

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 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：13802
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790310
 研究課題名（和文）Skp2-p27 ダブルノックアウトマウスを用いた腎障害進行機構の解明
 研究課題名（英文）The progressive nephropathy in Skp2-p27 double knockout mice.
 研究代表者
 鈴木 小由里（SUZUKI SAYURI）
 浜松医科大学・医学部・特任研究員
 研究者番号：80568949

研究成果の概要（和文）：Skp2 欠損マウスによる尿管結紮(UUO)モデルでは、Skp2 の標的の中で p27 が最も蓄積していた。そこで、p27 を欠損させた Skp2-p27 ダブル欠損マウスを用いて UUO モデルを作製したところ、Skp2 欠損マウス UUO 腎での腎障害の軽減は解消され、野生型と比較して、さらなる腎障害の進行が確認された。これらの結果から、Skp2 は主に尿細管上皮細胞を制御している p27 を分解することによって腎障害進行に関与していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：p27, is known a Skp2 target, most increased in the UUO kidney in Skp2^{-/-} mice. The ameliorated UUO renal injure by Skp2-deficiency was canceled by the additional p27-deficiency in Skp2^{-/-}p27^{-/-} mice. These findings suggest a pathogenic role of the reduction in p27 targeted by Skp2 in the progression of nephropathy in UUO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：基礎医学
 キーワード：細胞増殖、タンパク分解、腎障害、p27、Skp2

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞周期を制御している p27 と、p27 をユビキチン-プロテアソーム系によって分解に導く Skp2 が腎障害において高発現する

ことに着目している。Skp2 ノックアウトマウスを用いた片側尿管閉塞性モデルを作製したところ、尿細管上皮細胞で p27 が著明に蓄積すること確認され、細胞増殖が減少するこ

とにより尿細管の拡張および間質の線維化が抑制され、腎障害の進行抑制が起こることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、Skp2 が p27 を特異的にユビキチン化するのに必要な分子 Cks1 の腎障害進行における動態を解析する。さらに、Skp2、p27 のダブルノックアウトマウスを用いて片側尿管閉塞性モデルを作製し、腎障害の進行における Skp2、p27 の機能の解明をさらに進めることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 腎障害における Skp2 の細胞増殖制御機構の解明

Skp2 が p27 を特異的にユビキチン化するのに必要な分子 Cks1 の腎炎進行における動態を経時的に解析する。さらに Skp2 ノックアウトマウスの UUO 腎で見られた尿細管上皮細胞数の増加と腎障害の抑制が Skp2-p27 ダブルノックアウトマウスにおいて打ち消されるのか検討する。

2) Skp2 は EMT にも関与しているのか

Skp2 ノックアウトマウス UUO 腎で緩和された間質線維化が Skp2-p27 ダブルノックアウトマウス UUO 腎で解除されるか検討する。

4. 研究成果

本研究では分子生物学的手法、生化学的手法を用いた研究により以下の結果を得た。

- (1) 野生型マウスの UUO モデルを用いて、Skp2 が p27 を特異的にユビキチン化するのに必要な Cks1 の発現を mRNA およびタンパクレベルで解析した。UUO 腎において、Cks1 は mRNA およびタンパクレベル共に、発現

が亢進しており、Skp2 と同様な発現パターンであることがわかった (図1)。

また、免疫染色において Cks1 および Skp2 のタンパク発現が陽性細胞で p27 のタンパク発現が陰性である細胞が多く確認された。これにより、Cks1 および Skp2 と p27 のタンパク発現が逆相関であることが示され、腎障害では Skp2 が p27 タンパク分解を特異的に制御している可能性が高まった。

