

機関番号：24303
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790818
 研究課題名（和文） 腎特異的Erk1/2ダブルノックアウトマウスを用いたErkの機能解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of ERK signaling pathway in ERK1/2 kidney specific knockout mice
 研究代表者
 杉山 紀之（SUGIYAMA NORIYUKI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：90381954

研究成果の概要（和文）：

腎臓の形態を正常に維持する事に機能していると考えられるErkの解析を行った。腎障害後の再生時にErkの活性化が認められ、partial knockdownマウスで虚血再灌流障害を起こしたところ、腎再生に若干の遅延が認められた。また、inv嚢胞腎でcanonical Wntシグナルが活性化していないこと、尿細管上皮細胞の細胞分裂方向の乱れが最初に起きる事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study is that analysis of Erk in kidney. We obtained that Erk functioned renal regeneration after ischemia-refusion.

The next study indicates that random oriented cell division is an initial event for renal tubule expansion and precedes cell proliferation in inv mutant kidneys. However, our results do not support the hypothesis that the canonical Wnt signaling pathway is involved in renal cyst development of inv mutant mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学、嚢胞腎

1. 研究開始当初の背景

我々は平成17年～18年度科研費若手研究（B）腎臓内科学の採用研究により、家族性若年性ネフロン癆（Nephronophthisis, NPHP）type2モデルマウス（invマウスあるいはinvΔCマウス：Mochizuki *et al.* 1998. *Nature*. 395, 177-181; Watanabe *et al.* 2003. *Development*. 130, 1725-1734）を用いて、尿細管上皮細胞の細胞増殖が亢進して、尿細

管構造が破綻することを報告した（*Genes to Cells*. 2006 11, 1213-1224）。さらに平成19年～20年度科研費若手研究（B）腎臓内科学の採用研究により、MAPK familyのうちの嚢胞ではErkが異常活性化されていることを見出した（図1 & 2）。また、正常な腎臓ではErkの活性化は低いレベルで維持されていることが明らかにした（図2）。さらにErkの上流因子であるMEKの阻害剤であるPD184352の

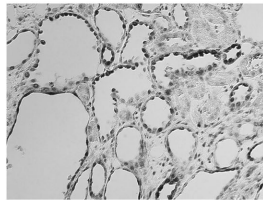


図1. 嚢胞腎の尿細管上皮細胞におけるErkの異常活性

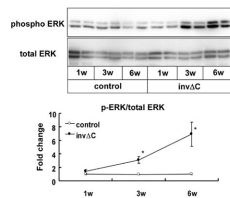


図2. 正常腎と嚢胞腎におけるErkの活性



図3. MEK阻害剤投与による嚢胞進展の抑制
(左: 正常、中央: 阻害剤投与、右: 嚢胞腎)

投与により、嚢胞化および細胞の異常増殖が抑制される(図3)を確認しており、この結果は現在投稿中である。

以上のことより、Erkの異常な活性化は尿細管構造を破綻させる事を明らかにした。つまり、活性化Erkを低いレベルのまま維持する事が尿細管構造を正常に維持するのに重要である。また、尿細管上皮細胞の増殖にはErkの活性化が必要であることが示唆された。しかしながら、腎臓の正常発生におけるErkの機能はまったく不明である。

既にErk1遺伝子欠失マウスは腎臓において異常を呈さないことが報告されている(Pages *et al.* 1999 *Science* 286, 1374-7; Selcher *et al.* 2001 *Learn Mem*, 8 11-9; Nekrasova *et al.* 2005 *J Immunol*, 175 2374-80)。また、Erk2遺伝子欠損マウスは胎盤不形成のため初期胚で胎生致死であるため、腎臓での解析は不可能である(Saba-El-Leil *et al.* 2003 *EMBO Rep*, 4 964-8; Hatano *et al.* 2003 *Genes Cells*, 8 847-57)。さらに、様々なMAP kinaseカスケードの阻害剤(MEK inhibitorなど)が投与されているが、異常に活性化したErkを抑制することは可能であるが、完全にその活性を抑制することはできない(Omori *et al.* 2006 *J Am Soc Nephrol*, 17 1604-14) ために実際の機能解析には至っていない。

