

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10150

研究課題名(和文) 脂質メディエーターに着目した多発性嚢胞腎病態生理に基づく疾患特異的治療の開発

研究課題名(英文) Development of disease-specific therapy based on polycystic kidney disease pathophysiology focusing on lipid mediators

研究代表者

中西 浩一 (Nakanishi, Koichi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50336880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、多発性嚢胞腎の複数の基本的病態生理における脂質メディエーターの関与とその機序を解明し、それらを修飾することによる病態生理に基づいた疾患特異的治療開発のための基礎的知見の獲得、およびそのヒトへの応用のためのモデル動物を用いた治療研究による効果の確認である。これまでのPKDにおける研究の継続として、miRNAと脂質メディエーターの関与について検討し、miR-23aを含む数個のmiRNAがPKDの病態に関与することを示唆するデータを得て、更なる研究を計画している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性嚢胞腎の複数の基本的病態生理における脂質メディエーターの関与とその機序が解明され、それらを修飾することによる病態生理に基づいた疾患特異的治療開発のための基礎的知見が獲得され、そのヒトへの応用のためのモデル動物を用いた治療研究による効果が確認されれば、新しい治療法の開発に繋がる可能性があり、医学・医療に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the involvement and mechanism of lipid mediators in multiple fundamental pathophysiology of polycystic kidney disease, and to provide a basis for the development of disease-specific therapy based on pathophysiology using modification of them, as well as confirming the effect by therapeutic research using model animals for its application to humans.

As a continuation of the previous research on PKD, we examined the involvement of miRNAs and lipid mediators, obtained data suggesting that several miRNAs, including miR-23a, are involved in the pathology of PKD, and further research are planning.

研究分野：遺伝性腎疾患

キーワード：多発性嚢胞腎 上皮間葉移行 増殖 分泌 細胞外基質 脂質メディエーター miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私どもは、PKDにおいて嚢胞を形成する尿細管上皮細胞では脱分化がみられ、上皮間葉移行 (EMT)により間葉系の形質を獲得し発症に関与することを報告し(Am J Physiol Renal Physiol 2011; 300: F511-20)、また、その病態にTGF- $\beta$ ・Smad3系の疾患特異的異常が関与することを明らかにしてきた。その結果、尿細管上皮細胞は、増殖(過形成)・細胞周期異常、分泌(正常では吸収が主である)、細胞外基質異常・線維化を起こし、そのため嚢胞形成・腎不全にいたる。現在、PKDにおけるEMTならびにそこから引き起こされるこれらの基本病態における脂質メディエーターの関与およびその機序は不明である。

脂質メディエーターとは、生理活性脂質とも呼ばれ、生物活性(生理作用)を持つ脂質であり、細胞外に放出され、他の細胞の細胞膜受容体に結合することにより作用する分子などをさす。最近の研究により、脂質メディエーターの内、リゾリン脂質は細胞間の情報伝達物質として重要な役割があることがわかってきた。近年、リゾリン脂質に対する特異的受容体が存在することが次々と明らかにされ、この受容体はGタンパク質共役型受容体(GPCR)であることから、新しい創薬のターゲットとして注目を浴びている(Annu Rev Pharmacol Toxicol 2010;50:157-186)。

### 2. 研究の目的

本研究では脂質メディエーターが PKD の基本病態に関与しているという仮説により、その解明を大きな目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではPKD動物モデルを用いて、まず初めに以下のPKDの基本病態につきKey分子であるTGF- $\beta$ ・Smad3系の関与を確認した。さらに、これらの基本病態における脂質メディエーターの関与の有無を検討するにあたり、これまでの研究の継続性を考慮して、miRNAを介する脂質メディエーターの関与に着目した。