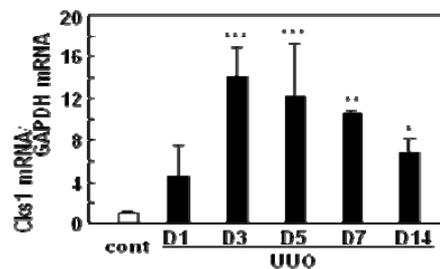


図1. UUO腎障害によるCks1 mRNAの発現亢進

- (2) TNF α が腎障害進行に伴って尿細管上皮細胞細胞質で発現亢進していることがわかった。また、NF κ B である RelB および p52 は腎障害により尿細管上皮細胞の核で高発現し、Skp2 および Cks1 と共局在することが免疫染色により明らかになった。これらの結果から、Skp2/Cks1 は TNF α /NF κ B 経路により発現誘導されることが示唆された (図2)。

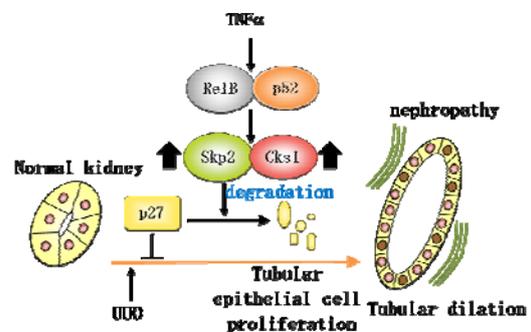


図2. 腎障害における Skp2/Cks1 の発現誘導機構

(3) PAS 染色、線維化の指標となるマッソントリクローム染色を用いて、組織学的検討を行った。野生型マウスと比較して p27 ノックアウト UUO 腎では、尿細管上皮細胞の数が顕著に増加しており、尿細管の拡張も野生型より増加していた。一方、Skp2 ノックアウトマウス UUO 腎では野生型マウスより腎障害が軽減されたが、p27 を付加的に欠損させた Skp2-p27 ダブルノックアウトマウス UUO 腎では再び腎障害の進行が確認された。Skp2-p27 ダブルノックアウトマウス UUO 腎の尿細管の拡張は野生型よりも増加し、p27 ノックアウト UUO 腎と同レベルであった。これらのことにより多くのターゲットを持つとされる Skp2 は、腎障害において、特異的に p27 を制御している可能性が高まった。

(4) 細胞増殖マーカーとして Ki67 抗体を用いて免疫染色を行った。Skp2 ノックアウトマウス UUO 腎で尿細管上皮細胞の細胞増殖は抑制されたが、Skp2-p27 ダブルノックアウトマウス UUO 腎にすることにより、抑制が解除された。尿細管拡張が顕著に見られる p27 ノックアウト UUO 腎では、細胞増殖も盛んであることが確認された(図 3)。

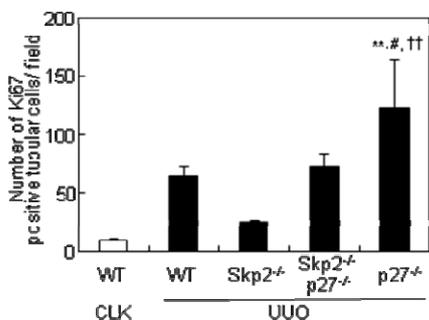


図 3. Skp2^{-/-} UUO 腎で抑制された尿細管上皮細胞の細胞増殖は Skp2^{-/-}p27^{-/-} UUO 腎で解消される。

(5) p21はSkp2のターゲットであり、p21 ノックアウトマウス UUO 腎では間質細胞の増殖が亢進すると報告されている。Skp2 ノックアウトマウス UUO 腎での p21 のタンパク発現量を比較したところ、p21 のタンパクレベルの増加はわずかであった。また、他の Skp2 のターゲットも同様に調べたところ、WT UUO 腎と比較して p57、p130、TOB1、cyclinA、CyclinD1 は Skp2 ノックアウトマウス UUO 腎で増加せず、c-Myc、b-Myb、cyclinE はわずかに増加したものの、どれも p27 ほど増加しなかった(図 4)。これにより、腎障害では p27 が Skp2 のメインターゲットであることが確認された。

