

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 年 月 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590444

研究課題名（和文）腎尿細管間質線維化を促進または抑制する調節分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of promotion or suppression in renal tubular interstitial fibrosis

研究代表者：村垣 泰光

(MURAGAKI YASUTERU)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40190904

研究成果の概要（和文）：毛髪・鼻・指節異形成症の原因遺伝子である TRPS1 は腎ネフロン の発生には不可欠で骨形成因子 Bmp7 の下流で働く。Bmp7 は上皮細胞が間葉細胞に分化転換すること（上皮間葉移行）を抑制して慢性腎障害を元に戻すので、我々は腎線維化における Trps1 の機能を検索した。実験の結果、Trps1 欠損はユビキチンを介するプロテオソーム分解酵素である Arkadia による Smad7 の量を調節することにより、TGF- β 1 で誘導される上皮間葉移行と腎間質尿細管線維化を亢進することを示した。

研究成果の概要（英文）：Mutations in TRPS1 cause tricho-rhino-pharyngeal syndrome. Trps1 is essential for nephron development, acting downstream of Bmp7. Because Bmp7 counteracts epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and reverses chronic renal injury, we examined the function of Trps1 in renal fibrosis. The results of the experiment suggest that Trps1 deficiency enhances TGF- β 1-induced EMT and tubulointestinal fibrosis by modulating the amount of Smad7 through Arkadia/ubiquitin-mediated degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物、線維化、上皮間葉転換、TGF- β

1. 研究開始当初の背景

腎臓の慢性炎症後における線維化の病因として TGF- β を介する腎尿細管の上皮間葉移行という現象が考えられていた。

2. 研究の目的

上皮間葉移行がどのような因子により亢進

するか、または抑制されるかを検索し、腎尿細管間質の線維化機構を知ること。

3. 研究の方法

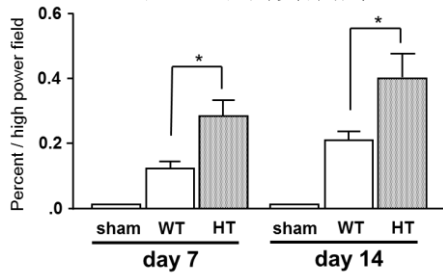
毛髪・鼻・指骨異形成症 (TRPS) の原因遺伝子である TRPS1 のノックアウトマウスを用いて腎線維化モデルを作成して、その線維化

の程度と細胞内の TGF- β シグナルが正常野生型マウスと比較してどのように変化しているかを、形態学および生化学的に検索する。

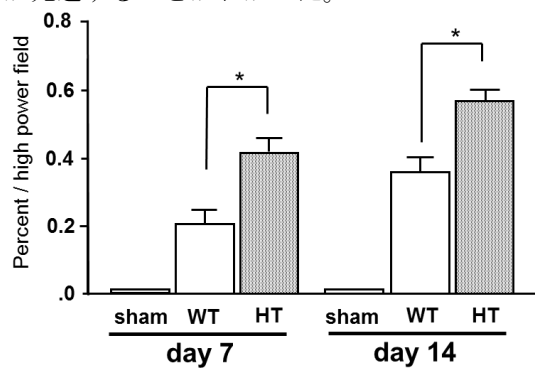
4. 研究成果

(1) Trps1 は成人マウスの近位尿細管の核に局在する。Trps1 に対する特異抗体を用いて腎臓での局在を検索した結果、近位尿細管上皮の核に局在することがわかった。

(2) Trps1 の半分欠損 (HT) マウスでは片側尿管結紮 (UUO) の後の腎線維化を促進した。腎組織を 1 型コラーゲン抗体で免疫組織した結果下図のように UUO 後 1 週、2 週ともに HT マウスで腎間質線維化が亢進した。



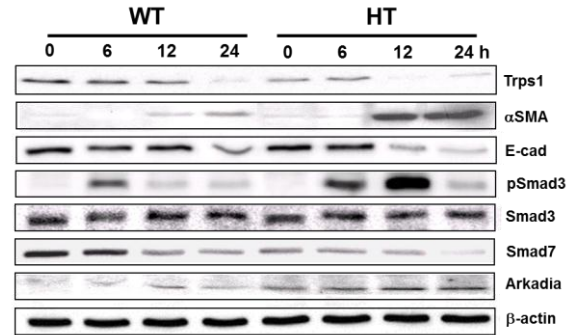
(3) Trps1 HT マウスでは UUO の後に TGF- β /Smad3 シグナルが促進する。UUO 後の腎臓をリン酸化 Smad3 抗体で染色すると Trps1 HT マウスで下図に示すように染色性が亢進することがわかった。



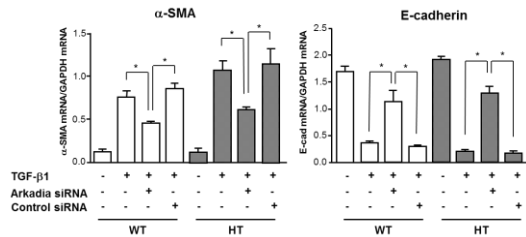
(4) 腎線維化の程度は Trps1 と Smad7 蛋白の量に関連する。腎線維化の進行度と共に腎臓で発現する蛋白量を測定すると、Trps1 が漸減するのと並行して Smad7 の量が著減した。また上皮間葉移行に関連する蛋白である E-cadherin が減少したのに対して α -SMA が HT で 2 倍上昇した。さらにプロテオソーム分解酵素である Arkadia とリン酸化 Smad3 の量も HT では WT の 2 倍増加した。

