

平成 21 年 6 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590919

研究課題名（和文） AQP11 ノックアウトマウスにおけるのう胞腎形成機序の解明

研究課題名（英文） A study of the cystogenesis in the AQP11 knockout mouse kidney

研究代表者

小林 克樹

独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床研究センター）・室長

研究者番号：40415451

研究成果の概要：マウスにおいて AQP11 の欠損は、腎臓の近位尿細管上皮細胞に小胞体ストレスを惹起しその結果空胞形成を伴うアポトーシスが誘導されること、しかし皮質深層の近位尿細管上皮細胞はこの変化は受けずにかえって mTOR 情報伝達系の活性化による細胞増殖が亢進し嚢胞を形成することが判明した。さらに、上記の変化には primary cilia の直接の関与はないと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：

キーワード：多発性嚢胞腎、小胞体ストレス、primary cilia、mTOR、ラパマイシン、アクアポリン

## 1. 研究開始当初の背景

従来、我々はアクアポリン水チャネルファミリーに属する分子について研究を行ってきた。その最後に同定された分子に AQP11 と AQP12 が存在するが、他のファミリー分子との相同性が低いこと・水チャネルとして重要と考えられている 2 つの NPA box の 1 つが保存されていないことなどから、チャネルとしての機能には未知の部分が多かった。そこで、AQP11 のノックアウトマウスを作製したところ、予想とは大きく異なり、多発性嚢胞腎を発症し、腎不全により生後 3 週頃に死亡することを見出した。さらにこのマウスには嚢胞形成に先だって近位尿細管上皮細胞の細胞内に空胞 (vacuole) が出現すること、また嚢

胞形成が近位尿細管に限られることなど、他の多発性嚢胞腎の動物モデルには見られない特徴が備わっていた。

## 2. 研究の目的

上記の理由から AQP11 ノックアウトマウスの表現型を解析することは AQP11 の生理機能を解明するばかりでなく、多発性嚢胞腎の発症病理にも新たな知見を加えるものと期待された。

## 3. 研究の方法

以下今回用いた研究方法について概略を列記する。

① 発現マイクロアレイ解析：生後 7 日のマ

ウスの腎臓から mRNA を調製し、Affymetrix 社製の GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて解析を行った。

- ② 抗 CHOP 抗体・抗 AQP1 抗体・抗リン酸化 p70 S6 kinase 抗体・抗アセチル化 tubulin 抗体等を用いてマウス腎臓の免疫染色を行った。
- ③ TUNEL 解析を行った。
- ④ BrdU 投与後に抗 BudU 抗体を用いた免疫染色を行った。
- ⑤ Rapamycin を腹腔内投与して嚢胞形成を観察した。
- ⑥ 野生型マウスおよびノックアウトマウスそれぞれからマウス胎児性繊維芽細胞 (MEF) を調製し、抗アセチル化 tubulin 抗体を用いた免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

以下の知見が得られた。

- ① 近年、嚢胞腎関連遺伝子産物の多くが primary cilia に関係していることが示されている。そこで我々は AQP11 ノックアウトマウスでの primary cilia を検討した。生後 0 日・3 日・7 日の AQP11 ノックアウトマウスおよび野生型マウスの腎臓を 4%PFA にて固定した後、抗アセチル化チューブリン抗体を用いて免疫組織染色を行ったが、いずれの時点でも野生型マウスと同様にノックアウトマウスでも primary cilia は認められ、形態学的な差異は認められなかった。更にマウス胎児性線維芽細胞を作製し、同様に免疫組織染色を行ったが、やはり差異は認められなかった。機能的に差異があるかどうかは明らかではないが、少なくとも形態学的には AQP11 ノックアウトマウス腎の primary cilia に異常はないと考えられた。
- ② AQP11 ノックアウトマウスと野生型マウスの腎組織のアポトーシスについて TUNEL 解析を用いて比較検討したところ、生後 3 日では両者に明らかな差異は認められなかった。しかし、生後 7 日になると野生型マウスでは少数の生理的アポトーシスが残存するのみであるのに対し、AQP11 ノックアウトマウスでは近位尿管上皮細胞に強いアポトーシスが誘導されていた。更に、この生後 7 日の時点で腎臓の expression microarray analysis を行うと、AQP11  $-/-$  マウスでは AQP11  $+/+$  あるいは AQP11  $+/-$  マウスと比較して Ddit3 (CHOP)・Atf3 の発現が著明に増強していた。このことは ER stress response が誘導されていることを示している。また Pmaip1 (Noxa) の発現も野生型に比べて 8 倍程度増強していた。しか

