

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 年度～2012 年度
 課題番号：22590896
 研究課題名（和文）腎尿細管間質線維化における細胞内シグナルの相互作用に関する研究
 研究課題名（英文）Study on interaction of intracellular signal in renal tubular interstitial fibrosis
 研究代表者 森本 善文
 (MORIMOTO YOSHIFUMI)
 和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
 研究者番号：90191048

研究成果の概要（和文）：

腎尿細管間質線維化における Bmp7 シグナルと TGF- β シグナルの相互作用をみるために、片側尿管結紮（UUO）によるマウス線維化モデルを用いた。野生型マウスと Trps1 のヘテロ欠損マウスを用いて UUO により生じる腎尿細管間質線維化の程度を比較した。Trps1 のヘテロ欠損マウスでは野生型マウスより高度な線維化が生じた。この実験より Trps1 は Bmp7 の下流で働いて Arkadia を抑制することで TGF- β シグナルを抑制し、その結果線維化を抑制していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

To study the interaction between Bmp7 and TGF- β intracellular signaling in renal tubular interstitial fibrosis, we used a mouse fibrosis model by unilateral ureteral obstruction (UUO). We compared the degree of renal tubular intestinal fibrosis caused by UUO using wild-type (WT) and Trps1 heterozygous KO (HT) mice. HT mice had more severe fibrosis than WT mice. From this experiment, we concluded that Trps1 functions downstream of Bmp7 and suppresses fibrosis by inhibiting Arkadia expression, suppressing TGF- β signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓学

キーワード：腎臓、間質線維化、Trps1、EMT、MET

1. 研究開始当初の背景

臓器線維化において中心的な役割を演じる TGF- β は多くの機能を持つサイトカインであるが、腎臓の尿細管間質線維化では腎尿細管上皮に作用して、上皮細胞を間葉系細胞に分化転換させる。我々はマウスの片側尿管結紮（Unilateral

ureteral obstruction:UUO) による水腎症モデルにおいて、この EMT が TGF- β 1/Smad3 シグナリングによって生じることを Smad3 ノックアウトマウスを用いて証明した。また TNF- α と TGF- β は線維化においてお互いに陰と陽の関係にあるサイトカインであると言わ

れているが、UUOの早期ではTNF- α もTGF- β 1と同様に線維化を亢進するという報告がなされていた。我々はUUO後期における腎尿細管間質線維化モデルにおいてTNF- α がTGF- β に拮抗して線維化を抑制するという結果をTNF- α ノックアウトマウスを用いて示した。本論文で我々はUUO後期においてTNF- α receptor type 2が発現するため、TGF- β とTNF- α の主たる供給源であるマクロファージがwild-typeマウスでTNF- α receptor type 2シグナルを介したアポトーシスを起こして減少しTNF- α ノックアウトマウスでマクロファージの数が相対的に増加して線維化が亢進することを示した。すなわちUUOによる腎尿細管間質線維化の進展にはマクロファージがことさら重要な役割を演じていることが推察された。また、腎尿細管上皮細胞はTGF- β スーパーファミリーの一員であるBMP7を主としたサイトカインの働きにより、腎発生期の後腎間葉細胞が上皮細胞への分化転換(Mesenchymal to epithelial transition:MET)を行って生じる細胞である。我々は腎発生初期においてBMP7の下流で転写因子Trps1の発現が誘導され、後腎間葉細胞がMETを起こして腎尿細管が形成されるという証拠をTrps1ノックアウトマウスを用いて示した。さらに成長したマウス腎において、Trps1は腎尿細管上皮細胞に特異的に発現することを免疫組織化学的検索により明らかにした。そして培養系において尿細管上皮細胞がTGF- β により筋線維芽細胞に分化転換すると同時にTrps1の発現は消失することを観察している。これらの事からBMP7/Trps1シグナルはTGF- β 1/Smad3シグナルに拮抗して腎尿細管上皮細胞のEMTを抑制し、さらに線維化した腎間質細胞をMETにより再び尿細管上皮細胞に逆分化させる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