(5) 培養細胞においても TGF- β によって誘導される上皮間葉移行は Trps1 HT 細胞で亢進しており、それは Smad7 蛋白が減少する結果、TGF- β /Smad3 シグナルが亢進するためであることが考えられた。また Smad7 の減少

は Arkadia の増加によるものであることが考えられた。培養細胞に TGF- β を添加した時の野生型および HT マウスからの培養腎尿管上皮の蛋白の変動をみたウエスタンブロットの結果を下図に示す。



(6) Arkadia をノックダウンすると TGF- β で誘導される上皮間葉移行反応を元の状態に戻すことができることを見出した。SiRNA を前処理して Arkadia の発現を抑制しておいて、TGF- β を添加すると上皮間葉移行に関連する α -SMA と E-cadherin の発現を上皮間葉移行を起こさせない状態に戻すことができた。これを示した図を下に示す。



以上の結果より Trps1 は Arkadia を抑制することにより Smad7 の蛋白量を調節し、Smad3 のリン酸化を抑制することによって過剰な上皮間葉移行を抑制するという分子機構を示すことができた。

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 6 件)

1. Kawakatsu M, Kanno S, Gui T, Gai Z, Itoh S, Tanishima H, Oikawa K, Muragaki Y. Loss of Smad3 gives rise to poor soft callus formation and accelerates early fracture healing. *Exp Mol Pathol*. 90(1):107-15, 2011. 査読有
2. Kanno S, Gui T, Itoh S, Gai Z, Sun Y, Oikawa K, Yoshida M, Muragaki Y. Aberrant expression of the P2 promoter-specific transcript Runx1 in epiphyseal cartilage of Trps1-null mice. *Exp Mol Pathol*. 90(2):143-8, 2011. 査読有
3. Gai Z, Gui T, Muragaki Y. The function of

- TRPS1 in the development and differentiation of bone, kidney, and hair follicles. *Histol Histopathol.* 26(7):915-21. Review, 2011. 査読有
4. Ryohei Nishioka, Shunji Itoh, Ting Gui, Zhibo Gai, Kosuke Oikawa, Manabu Kawai, Masaji Tani, Hiroki Yamaue, and Yasuteru Muragaki. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. *Exp. Mol. Pathol* 89: 149-157, 2010. 査読有
5. Zhibo Gai, Gengyin Zhou, Ting Gui, Shunji Itoh, Kosuke Oikawa, Kohsaku Uetani, and Yasuteru Muragaki. Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression. *J. Am. Soc. Nephrol* 21: 1468-1476, 2010. 査読有
6. Gai Z, Zhou G, Itoh S, Morimoto Y, Tanishima H, Hatamura I, Uetani K, Ito M, Muragaki Y. Trps1 functions downstream of Bmp7 in kidney development. *J Am Soc Nephrol.* 20(11):2403-11, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
1. Shunji Itoh, Yujing Sun, Ting Gui, Aiko Shimokado, Motohisa Kawakatsu, Kosuke Oikawa, Takashi Ozaki, and Yasuteru Muragaki. Gdf5/Trps1 signaling regulates Prg4 expression in the superficial cells of the articular cartilage. 日本分子生物学会年会 2011年12月、横浜
2. 桂 婷、孫玉静、伊藤俊治、及川恒輔、村垣泰光 : カルシウム輸送体をターゲットにするマイクロRNAはリンで誘導される血管平滑筋細胞の石灰化に関与している 第43回日本結合組織学会学術大会 2011年6月、別府
3. 桂 婷、伊藤俊治、及川恒輔、村垣泰光 : Vascular calcification is suppressed by the inhibition of microRNAs targeting calcium channels. 第100回日本病理学会総会、2011年4月、横浜
4. Gui T, Sun Y, Shimokado A, Itoh S, Oikawa K, Muragaki Y. MicroRNAs induced by high concentration of phosphate and calcium are involved in vascular smooth muscle cell calcification. American Society of Nephrology, Philadelphia, USA, 2011
5. 伊藤俊治、谷島裕之、蓋 志博、桂 婷、神埜聖治、川勝基久、及川恒輔、村垣泰光。Gdf5/Trps1 は関節形成軟骨細胞の分化を調節する。日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会、2010年12月、神戸
6. Kosuke Oikawa, Takayuki Hiroi, Shunji Itoh, Ting Gui, Zhibo Gai, Masakatsu Takanashi, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. The PRG4 variants associated with sarcoma development have a potential to be therapeutic targets. 日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会、2010年12月、神戸
7. Zhibo Gai, Gui Ting, Shunji Itoh, Kosuke Oikawa, Kohsaku uetani, Yasuteru Muragaki. Renal interstitial fibrosis is promoted through an elevated amount of Arkadia in heterozygous loss of Trps1. 第53回日本腎臓学会学術総会、2010年6月、神戸
8. Trps1 is required for the mesenchymal-epithelial transition and ureteral bud branching. 蓋 志博、伊藤俊治、谷島裕之、上谷光作、伊藤正孝、村垣泰光 第32回日本分子生物学会年会(2009、12月 横浜)
9. Functions of Gdf5 and Trps1 in phalangeal joint formation. 伊藤俊治、毛利泰輔、山下友佑、蓋 志博、神埜聖治、及川恒輔、上谷光作、村垣泰光 第32回日本分子生物学会年会(2009、12月 横浜)
10. 腎尿細管間質線維化における間質細胞の機能と役割 村垣泰光 第98回日本病理学会総会ワークショップ (2009、5月、京都)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakuibu/160417/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村垣 泰光 (MURAGAKI YASUTERU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40190904

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：