

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10189

研究課題名(和文) Smad3部位特異的リン酸化に着目した多発性嚢胞腎における病態解明と治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathology and development of therapeutic agents in polycystic kidney disease focusing on Smad3 site-specific phosphorylation

研究代表者

佐藤 匡 (Sato, Masashi)

和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30726716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎(PKD)は増殖・分泌・細胞外基質異常が引き起こされ、その結果、嚢胞増大とともに線維化が進行し腎不全にいたる。リン酸化Smad3のひとつであるpSmad3L/Cが嚢胞形成、増大において大きく関与することが示唆された。ウイルス性慢性肝疾患では、疾患増悪因子となるpSmad3Lの上流にある分子を阻害することで、正常なアポトーシスを起こすpSmad3Cの経路が回復することが報告されているが、PKDにおいてもpSmad3L/Cの上流にある分子を阻害することで嚢胞形成の進行を抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性嚢胞腎は根本的な治療薬の開発がまだ十分とはいえ、徐々に腎機能が低下し腎不全に至ると腎移植や透析治療となることが避けられない。ウイルス性慢性肝障害や大腸癌などSmad3の関与が研究されているのと同様に、多発性嚢胞腎においてもSmad3のリン酸化部位に着目した治療薬の開発に本研究が大きく貢献する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Polycystic kidney disease (PKD) is characterized by abnormal proliferation, secretion and fibrosis in the tubules of the kidneys. These cause cyst formation in the tubules and lead to renal failure. It was suggested that one of phosphorylated Smad3, p-SmadL/C, is involved in the cyst formation and enlargement. In viral associated chronic liver disease, it was reported that inhibition of a molecule in the upstream of pSmad3L lead to upregulation of pSmad3C-associated cascade, which is related to normal apoptosis. Therefore, inhibition of a molecule in the upstream of pSmad3L also may be a therapeutic strategy for inhibition of cyst formation in PKD.

研究分野：腎疾患

キーワード：嚢胞性腎疾患 cpkマウス smadリン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease: PKD)では、嚢胞を形成する尿細管上皮細胞の極性欠如(脱分化)によって、尿細管上皮細胞に増殖(過形成)、分泌(正常では吸収が主である)、細胞外基質異常を引き起こし、その結果、嚢胞が形成される。さらに、嚢胞増大とともに線維化が進行し、最終的には腎不全に至る。

私どもの教室では、ヒト ARPKD の原因遺伝子の相同遺伝子に変異を有する PCK ラットを用いて、PKD と線維化の病態に上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) が関与していることを明らかにした (Am J Physiol Renal Physiol 300:F511-20, 2011)。

嚢胞形成と拡大の過程で嚢胞性上皮における TGF-β/Smad3 系の関与が示唆されているが、詳細は不明である。Smad3 のリン酸化部位には、分子の中間に存在するリンカー部(L)と C 末端部(C)があり、一方のみリン酸化された pSmad3L、pSmad3C と両方リン酸化された pSmad3L/C のフォスフォアイソフォームが形成される。大腸癌では腸管上皮の pSmad3L/C 形成が癌化・浸潤に重要な役割を担っている (Cancer Res. :69(13):5321-30, 2009)。しかし、PKD における Smad3 リン酸化の詳細は不明である。

私どもの教室では、PKD の腎線維化・EMT における TGF-β/Smad3 経路の変化に着目し、その量的異常に加えて pSmad3L/C の形成が PKD モデルで確認できることを明らかにした。本研究では、TGF-β/Smad3 系、特に Smad3 リン酸化異常に着目した PKD の病態と、その修飾による治療の可能性を検討する。

2. 研究の目的

Smad3 リン酸化異常の多様性と線維化・嚢胞の程度に相関があると仮定し、Smad3 フォスフォアイソフォームを調べ、バイオマーカーとなる可能性、および、リン酸化異常の阻止が治療のターゲットとなる可能性を調べる。

3. 研究の方法

(1) cpk マウスの嚢胞上皮における間葉系の存在を確認するために、E-cadherin、 α -smooth muscle actin(α -SMA)、Snail 1 の抗体を用いて免疫染色を行った。

(2) Smad3 のフォスフォアイソフォームの局在を確認するために TGF- β 、pSmad3L、pSmad3C の特異的抗体を用いて免疫染色を行う。また TGF- β 、pSmad3L、pSmad3C、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、cyclin dependent kinase 4(CDK4)、及び c-Myc について Western Blotting を行った。

