

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06645

研究課題名(和文) 中心体に依存しない微小管の機能不全がひきおこす嚢胞腎形成の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cystic kidney formation caused by non-centrosomal microtubule dysfunction

研究代表者

戸谷 美夏 (Toya, Mika)

早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付)

研究者番号：80455360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓にできる嚢胞は、50才以上のヒトの半数がもつと言われる。その多くは症状を示さず良性であるが、多発性嚢胞腎など遺伝的な病気と原因遺伝子が知られ、分子機構の解明を目指す研究がなされている。しかしながら、腎嚢胞が形成されるしくみは、未だ多くのことが分かっていない。我々は、尿細管壁を構成する上皮細胞での微小管編成の乱れが、尿細管を拡張させ、嚢胞腎をひきおこすことを見出した。本研究では、変異マウスを用いて、精緻な構造をもつ腎組織における、尿細管の微小領域の組織・細胞形態の変化と、それに連携する遺伝子発現変動をとらえ、上皮微小管が司る嚢胞腎形成の分子機構に関わる候補因子をとらえることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ多くのことが明らかになっていない腎嚢胞形成の分子メカニズムについて、新たな遺伝子発現のデータセットが得られた。今回の研究では、腎嚢胞を、尿細管の拡張、さらに、尿細管の壁を構成する上皮細胞の形態変化としてとらえた。微小領域を採取しての解析からは、組織をばらしての1細胞解析で得ることができない、組織・細胞の形態変化と遺伝子発現変動を連携させた発現遺伝子のプロファイルが得られた。進行中の解析から、細胞内の微小管編成がつかさどる嚢胞腎形成の新たな分子メカニズム、および、腎臓がその精緻な構造とそれともなう機能を維持するしくみの理解が深まり、基礎生物学、基礎医学に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：Renal cysts are found in approximately half of all people aged 50 and over. Most of the cysts are benign and exhibit no symptoms; however, certain genetic disorders, such as autosomal dominant polycystic kidney disease, and the associated responsible genes are known. While extensive research has been conducted on the molecular mechanisms underlying the formation of renal cysts, many aspects remain unclear. We previously found that disturbances microtubule organization of epithelial cells in renal tubule walls may lead to tubular dilation and subsequently result in cystic kidneys. This study conducted transcriptome analyses by using extracted RNA from the microtissues of mutant mice. We examined the gene expression profiles associated with the change in tissue and cell morphology in the complex structure of renal tubular microregions. The results revealed potential factors involved in the molecular mechanism of cystic kidney formation, mediated by epithelial microtubules.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 微小管編成 腎臓 嚢胞腎 微小管マイナス端 CAMSAP3 変異マウス 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

多くの臓器を構成する主要な細胞である上皮細胞は、頂端—基底の極性をもって機能する。上皮細胞内で、微小管は、頂端—基底軸に沿って配列する特徴的な編成を示す。この上皮細胞に特徴的な微小管編成(上皮微小管編成)は、上皮細胞が正しく機能するために重要であると考えられているが、生体内での役割と編成の制御については、いまだ多くのことが明らかになっていない。我々は、微小管端結合タンパク質 CAMSAP3 が、細胞の頂端面に微小管の端を繋ぎ止めることで上皮微小管編成の鍵となることを見出し、変異マウスを用いた研究を進めている。

本研究を開始するまでに、*Camsap3* 変異マウスの腎臓に、多発性嚢胞腎の特徴を示す顕著な構造異常を見出していた。高齢の *Camsap3* 変異マウスでは、左右両側の腎臓が肥大し白色化して泡のような構造を多数もつ。解析の結果、*Camsap3* 変異をもつ腎臓では、糸球体に近い尿細管(近位尿細管)が、部分的に拡張することが分かった。拡張した尿細管の管腔を構成する上皮細胞では、細胞と核の形態が扁平になり、細胞増殖が亢進する。微小管は、頂端—基底の配列を保つことなくランダムに配置して、上皮微小管編成が乱れる様子が観察された。扁平化した上皮細胞の核内には、細胞増殖や細胞移動、細胞分化などのさまざまな細胞応答を誘導する転写共役因子である YAP が局在するという、予備的な結果も得ていた。YAP は、核内と細胞質を行き来し、その局在制御には、いくつかのシグナル伝達経路に関わることが知られる。YAP が核内で働くことにより、発現が調節される遺伝子は多岐にわたる。また、CAMC3 の機能欠損により嚢胞を形成した上皮細胞内では、核の形態が扁平に変形する。核の形態の変化は、核内のクロマチンの配置や構造に影響を与え、その結果として遺伝子の発現が変化することが知られる。

