

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790739

研究課題名（和文）ヒト多発性嚢胞腎相同モデルにおける尿細管上皮細胞
極性消失の分子生物学的機序解明

研究課題名（英文）Abnormalities in cell polarity in polycystic kidney disease

研究代表者

戸川 寛子（TOGAWA HIROKO）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30445093

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、多発性嚢胞腎における嚢胞形成機序を明らかにするために、尿細管上皮細胞における極性欠如の機序を解明することである。本研究では、ヒト常染色体劣性多発性嚢胞腎（ARPKD）モデルである PCK ラットの嚢胞性上皮細胞において嚢胞の形成増大に伴い極性の消失が進行し間葉系の形質を獲得しており、PKD の病態に EMT が関与していることが明らかになった。今後さらにその情報伝達系を解明し、病態特異的治療法の開発に発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We examined the expression of cell adhesion molecules and mesenchymal markers to clarify a loss of cell polarity in PCK rat, an ARPKD model with a mutation in the orthologue of human *PKHD1*. E-cadherin and β -catenin expression levels in cystic tubule was attenuated and localized to lateral cell-cell contacts according to cyst enlargement in PCK rats. Some epithelial cells in large cysts derived from these segments of nephron, especially in adjacent fibrotic area, showed positive immunoreactivity of vimentin and fibronectin. Vimentin and fibronectin positive cells are increased in fibrotic area around cyst. In conclusions, these findings suggested that EMT is involved in pathophysiology of PKD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児腎臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：多発性嚢胞腎 遺伝性腎疾患 上皮間葉移行 PCK ラット 間葉系マーカー

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease, PKD) は、腎の異形性を伴わない両側びまん性嚢胞形成を特徴とする遺伝性疾患のひとつである。常染色体優性遺伝型 (ADPKD) と常染色体劣性遺伝型 (ARPKD) があり、発症の原因は嚢胞を形成する尿細管上皮細胞の極性欠如であると推測される。

特に細胞接着分子である E-カドヘリンと β カテニンの複合体形成が尿細管上皮細胞の極性を誘導する過程の第一段階であることから、E-カドヘリンが細胞膜の陥凹を介して小胞を形成し、細胞内に取り込まれること (エンドサイトーシス) の異常が、嚢胞形成に関与しているのではないかという仮説のもと研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト ARPKD の原因遺伝子と相同遺伝子変異により発症する SD 系統の自然発症 PKD モデルである PCK ラットにおける嚢胞形成機序を明らかにするために、病的尿細管上皮細胞における極性の欠如の機序を解明することである。

3. 研究の方法

まず、生後 1 日、1 週、3 週、10 週、14 週、4 月の PCK ラットおよび同令の SD ラット (対照) 各令 5 匹ずつから、腎および肝の検体採取を行い、一部 -80 度で凍結保存した。E-カドヘリンおよび、 β カテニンの細胞内局在をそれぞれの抗体を用いて免疫組織化学的手法により同定した。また嚢胞形成部位の同定には PHA-E レクチン、Tamm-Horsfall protein、CalbindinD 28k、aquaporin 2 等をマーカー

として用い、尿細管部位特異的に検討した。

また、間葉系マーカーとして N-cadherin、Vimentin、Fibronectin、 α -SMA の発現を経時的かつ尿細管部位特異的に詳細に検討した。

4. 研究成果

SD ラット (正常対照) における E-カドヘリンの発現は近位尿細管で少なく、特に腎髄質外層のヘンレループ、集合管において強かった。PCK ラットにおける嚢胞形成部位は E-カドヘリンの発現の強い部位で顕著であった。 β カテニンの発現は E-カドヘリンと同様であった。また本研究の仮説の根底となる極性の欠如が PCK ラットにおいても存在することを、抗 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ モノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的手法により検討した。結果、嚢胞性上皮細胞において $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (α -subunit) の発現は認められず、極性の異常が示唆された。