2. 研究の目的

そこで、我々は尿細管特異的Erk遺伝子欠失マウスの表現型を観察することにより、Erkの腎臓での機能を明らかにする事を目的とする。Erk遺伝子欠失マウスとしてErk1

nullマウスとErk2 conditional knockoutマウスを交配させ、さらに胎生期からの尿細管上皮細胞で特異的に発現するcadherin-16のpromoterを用いたCre transgenicマウス(Ksp-CRE tg mice; Shao *et al.* 2002 *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1837-1846)を交配し、胎生期からの尿細管上皮細胞特異的にErk1/2の遺伝子欠失マウスを作製する。さらに、成体近位尿細管でのErkの機能解析のためにCre transgenicマウスをTamoxifen誘導型のNDRG-CreERT2 transgenicマウスに変えて、成体時期のみでのErk遺伝子欠失を行う。次に、正常状態だけでなく、次に挙げる二つの病的な状態における腎臓でのErkの働きを解析し、Erkの腎臓、特に尿細管上皮細胞での機能を詳細に明らかにすることを目的とする。

- (1) 腎臓を虚血状態にすると急性尿細管壊死(ATN)が起き、その後再灌流する事により尿細管が再生する事が知られている。その再生時において発生過程に腎臓形成に機能している因子が尿細管再生時にも働いていることが既に報告されている(Terada *et al.* 2003. *J Am Soc Nephrol* 14, 1223-33)。しかしながら、再生へのErkの関与は全くわかっていない。我々は再生時にErkが活性化することを既に確認している。そこで、Erk遺伝子欠失マウスに対して虚血再灌流障害を起こさせ、その後の尿細管再生時におけるErkが果たす役割を明らかにすることを目的とする。
- (2) 尿細管上皮細胞の異常増殖により尿細管構造が破綻する嚢胞腎において、その異常増殖とErkの関連を明らかにする。我々が保持している発症段階の異なる3種類のNPHP2モデルマウスとErk遺伝子欠失マウスを交配させ、尿細管拡張時における上皮細胞の異常増殖とErkとの関連を解析する。

さらに、嚢胞腎において、尿細管を拡張させる細胞内シグナル伝達系を明らかにすることを目的として、Erk経路以外に尿細管の構造維持に必要な細胞内シグナル伝達系を明らかにする。

3. 研究の方法

Erk 1/2 遺伝子欠失マウスに対して2種類のCreマウスを用いて、尿細管でのErkの機能を明らかにする。また、NPHP2モデルマウス3種類を各々掛け合わせ、Erk 遺伝子欠失

が NPHP モデルマウスの嚢胞腎進展に与える影響を解析する。さらに、腎動脈結紮による虚血再灌流障害である尿細管壊死 (ATN) を Erk 1/2 遺伝子欠失マウスで起こし、尿細管再生時における Erk の機能を明らかにする。

表現型の解析方法としては最初に次に挙げる項目を実施して Erk シグナルが関与しているかを明らかにする。

- (1) 体重
- (2) 腎重量
- (3) 組織学的解析 (形態観察、尿細管径など)
- (4) 細胞増殖 (BrdU の取込率、PCNA, cyclin family の western blot)
- (5) 細胞死 (Tunnel 法による Apoptosis の検出)
- (6) 繊維化 (anti-SMA, anti-collagen IV antibody の免疫染色)
- (7) 腎機能 (クレアチニン、BUN の測定)
- (8) Erk の発現 (Western blot 法、免疫組織化学染色)

また、嚢胞腎における Erk 以外の細胞内シグナル伝達系の働きについての解析を行った。まずは MAPK シグナル伝達系、Stat シグナル伝達系について経時的に Western blot 法を用いて解析した。Wnt シグナルについては、同様に Western blot 法、免疫組織化学染色による解析を行い、さらに canonical Wnt シグナルのレポーター遺伝子を組み入れたトランスジェニックマウス (BATlacZ tg mice) を用いて、in vivo での観察を行った。