CAMSAP3 の機能欠損が、なぜ、どのように近位尿細管の拡張を引き起こして多発性の嚢胞腎を形成するのか。CAMC3 を欠損した腎臓の細胞と、野生型の細胞で発現変動する遺伝子を探出し、その分子メカニズムを明らかにしたいと考えていた。

2. 研究の目的

本研究では、CAMC3 の機能欠損がひきおこす多発性の嚢胞腎について、組織・細胞形態(尿細管の拡張、拡張領域の上皮細胞の形態)を指標に、形態の変化に連動して発現変動する遺伝子群を同定することを具体的な目的とし、以下の項目を明らかにすることを目指した。

- (1) CAMC3 (非中心体微小管のマイナス端に結合するタンパク質) の機能欠損によって、多性の嚢胞腎が生じる分子メカニズム
- (2) 上皮細胞が、体内の異なる臓器・組織で共通して編成する、頂端—基底軸に沿った非中心体微小管の生理的意義

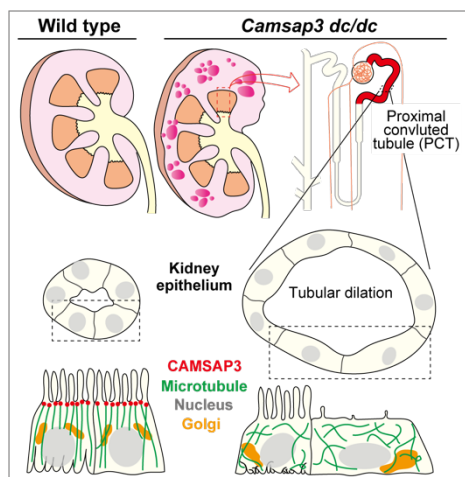
3. 研究の方法

組織・細胞形態を指標とした腎微小領域の遺伝子発現解析

腎臓は、糸球体と尿細管から成る最小機能単位であるネフロンが多数集まって形成される複雑な構造をもつ。*Camsap3* 変異マウス腎臓組織で、糸球体、皮質部分に局在し拡張が見られる近位尿細管、および、髓質部分を構成する集合管について、組織形態・細胞形態情報を指標に微小領域を選定した*。選定したそれぞれの微小領域(100 μm φ)を打ち抜いてサンプルとし、遺伝子発現解析をおこなった。

*組織形態・細胞形態を指標として選定した微小領域:

野生型(WT)、*Camsap3* ノックアウト(KO)および、ヘテロ(hetero)マウスから、糸球体(Glo)、近位尿細管(PT)、集合管(CD)、*Camsap3* KO マウスにおいては、尿細管拡張の度合いも識別し、拡張なし(PT)、拡張あり(PTSC: PT Small Cyst)、拡張かつ上皮細胞の扁平化あり (PTLC: PT Large Cyst)各領域を選定した。



腎組織の微細構造を保持しながら、遺伝子発現解析に耐える品質の RNA が得られる試料を目指した固定条件、染色条件等の検討・調整を行い、固定後パラフィン包埋から HE 染色を行う方法、無固定組織を凍結包埋から HE 染色する方法に適用した。

微小領域の打ち抜きサンプリング～遺伝子発現解析を行うためのシーケンスデータの収集は、創薬等先端技術支援プラットフォーム (BINDS) を窓口とし、早大生命医科学科竹山研究室の支援を受けて行った。

4. 研究成果

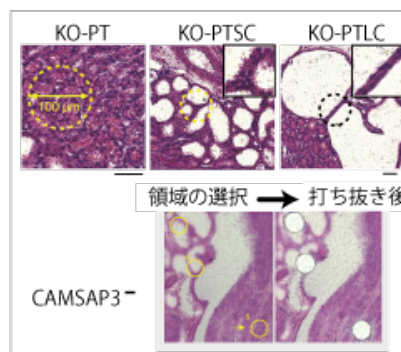
本研究から以下の成果が得られた。

(1) *Camsap3* の機能欠損が示す腎臓の構造異常 (**Mitsuhata et al., 2021 Scientific Reports)

Camsap3 変異マウスで形成される嚢胞腎は、これまで嚢胞腎形成の原因として広く知られていた一次繊毛の形成異常とは異なる、新たなしくみで形成されることがわかった。すなわち、CAMSAP3 タンパク質の機能が欠損すると、腎上皮細胞内の微小管編成が乱れることにより細胞の形態維持に支障を来し、その結果、メカニカルな力 (原尿圧を推測) に抵抗できなくなった細胞が引き延ばされ、尿細管が拡張することで、嚢胞を形成すると推測された。*Camsap3* 変異マウスでは、尿細管が拡張する前から、細胞がメカノストレスを感知して遺伝子発現に変化が生じる可能性も示唆された。上皮細胞に特徴的な微小管編成の生理的な役割を明らかにし、嚢胞腎形成の新たな機構を示唆する結果として、論文にまとめて発表した。