N-cadherin は正常では発現がない部位において、嚢胞の形成・増大に伴い *de novo* の発現がみられた。間葉系マーカーは嚢胞周辺の腎線維化が明らかになる 10 週以降で、嚢胞性上皮細胞に陽性であった。間葉系マーカーの発現は特に線維化の強い領域の上皮細胞で強かった。

嚢胞性上皮細胞では嚢胞の形成増大に伴い極性の消失が進行し、間葉系の形質を獲得しており、PKD の病態に EMT が関与していると考えられる。

PCK ラットにおける EMT の関与が明らかになった。今後さらにその情報伝達系を解明し、病態特異的治療法の開発に発展することが期待される。

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1件)

1. Togawa H, Nakanishi K, Mukaiyama H, Hama T, Shima Y, Sako M, Miyajima M, Nozu K, Nishii K, Nagao S, Takahashi H, Iijima K, Yoshikawa N.
Epithelial-to-mesenchymal transition in cyst-lining epithelial cells in an orthologous PCK rat model of autosomal-recessive polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有り, 2011 Feb;300(2):F511-20.

[学会発表] (計8件)

1. Togawa H, Nakanishi K, Mukaiyama H, Hama T, Shima Y, Miyajima M, Nozu K, Takahashi H, Nagao S, Iijima K, Yoshikawa N.
Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in cpk Mouse, a Model of ARPKD. (43th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov. 18-Nov. 21, 2010 in Denver, USA).
2. 戸川寛子, 中西浩一, 島友子, 佐古まゆみ, 向山弘展, 宮嶋正康, 野津寛大, 吉原大輔, 長尾枝澄香, 飯島一誠, 吉川徳茂: 常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD)モデル cpk マウスの尿細管上皮細胞における上皮間葉移行 (EMT). 第44回日本小児腎臓病学会学術集会 (2010.7.1-2 大阪)

3. 戸川寛子, 中西浩一, 島友子, 佐古まゆみ, 向山弘展, 宮嶋正康, 野津寛大, 吉原大輔, 長尾枝澄香, 飯島一誠, 吉川徳茂: ヒト ARPKD と相同遺伝子変異を有する PCK rat における上皮間葉移行. 第53回日本腎臓学会学術総会 (2010.6.16-18 神戸)
4. Togawa H, Nakanishi K, Shima Y, Sako M, Miyajima M, Nozu K, Iijima K, Yoshihara D, Nagao S, Yoshikawa N, Snail1 Is Involved in Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Cyst-Lining Epithelial. (42th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Oct.29-Nov.1, 2009 in San Diego, USA)
5. 戸川寛子, 中西浩一, 島友子, 佐古まゆみ, 宮嶋正康, 野津寛大, 飯島一誠, 吉原大輔, 長尾枝澄香, 吉川徳茂: ARPKD 相同遺伝子ラットモデルの尿細管上皮細胞における上皮間葉移行 (EMT). 第44回日本小児腎臓病学会学術集会 (2009.6.26-27 東京)
6. 戸川寛子, 中西浩一, 島友子, 佐古まゆみ, 宮嶋正康, 西井一宏, 長尾枝澄香, 高橋久英, 吉川徳茂: ヒト ARPKD 相同遺伝子ラットモデルにおける尿細管部位特異的嚢胞形成. 第52回日本腎臓学会学術総会 (2009.6.3-5 横浜)
7. Togawa H, Nakanishi K, Obana M, Shima Y, Miyajima M, Nozu K, Iijima K, Nishi K, Nagao S, Takahashi H, Yoshikawa N: Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cyst-Lining Epithelial Cells in PCK Rat. *J Am Soc Nephrol* 19: 362A, 2008

(41th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov. 6-Nov. 9, 2008 in Philadelphia, USA)

8. 戸川寛子, 中西浩一, 佐古まゆみ, 尾鼻美奈, 島友子, 宮嶋正康, 西井一宏, 長尾枝澄香, 高橋久英, 吉川徳茂: 多発性嚢胞腎 (PKD) の嚢胞形成には E-cadherin/ β -catenin の破綻が関与する 第 43 回日本小児腎臓病学会学術集会 (2008. 6. 13-14 福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸川 寛子 (TOGAWA HIROKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30445093