UUOによっておこる腎尿細管間質線維化はTGF- β /Smad3経路とBMP7/Trps1経路のバランスにより規定されておりTrps1の欠損で線維化の程度が変化するかどうかを明らかにする。もし線維化の程度に影響を与えるとすればTGF- β /Smad3経路とBMP7/Trps1経路は細胞内でどのような相互反応をおこすのかを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

本実験ではUUOによって起こる腎尿細管間質線維化がTGF- β /Smad3シグナルとBMP7/Trps1シグナルが互いに拮抗しあうことを実証する。そのために

BMP7の下流で働くTrps1ノックアウトマウスを用いてUUOを行い、それによる線維化の程度が野生型マウスに比較して増悪することを示す。この実験でUUOによる腎尿細管間質線維化がTrps1ノックアウトマウスで亢進することが示せたら(予備実験で亢進することは確定している)Trps1がどのような分子機構によって線維化を抑制するのかについて実験を進める。

4. 研究成果

Trps1ノックアウトマウスに片側尿管結紮(UUO)を行うことにより腎尿細管間質線維化モデルを作成してTrps1の発現量が線維化に及ぼす影響について検索した。まず野生型マウス(WT)とヘテロマウス(HT)との間で線維化の程度を比較するためにI型コラーゲンの免疫染色を行うと、HTマウスではその量が有意に増加していた。次にTGF- β シグナルの亢進を疑いリン酸化Smad3抗体での免疫組織化学により、WTマウスに比較してHTマウスで核に陽性を示す尿細管上皮細胞数の増加を示した。このことからHTマウスにおいて腎間質線維化の亢進するメカニズムを検索するため、TGF- β シグナル経路に関与する遺伝子の発現およびタンパク量を検索したところ、HTマウスではSmad7のmRNAがUUOの時間と共に増加したが、タンパク量はそれとは逆に減少した。これはSmad7タンパクの分解系の亢進によるものと考え、プロテオソームのエピキチンカインースを検索すると、その中でArkadiaのmRNA、タンパク量ともにHTマウスではWTマウスの約2倍に増加していた。さらに尿細管上皮を腎臓から単離培養しTGF- β を添加して上皮・間葉移行(EMT)を検索した結果、培養系においてもUUO腎と同様にHTではWTと比較してリン酸化Smad3が高度に亢進したのと同時に α -SMAの発現は亢進し、

E-cadherin の発現は減少した。また Arkadia の発現は HT では WT の約 2 倍亢進していた。これらの結果から腎尿細管において Trps1 は Arkadia の発現を負に調節することにより Smad7 タンパク量を増加させ、Samd3 リン酸化をコントロールすることにより線維化を抑制することが明らかとなった。

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 13 件)

1. Tanishima H, Gui T, Sun Y, Shimokado A, Ozaki T, Muragaki Y. Snail protein expression as a hallmark of gastric carcinoma in biopsy samples. ISRN Pathology, 2012, Article ID 132472, 7 pages, 2012 (査読有)
2. Hirai Y, Muragaki Y, Itoh S, Oikawa K, Juri M, Kondo T, Okamura Y. Fibulin-5 protein is reduced in the lung of patients with spontaneous pneumothorax who are under 25 years old. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 18(3):200-5, 2012 (査読有)
3. Oikawa K, Tanaka M, Itoh S, Takanashi M, Ozaki T, Muragaki Y, Kuroda M. A novel oncogenic pathway by TLS-CHOP involving repression of MDA-7/IL-24 expression. Br J Cancer. 106(12):1976-9, 2012 (査読有)
4. Michikami I, Fukushi T, Honma S, Yoshioka S, Itoh S, Muragaki Y, Kurisu K, Ooshima T, Wakisaka S, Abe M. Trps1 is necessary for normal temporomandibular joint development. Cell Tissue Res. 348(1):131-40, 2012 (査読有)
5. Gui T, Zhou G, Sun Y, Shimokado A, Itoh S, Oikawa K, Muragaki Y. MicroRNAs that target Ca²⁺ transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. Lab Invest. 92: 1250–1259, 2012 (査読有)
6. Gui T, Sun Y, Shimokado A, Muragaki Y. The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-β-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. J Signal Transduct. 2012:289243, 2012 (査読有)
7. Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. Mediators Inflamm. 2012:693083, 2012
8. Gui T, Sun Y, Shimokado A, Muragaki Y. The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-β-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. J Signal Transduct. 2012:289243, 2012 (査読有)
9. 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)
10. Iwahashi M, Muragaki Y. Increased type I and V collagen expression in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. Fertil Steril. 95(6):2137-9, 2011 (査読有)
11. 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)