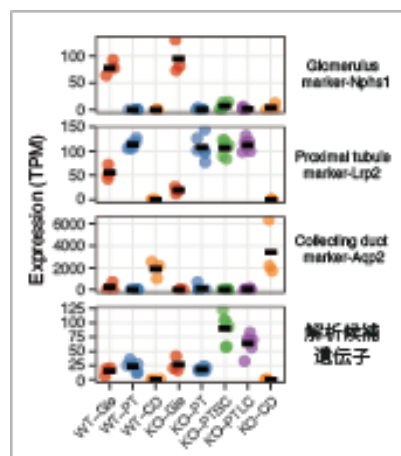
(2) 腎組織の微小領域における遺伝子発現解析に適した試料作製条件

腎組織の微細構造を保持しつつ、遺伝子発現解析に耐える品質の RNA が得られる試料を目指して、固定条件、染色条件等を検討した。その結果、固定後パラフィン包埋から HE 染色を行う方法、無固定組織を凍結包埋から HE 染色する方法ともに、細胞形態を指標にした微小領域の選択・採取が可能で (右図)、かつ、発現解析に適応する品質の RNA 抽出が可能になった。



(3) 発現遺伝子情報の取得と発現変動解析

野生型マウスと *Camsap3* 変異マウスの腎組織切片から採取した糸球体、近位尿細管、集合管領域のサンプル (WT-Glo, WT-PT, WT-CD, KO-Glo, KO-PT, KO-PTSC, KO-PTLC, hetero-Glo, hetero-PT, hetero-CD) それぞれから、約 55,000 遺伝子 (annotated sequences) の発現情報を得た。既知のマーカー遺伝子の発現量を検証すると、細胞形態から予測されるマーカー遺伝子の発現が領域ごとに矛盾なく確認され、本研究の遺伝子発現解析で、組織・細胞形態変化と遺伝子発現プロファイルを連携できたと考える (右図)。発現変動解析から、以下のことがわかった。



(3)-1 WT, KO, hetero 間で、糸球体 Glo, 近位尿細管 PT, 集合管 CD 各領域に発現する遺伝子を比較した結果、*Camsap3* KO の PT において、WT, hetero と比べて顕著な発現変動がみられた。Glo では *Camsap3* KO による発現変動はほぼみられず、CD では僅かな変動が見られた。

(3)-2 *Camsap3* KO において、PT, PT-SC, PT-LC を比較した結果、尿細管の拡張度合いによって発現変動する遺伝子群がとらえられた。WT-PT との比較では、有意な発現変動遺伝子は、KO マウスの嚢胞形成初期 (KO-PTSC) で、KO-PT よりも多く検出された。KO-PTSC で発現上昇が見られる遺伝子群は、嚢胞の拡大 (KO-PTLC) に伴い発現量が減る傾向を示す (図中例: 解析候補遺伝子)。尿細管の拡張時に尿細管壁にかかる力の変化 (原尿の流量が一定の場合、尿細管がひとたび拡張すると弱まる) の影響をとらえた可能性が考えられる。

解析は進行中であり、論文投稿準備中。

研究協力者：角井康貢博士、佐藤政充博士 (早稲田大学先進理工学研究科佐藤研究室)

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 Mitsuhata Yuto, Abe Takaya, Misaki Kazuyo, Nakajima Yuna, Kiriya Keita, Kawasaki Miwa, Kiyonari Hiroshi, Takeichi Masatoshi, Toya Mika, Sato Masamitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Cyst formation in proximal renal tubules caused by dysfunction of the microtubule minus-end regulator CAMSAP3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85416-x	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 曾場友理奈、光畑有統、竹市雅俊、戸谷美夏、佐藤政充
2. 発表標題 微小管マイナス端結合タンパク質 CAMSAP3の機能不全は腎臓の嚢胞形成を引き起こす
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mika Toya
2. 発表標題 Cyst formation in renal tubules caused by dysfunction of the microtubule regulator CAMSAP3
3. 学会等名 Joint Symposium between Waseda University and the University of Bonn（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸谷美夏、竹市雅俊、佐藤政充
2. 発表標題 微小管マイナス端結合タンパク質CAMSAP3の機能欠陥がひきおこす嚢胞腎
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

嚢胞腎の形成に関わる新たな遺伝子を発見
<https://www.waseda.jp/top/news/72092>
嚢胞腎の形成に関わる新たな遺伝子を発見 - 微小管の異常はなぜ腎臓の異常を引き起こすのか -
<https://www.lsb.sci.waseda.ac.jp/news/news-research/20210320/post-305/>

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
研究協力者	佐藤 政充 (Sato Masamitsu)		
研究協力者	角井 康貢 (Kakui Yasutaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------