#### 【1】PKDモデルにおける細胞分化の異常・上皮間葉移行 (EMT)

上皮マーカーの発現抑制、間葉系マーカーの発現、EMTに関与する分子・情報伝達系の検討。

#### 【2】増殖・細胞周期異常

EMTにより引き起こされた病的細胞表現形である増殖・細胞周期異常に関与する増殖因子系および細胞周期制御に関するサイクリン分子の検討。

#### 【3】腎間質線維化

EMTにより獲得された間葉系表現系により、病的尿細管上皮細胞にみられる腎線維化に寄与するコラーゲン分子、線維化関連分子の検討。

本研究で使用するCPKマウスは、世界で最も研究されているPKDモデルのひとつである。起源はC57BL/6J系統の常染色体劣性遺伝を示す自然発症モデルであり、その原因遺伝子がクローニングされ、その原因遺伝子産物シスチンは、一次繊毛関連蛋白で、それゆえヒトPKDと共通の基本病態生理を示す(J Clin Invest 109:533-40,2002)。ヒトARPKDと同様に、腎集合管に主な病変が認められる。

動物実験の遂行においては、研究代表者の新任地における研究体制の構築と並行して、前任地の研究分担者と密に連絡をとりつつ前任地での既存の検体を最大限に有効利用できるように努めた。

### 4. 研究成果

研究代表者がこれまでに継続的に取り組んできた本研究の根幹をなすPKDにおける細胞表現系の変化とSmad3リン酸化部位特異的变化について、継続性を重視しより精度の高い研究を進めるために、追加実験を実施して論文を完成させ採択された(H29年度)。これは本研究のテーマデータセンターであるPKDと脂質メディエーターの関連を検討する上でも大変重要である。

(1) CPKマウスの嚢胞上皮で、上皮系を示すE-cadherinは発現が减弱しており、間葉系マーカーである $\alpha$ -SMAは発現が増強し、及びE-cadherinの抑制因子であるSnail 1は発現の増強が認められた。このことから嚢胞上皮が間葉系の表現系を示すことが確認された。

(2) pSmad3Lの発現がCPKマウスの尿細管上皮の核で有意に増強している一方で、TGF- $\beta$ とpSmad3CはCPKマウスと対照に同程度の発現を示していた。さらに、TGF- $\beta$ 、pSmad3L、pSmad3C、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、cyclin dependent kinase 4(CDK4)、及びc-MycについてWestern Blottingを行い、pSmad3L、JNK、CDK4とc-MycがCPKマウスの核で有意に上昇してい

ることを確認した。pSmad3L/C は免疫沈降で CPK マウスにおいて有意な発現を認め、嚢胞形成・増大に関与することが確認された。

本研究の論理的根拠を固めるために細胞を用いる研究を計画し、実施する体制を整えた。また、これまでの PKD における研究の継続として、miRNA と脂質メディエーターの関与について検討し、数個の miRNA の関与を示唆するデータを得た。具体的に、最終年度には miR-23a が PKD の病態に関与するデータを得て、脂質メディエーターとの関与を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hama T, Nakanishi K, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Shima Y, Miyajima M, Nozu K, Nagao S, Takahashi H, Sako M, Iijima K, Yoshikawa N, Suzuki H.	4. 巻 313
2. 論文標題 Aberrant Smad3 phosphoisoforms in cyst-lining epithelial cells in the cpk mouse, a model of autosomal recessive polycystic kidney disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol.	6. 最初と最後の頁 F1223-F1231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00697.2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中西浩一	4. 巻 61
2. 論文標題 ADPKDの最近の知見	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 1098-1101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中西浩一	4. 巻 87
2. 論文標題 ARPKD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 744-748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichi Nakanishi
2. 発表標題 Concurrent Session 2.2 Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT): Outcome of CAKUT.
3. 学会等名 13th Asian Congress of Pediatric Nephrology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西浩一
2. 発表標題 常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD)
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森貞直哉、野津寛大、中西浩一、飯島一誠
2. 発表標題 伝学的に診断できた常染色体劣勢多発性嚢胞腎の遺伝型と臨床像
3. 学会等名 第28回発達腎研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森貞直哉、野津寛大、中西浩一、飯島一誠
2. 発表標題 遺伝学的に診断できた常染色体劣勢多発性嚢胞腎の遺伝型と臨床像
3. 学会等名 第27回嚢胞性腎疾患研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	島 友子  (Shima Yuko)  (60433364)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	