- 有)
12. Nishioka R, Itoh S, Gui T, Gai Z, Oikawa K, Kawai M, Tani M, Yamaue H, Muragaki Y. 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)
 13. Gai Z, Zhou G, Gui T, Itoh S, Oikawa K, Uetani K, and Muragaki Y. Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression. *J. Am. Soc. Nephrol* 21: 1468-1476, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. 下角あい子、松谷泰好、井畑裕三子、尾崎敬、東克彦、村垣泰光：早期胃癌術後 13 年目に播種性骨髄癌症を発症した一剖検例。第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 東京
2. 森一郎、長村義之、尾崎敬、村垣泰光、井畑孝敏、上田浩：バーチャルスライドを用いたルーチン病理標本の遠隔診断体制の構築。第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 東京
3. 伊藤俊治、孫玉静、桂婷、下角あい子、川勝基久、尾崎敬、及川恒輔、村垣泰光：Gdf5/Trps1 は Prg4 発現を制御し指節骨骨端部形成を調節する。第 25 回軟骨代謝学会 名古屋市 2012 年 3 月
4. 桂婷、孫玉静、下角あい子、伊藤俊治、及川恒輔、尾崎敬、村垣泰光 MicroRNAs are involved in phosphate and calcium-induced vascular smooth muscle cell calcification. 第 101 回日本病理学会総会 東京 2012 年 4 月
5. Kosuke Oikawa, Masakatsu Takanashi, Mayako Niwa, Yujing Sun, Ting Gui, Aiko Shimokado, Shunji Itoh, Takashi Ozaki, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. Wapl regulates HP1 expression and levels of various histone H3 tail modifications. 日本分子生物学会年会 福岡市 2012 年 12 月
6. Kosuke Oikawa, Masakatsu Takanashi,

- Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. TLS-CHOP represses expression of the antitumor cytokine MDA-7/IL24 in myxoid liposarcoma. 日本癌学会学術総会 札幌 2012 年 9 月
7. 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 横浜 2011 年 12 月
 8. Yujing Sun, Kosuke Oikawa, Shunji Itoh, Ting Gui, Aiko Shimokado, Takashi Ozaki, and Yasuteru Muragaki. Expression of PRG4 variant C specifically functions in tumor formation and development of myxoid liposarcoma. 日本分子生物学会年会 横浜 2011 年 12 月
 9. Kosuke Oikawa, Masami Tanaka, Shunji Itoh, Yujing Sun, Ting Gui, Aiko Shimokado, Takashi Ozaki, Masakatsu Takanashi, Masahiko Kuroda, and Yasuteru Muragaki. A novel oncogenic mechanism of the chimeric oncoprotein TLS-CHOP mediated by a tumor suppressor protein MDA-7/IL24. 日本分子生物学会年会 横浜 2011 年 12 月
 10. Kosuke Oikawa, Masakatsu Takanashi, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. Analysis of the novel molecular function of the cohesin-associated protein Wapl. 日本癌学会学術総会 名古屋 2011 年 10 月
 11. 及川恒輔、村垣泰光. 粘液型脂肪肉腫における分子治療の可能性を探る。日本バイオセラピー学会学術集会総会 和歌山 2011 年 12 月
 12. 桂 婷、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 Gai Z, Gui T, Itoh S, Oikawa K, Uetani K, Muragaki Y. 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
 13. 桂 婷、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

14. Gui T, 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

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者 森本 善文

(MORIMOTO YOSHIFUMI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90191048

(2) 研究分担者 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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