4. 研究成果

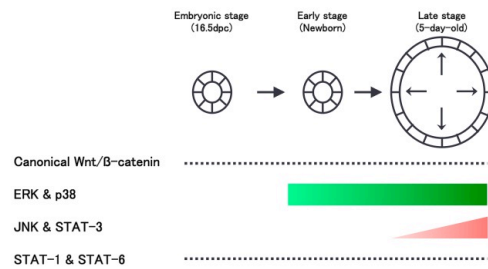
本研究は腎臓での Erk の機能を明らかにすることを目的として、Erk1/2 ダブルノックアウトマウスの作製を行い、恒常時、嚢胞腎および急性腎不全における Erk の機能解析を行う計画であった。現在までに Erk1 null マウスおよび Erk2 conditional knockout マウスを作製し、Erk2 遺伝子を欠失させるための Ksp-CRE transgenic マウスも既に作製し、前述のマウスたちと交配した。しかしながら、残念なことに本研究で用いた Ksp-CRE transgenic マウスでは完全に Erk2 の発現を抑制することができなかった。そこで、タモキシフェン誘導型 Ksp-CRE transgenic マウスを作製し、前述のマウスと交配中であり、解析途中である。

また、腎動脈結紮による虚血再灌流障害を起こし、尿細管再生時の Erk の活性化の変化を

調べたところ、再生時の尿細管上皮細胞が増殖する時期と相関して、Erk の発現量が上昇していることを明らかにした。そこで、Ksp-CRE transgenic を用いた partial knockdown マウスで虚血再灌流障害を起こしたところ、腎再生に若干の遅延が認められた。まだ、完全な null マウスで検討していないため、寄与範囲を明らかにすることができていないが、尿細管再生時に Erk が機能していることは明らかであり、世界で最初の報告となることを期待している。この尿細管再生への Erk の寄与および機能が明らかとなれば、尿細管再生を誘導する方法へのとっかかりとなることが期待でき、非常に有用な結果を得る事に成功した。

また、これらの研究の過程で、嚢胞腎で活性化しているシグナル伝達系を解析した。その結果を図 4 に示す。この中で、MAPK カスケードである ERK と p38 MAPK が出生時より活性化している事が観察された。嚢胞腎で認められる異常な細胞増殖も出生時から認められる事から、これらのシグナル伝達系が嚢胞腎で

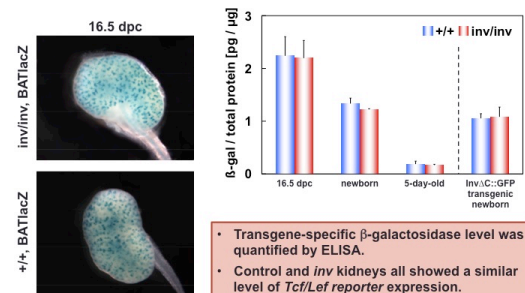
図4. Summary of signaling pathway in *inv* kidney



の尿細管上皮細胞の異常な細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

また、我々が標的としている *inv* の欠失は既に canonical Wnt シグナルを活性化していると報告されている。そこで、我々は β -catenin の核局在を腎臓の免疫組織化学染色および細胞分画して western blot 法で観察したところ、 β -catenin の核局在はなかった。さらに、Wnt シグナルのレポーター遺伝子を組み入れたトランスジェニックマウス (BATlacZ tg

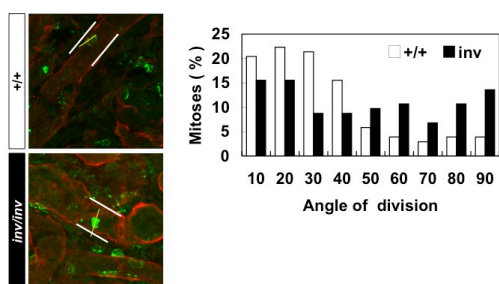
図5. The absence of *inv* was not activated in canonical Wnt pathway in Tcf/Lef-reporter mice



mice) をinvマウスと交配して、嚢胞腎での canonical Wntシグナルを観察した(図5)。先の実験結果と同様に、嚢胞腎で canonical Wntシグナルの活性化は認められなかった。この事は既に定説化されているinvの機能を大きく否定するものであり、非常に価値がある報告となった。

さらに、non-canonical Wntシグナルの一つであるPCPシグナルについて注目した。このシグナル経路はまだ明らかにされていないため、我々は平面極性の異常により引き起されるであろう尿細管上皮細胞の細胞分裂方向の乱れについて解析した(図6)。その結果、inv嚢胞腎の尿細管上皮細胞の細胞分裂方向はランダムであり、正常腎の尿細管の長軸に沿って分裂する現象とは異なっている事を明らかにした。これにより、invがPCPシグナルが機能している可能性を示唆するものであり、今

図6. Loss of Inv protein leads to random angle of cell division in renal tubular epithelial cells



後の解析に期待が持たれる。

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5件)

- (1) . Okumura Y, Sugiyama N, Tanimura S, Nishida M, Hamaoka K, Kohno M, Yokoyama T. “ERK regulates renal cell proliferation and renal cyst expansion in *inv* mutant mice.” *Acta Histochem Cytochem.* 42(2), 39-45. (2009) 査読あり
- (2) . Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Miyabayashi K, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Sugimoto Y, Okuno Y, Kodama R, Iizuka-Kogo A, Senda T, Sasaoka T, Kitamura K, Aizawa S, Morohashi KI. “Abnormal Epithelial Cell Polarity and Ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression Induced in *Emx2* KO Embryonic Gonads.”

Endocrinology. 151(12), 5893-904. (2010) 査読あり

- (3) . Sugiyama N, Tsukiyama, T Yamaguchi TP, Yokoyama T. “The canonical Wnt signaling pathway is not involved in renal cyst development in the kidneys of *inv* mutant mice.” *Kidney Int.* 79(9), 957-65. (2011) 査読あり
- (4) . 横山尚彦, 杉山紀之、芝大 “嚢胞性腎疾患と繊毛” 細胞工学 (2009) 28(10) pp1021-1026 査読なし
- (5) . 杉山紀之 “線毛と嚢胞腎” 腎と透析 (2011) 70 (2) pp237-242 査読なし

[学会発表] (計7件)

- (1) . Sugiyama, N., and Yokoyama, T. “Defective planar cell polarity / non-canonical Wnt signaling pathway and normal canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in *inv* mice” Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Cilia, Signaling and Human Disease” 2010年2月23日 Portola Hotel & Spa, Monterey, California
- (2) . 杉山紀之 “繊毛と嚢胞腎” 第32回腎臓セミナー 2010年8月28日 東京 海運ビル 招待講演
- (3) . 杉山紀之 “嚢胞腎疾患と一次線毛” 第13回埼玉若手腎臓病若手研究会 2010年12月11日 大宮 パレスホテル大宮 招待講演
- (4) . 杉山紀之、横山尚彦 “*inv* マウスの嚢胞腎における canonical Wntシグナル経路の関与” 第52回日本腎臓学会 2009年6月4日 神奈川県・パシフィコ横浜
- (5) . 杉山紀之、奥村保子、横山尚彦 “ERK Regulates Renal Cell Proliferation and Renal Cyst Expansion in *inv* Mutant Mice” 第50回日本組織細胞化学会 2009年9月26日 滋賀・ピアザ淡海
- (6) . 横山尚彦, 杉山紀之、芝大 “尿細管形態維持装置としての繊毛タンパク *Inv* の機能” 第32回日本分子生物学会年会 Workshop 2009年12月11日 神奈川県・パシフィコ横浜
- (7) . Yokoyama, T., Sugiyama, N., Shiba, D., Fukui, H., Nakata, K. “Renal cystic diseases as a cillioopathy” 第116回解剖学会全国学術集会 2011年3月(横浜)・抄録 *The Journal of Physiological Sciences* 61(suppl): s78(2011)

[その他]
ホームページ等
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat2/Projects/thema1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 紀之 (SUGIYAMA NORIYUKI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：90381954