しながら Pmaip1 と同様に p53 によって発現誘導を受けるとされている Bbc3 (Puma) の発現は野生型と同程度であった。またそれ以外のアポトーシス関連分子の発現には変化はなかった。そこで、AQP11 ノックアウトマウスの腎臓を、抗 CHOP 抗体を用いて免疫染色を行うと生後 7 日・生後 14 日・生後 21 日のいずれにおいても空胞を形成した近位尿管上皮細胞全ては CHOP 陽性であり、並行して TUNEL 解析も行うと上記の細胞はほぼ全て TUNEL 陽性すなわちアポトーシス陽性であった。すなわち皮質のほとんどの近位尿管上皮細胞は小胞体ストレスによるアポトーシスを起こしていた。しかし極めて興味深いことに、抗 AQP11 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、皮質の深部に存在する近位尿管は上記のアポトーシスを免れて生き残り、生後 21 日には活発に細胞増殖し嚢胞を形成していた。さらに mTOR 活性化の代理マーカーであるリン酸化 p70 S6 kinase (p-p70 S6 kinase) 陽性を示す細胞も増加していた。最後に mTOR の抑制薬であるラパマイシンを腹腔内投与すると嚢胞形成を著明に抑制した。以上のことは AQP11 ノックアウトマウスにおける嚢胞上皮細胞の細胞増殖は mTOR の過度の活性化によって引き起こされていることを示している。上記から AQP11 ノックアウトマウスの嚢胞腎形成においてはアポトーシスと細胞増殖の両方に異常が生じているものの、その場所と時期はいずれも異なることが判明し、これは今までの嚢胞腎動物モデルでは見出せなかった非常に重要な知見と考えられた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① Proximal tubule cyst formation of AQP11 knockout mice: roles of apoptosis and mTOR signaling pathway (SA-P0968) ASN Renal Week 2006 November 16 - 19, San Diego Convention Center, San Diego, California Katsuki Kobayashi et al.
- ② AQP11 ノックアウトマウスの嚢胞腎形成における細胞増殖・アポトーシスの検討

日本腎臓学会 第 49 回日本腎臓学会学術  
総会 2006, P-164、東京 小林克樹, 祭原幸  
子, 石橋賢一

- ③ rapamycin は AQP11 ノックアウトマウス  
においても嚢胞形成を抑制する 第 14 回  
嚢胞性腎疾患研究会、2006 年 9 月 9 日、  
東京 小林 克樹、祭原 幸子、石橋 賢  
一
- ④ Neonatal Kidneys of AQP11-Disrupted  
Mice Exhibit ER Stress-Induced  
Apoptosis of the Proximal Tubules  
Followed by a Remarkable Slowing of  
Cyst-Formation by Rapamycin Treatment  
(F-P0013) ASN Renal Week 2007 October  
31 - November 5, Moscone Center, San  
Francisco, California Katsuki  
Kobayashi, Kenichi Ishibashi, Sei  
Sasaki
- ⑤ Neonatal Kidneys of AQP11-Disrupted  
Mice Exhibit Enhanced Apoptosis  
Followed by a Remarkable Slowing of  
Cyst-formation by Rapamycin Treatment  
The 5<sup>th</sup> International Conference of  
Aquaporin, July 13 - 16 2007, Nara  
Centennial Hall, Nara Katsuki  
Kobayashi, Kenichi Ishibashi, and Sei  
Sasaki
- ⑥ AQP11 ノックアウトマウスのこの胞形成  
におけるアポトーシスの役割 (0-257)  
第 50 回日本腎臓学会学術総会、2007 年 5  
月 25 日～5 月 27 日、アクティシティ浜松、  
浜松 小林 克樹、石橋 賢一、佐々木  
成
- ⑦ The Primary Cilia of The AQP11 Knockout  
Mouse Kidney. Renal Week 2008 November  
4-9, 2008 Philadelphia, PA, USA  
Kobayashi K, Uchida S, Sasaki S.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 克樹

所属・部局・職名: 独立行政法人国立病院機構

千葉東病院臨床研究センター 室長

研究者番号: 4 0 4 1 5 4 5 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし