Na-free HEPES 緩衝液に置換すると、主に NHE3(Na/H exchanger 3)を介した細胞外への Na 流出と細胞内への H の流入を反映した細胞内 pH の低下が観察された。その後、細胞質に存在する V-ATPase の膜へのトランスロケーションを反映した遅発性の bafilomycin(V-ATPase の特異的阻害剤)感受性の細胞内 pH 回復過程が観察された。(図 2)(第 60 回 日本腎臓学会学術総会)



この細胞内 pH 回復反応の最大速度を V-ATPase 活性と定義し、インスリン添加が単離近位尿細管 V-ATPase 活性に及ぼす影響を解析したところ、生理的濃度(10^{-8} M)のインスリン添加により、単離近位尿細管の V-ATPase は 60~70%程度活性が上昇し、シグナル伝達経路の構成要素の 1 つでもある Akt 阻害剤の添加によりその活性上昇作用は著

明に減少した(図 3)。



このことから、近位尿細管においてインスリンが PI3K/Akt 経路を介して V-ATPase を活性化させることが明らかになった。前述と同様にエンドサイトーシスとの直接の関連を解析するため、L2 細胞の代替となる細胞を検討しつつ、引き続き HIF1a 遺伝子ノックダウンによる影響(マウス肝炎ウイルス汚染による動物飼育舎の閉鎖で遅延)についての解析も再開している。

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 2 件)

1. Functional coupling of V-ATPase and CLC-5. Satoh N, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Horita S, Seki G, Moriya K. World J Nephrol 2017 Jan 6;6(1):14-20. doi: 10.5527/wjn.v6.i1.14. (査読あり)
2. A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation. Satoh N, Yamada H, Yamazaki O, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Ashida A, Yamamoto D, Kaku Y, Sekine T, Seki G, Horita S. Pflugers Arch. 2016 Jul;468(7):1183-96. Doi: 10.1007/s00424-016-1808-7 (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

「近位尿細管管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体の検討」(P-267)鈴木 淳司, 中村 元信, 佐藤 信彦, 関 常司, 佐藤 悠佑, 本間 之夫, 堀田 晶子, 南学 正臣, 第 59 回日本腎臓学会学術集会, 2017 年 5 月 27 日, 仙台国際センター東北大学百周年記念会館

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 信彦 (Sato Nobuhiko)

東大病院・感染制御部・助教

研究者番号：80572552