

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08162

研究課題名（和文）組織トランスグルタミナーゼに着目した多発性嚢胞腎病態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 treatments based on pathophysiology of polycystic kidney disease with a focus on tissue transglutaminase

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、多発性嚢胞腎（PKD）の複数の基本的病態生理における組織トランスグルタミナーゼ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。

R3年度まではPKD培養細胞系とARPKD動物モデル由来組織における、組織トランスグルタミナーゼ発現と、これまでに蓄積されているARPKDモデルにおけるmiRNAデータとの関連を軸として、病態解析を進めてきた。

R4年度はさらにリアルタイムPCR、ウエスタンブロッティング、免疫染色の手法で解析を進めている。

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組織トランスグルタミナーゼ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 of tissue transglutaminase in multiple basic pathophysiological processes of polycystic kidney disease (PKD) and its mechanisms, to obtain basic knowledge for the development of pathophysiology-based disease-specific therapies by modifying them, and to confirm their efficacy in humans by using animal models for their application. The research is to confirm the efficacy of the treatment by using model animals for its application to humans.

Until R3, we have been analyzing the pathophysiology of ARPKD by focusing on the relationship between tissue transglutaminase expression in cultured PKD cell lines and ARPKD animal model-derived tissues and the miRNA data accumulated so far in the ARPKD model.

In R4, we are further analyzing the data by real-time PCR, Western blotting, and immunostaining.

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 組織トランスグルタミナーゼ 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、多発性嚢胞腎 (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- β ・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。さらに、継続性を重視しより精度の高い研究を進めるために、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検討を進め報告してきた (Am J Physiol Renal Physiol 2017; 313: F1223-F1231)。PKDの尿細管上皮細胞は、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組織トランスグルタミナーゼの関与およびその機序は不明である。

組織トランスグルタミナーゼ (トランスグルタミナーゼ2型) は、他のトランスグルタミナーゼと異なり、その分布が内皮細胞、線維芽細胞等生体内に広く存在する。組織トランスグルタミナーゼは、タンパク質架橋化作用以外にも、GTP加水分解活性、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性/リン酸化活性、インテグリン細胞接着活性など数多くの活性を有する多機能酵素であり、アポトーシス促進、血管新生、創傷治癒、転写調節因子制御、細胞分化、線維化促進、細胞外基質安定化等の多くの生体機能を有しており、新しい創薬のターゲットとして注目を浴びている (J Med Chem 2017; 60: 554-567)。

2. 研究の目的

本研究では組織トランスグルタミナーゼが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- β ・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組織トランスグルタミナーゼ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を紹介する組織トランスグルタミナーゼの関与に着目した。

(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。

本研究で使用している 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、一次線毛関連蛋白で、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は、PKD と組織トランスグルタミナーゼ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。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 と組織トランスグルタミナーゼ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。それらが PKD の病態に関与するデータを得て、組織トランスグルタミナーゼとの関与を検討中である。

R3 年度までは PKD 培養細胞系と ARPKD 動物モデル由来組織における、組織トランスグルタミナーゼ発現と、これまでに蓄積されている ARPKD モデルにおける miRNA データとの関連を軸として、病態解析を進めてきた。

R4 年度はさらにリアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング、免疫染色の手法で解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 中西浩一	4. 巻 14
2. 論文標題 多発性嚢胞腎と移行期医療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 184-191
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 14
2. 論文標題 ARPKD 1) 病態生理と治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 560-566
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 森貞直哉, 野津寛大, 中西浩一, 飯島一誠	4. 巻 28
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 発達腎研究会誌	6. 最初と最後の頁 33-35
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 73
2. 論文標題 多発性嚢胞腎	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児科臨床	6. 最初と最後の頁 782-785
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 89
2. 論文標題 多発性嚢胞腎 - ARとADを含めて -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 856 - 861
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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Wada T, Shima Y, Tanaka Y, Mukaiyama H, Morisada N, Nozu K, Iijima K, Nakanishi K.
2. 発表標題 Two male relatives with OFD1 mutations.
3. 学会等名 The 18th Japan-Korea-China pediatric Nephrology Seminar 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimabukuro W, Yoshino M, Takeichi M, Omura J, Yokota C, Yamamoto J, Takahashi Y, Nozu K, Morisada N, Iijima K, Nakanishi K.
2. 発表標題 A case of Potter sequence with WT1 gene mutation.
3. 学会等名 The 14th Asian Congress of Pediatric Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西浩一
2. 発表標題 ARPKD 今できること,そして今後の課題
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 成田一衛、他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 92
3. 書名 エビデンスに基づく多発性嚢胞腎PKD診療ガイドライン2020	

〔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)	

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
---------	---------