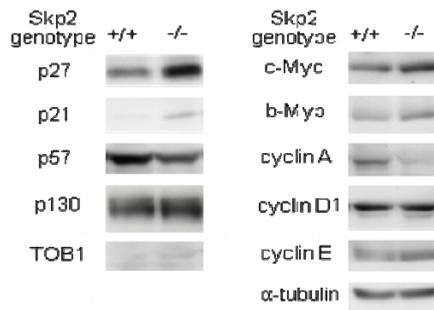


図 4. Skp2 ターゲットのタンパク発現

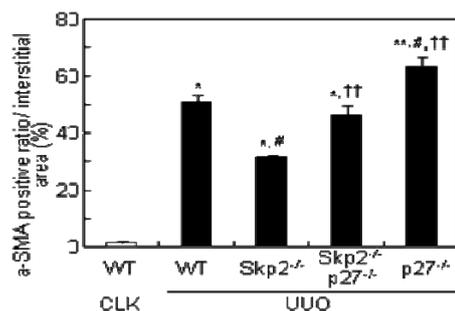


図 5. α-SMA は Skp2^{-/-}p27^{-/-} で増加する。

(6) Skp2 ノックアウトマウス UUO 腎では腎線維化が抑制される。これに比べ、Skp2-p27 ノックアウトマウス UUO 腎では間質領域が増加し、また免疫染色法により α-SMA

(図5)とVimentinが増加し腎線維化の進行が確認され、またマクロファージの浸潤も増加していた。さらに、COL1、 α SMA、Vimentinおよびマクロファージの指標であるF4/80 のmRNAレベルも同様に増加していた。これらのことから、腎障害に伴う線維化および炎症がSkp2-p27ノックアウトマウスUUO腎で亢進することが確認され、Skp2-p27の制御が腎障害の線維化にも影響していることがわかった。

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4件)

- ① Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa A., Ohashi, N., *et al.*: The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice is canceled by p27^{Kip1} deficiency in Skp2^{-/-} p27^{-/-} mice. **PLoS ONE** 7(4): 1-9, 2012. 査読有
- ② Suzuki S., Fukasawa H., Misaki T., Togawa A., Ohashi N., Kitagawa K., Kotake Y., Niida H., Hishida A., Yamamoto T., and Kitagawa M.: Up-regulation of Cks1 and Skp2 with TNF α /NF- κ B Signaling in Chronic Progressive Nephropathy. **Genes Cells** 16: 1110-1120, 2011. 査読有
- ③ Togawa A., Sfakianos J., Ishibe S., Suzuki S., Fujigaki Y., Kitagawa M., Mellman I., Cantley L.G.: Hepatocyte Growth Factor stimulated cell scattering requires ERK and Cdc42-dependent

Tight Junction Disassembly. **Biochem Biophys Res Commun.** 400: 271-277, 2010. 査読有

- ④ Fukasawa H, Yamamoto T, Fujigaki Y, Misaki T, Ohashi N, Takayama T, Suzuki S, Mugiya S, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Hayashi H, Ozono S, Kitagawa M and Hishida A: Reduction of transforming growth factor- β type II receptor is caused by the enhanced ubiquitin-dependent degradation in human renal cell carcinoma. **Int. J. Cancer** 127: 1517-1525, 2010. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 鈴木小由里、深澤洋敬、三崎太郎、北川恭子、神武洋二郎、丹伊田浩行、山本龍夫、北川雅敏 「慢性進行性腎障害における TNF α /NF- κ B シグナル伝達による Cks1 および Skp2 の発現亢進」 **第34回日本分子生物学会年会**、2011年12月14日、パシフィコ横浜
- ② 鈴木小由里、深澤洋敬、三崎太郎、戸川証、北川恭子、神武洋二郎、丹伊田浩行、山本龍夫、北川雅敏 「慢性進行性腎障害における NF- κ B 経路による Skp2 および Cks1 の発現亢進」 **第84回日本生化学会大会**、2011年9月22日、国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seikai.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 小由里 (SUZUKI SAYURI)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：80568949