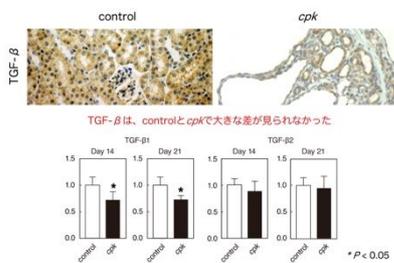


図1 TGF-β 免疫染色

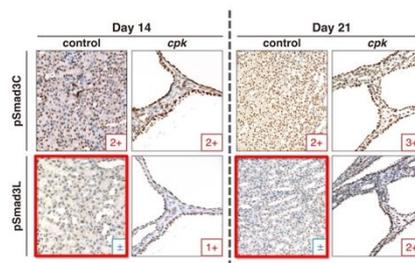


図2 Smad3 免疫染色

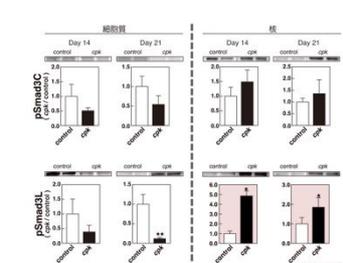


図3 Smad3 Western Blotting

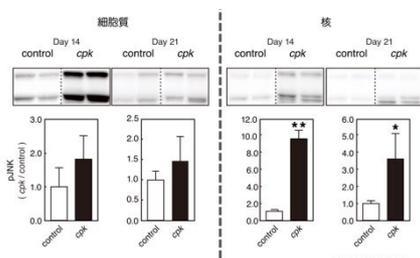


図4 pJNK Western Blotting

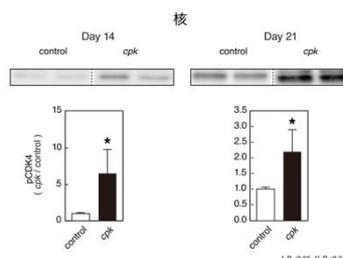


図5 pCDK4 Western Blotting

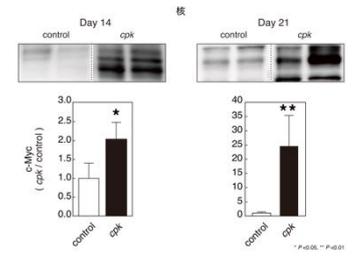


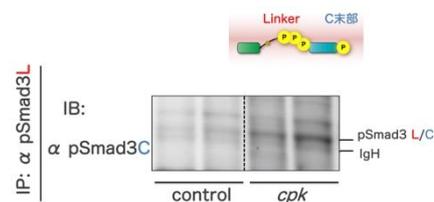
図6 c-Myc Western Blotting

4. 研究成果

(1) cpk マウスの嚢胞上皮で、上皮系を示す E-cadherin は発現が減弱しており、間葉系マーカーである α -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- β と pSmad3C は cpk マウスと対照に同程度の発現を示していた(図 1-2)。さらに、TGF- β 、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た(図 3-6)。pSmad3L/C は免疫沈降で *cpk* マウスにおいて有意な発現を認め(図 7)、嚢胞形成・増大に関与することが確認された。



*cpk*マウスで pSmad3L/C を確認

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1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 Volume 313, Issue 6
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） DOI: 10.1152/ajprenal.00697.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nakanishi K.
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 in conjunction with the 39th Malaysian Paediatric Association Annual Congress Incorporating the 2nd IPNA/AsPNA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakanishi K.
2. 発表標題 Concurrent Session 1.8 Acute Glomerulonephritis: Henoch Schonlein Purpura.
3. 学会等名 13th Asian Congress of Pediatric Nephrology in conjunction with the 39th Malaysian Paediatric Association Annual Congress Incorporating the 2nd IPNA/AsPNA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakanishi K.
2. 発表標題 Session 5 IgA Mephrtopathy and Henoch Schonlin Purpura Nephropathy.
3. 学会等名 Treatment of IgAN and HSP nephritis. 18th Congress of the International Pediatric Nephrology Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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 遺伝学的に診断できた常染色体劣性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 (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 遺伝学的に診断できた常染色体劣性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 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 佐藤匡、中西浩一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 発達腎研究会誌	5. 総ページ数 3
3. 書名 マイクロRNAによる多発性嚢胞腎疾患特異的治療の検討	

1. 著者名 中西浩一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本腎臓学会誌	5. 総ページ数 4
3. 書名 ADPKDの最近の知見	

1. 著者名 中西浩一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ARPKD 腎と透析87(5)	

〔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	中西 浩一 (NAKANISHI Koichi) (50336880)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	