

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591197

研究課題名(和文) NPHP 嚢胞腎の発生機序の解析 - 尿細管上皮細胞の細胞分裂方向の決定機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of cell polarity in NPHP polycystic kidney

研究代表者

杉山 紀之 (SUGIYAMA, Noriyuki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90381954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は嚢胞腎において細胞分裂方向の乱れが生じていることから、その原因は上皮細胞の細胞極性の乱れであると予想した。そこで我々は嚢胞腎の尿細管上皮細胞の細胞極性因子の局在を解析した。解析の結果、嚢胞腎組織、二次元培養および三次元培養のどの方法においても、多くの既知の極性因子の細胞内局在はNPHP2嚢胞腎と正常腎の尿細管上皮細胞では差異は認められなかった。この事は嚢胞腎の原因は細胞極性の乱れではない事を示唆した。

次に、増殖期の尿細管上皮細胞での繊毛の機能解析のために、虚血再還流による急性腎障害後の尿細管上皮細胞の再生および細胞死を起こす実験系の構築を行い、尿細管の再生と細胞死の機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：We expected that the random oriented cell division is an initial event for renal tubule expansion and precedes cell proliferation in inv mutant kidneys. Then, we analyzed the localization of the cell polarity factor of the renal tubular epithelial cells of a cystic kidney. In our analysis, the difference of intracellular localization of the cell polarity factor was not observed in cystic and normal kidney. These results suggested that the cause of a cystic kidney was not disorder of cell polarity. Next, for the analysis of the cilia function in the renal tubular cells of a proliferation stage, we produced the acute kidney injury model which tubular cells caused cell proliferation and apoptosis simultaneously by ischemia-reperfusion method.

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：一次繊毛 嚢胞腎 急性腎障害

1. 研究開始当初の背景

嚢胞腎は常染色体優性多発性嚢胞腎、常染色体劣性多発性嚢胞腎および家族性若年性ネフロン癆 (NPHP) などの遺伝子性疾患に代表される。これらの遺伝子性嚢胞腎はその患者数も多く、発生機序の解明が急務となっている。これらのモデルマウスの嚢胞腎は尿細管の拡張、尿細管上皮細胞の異常増殖、細胞外マトリックスの増加などのほぼ同様な特徴を示し、その原因は一次繊毛の異常である。我々は NPHP2 のモデルマウスである *inv* マウスの尿細管上皮細胞の細胞分裂方向に注目し、*inv* 嚢胞腎の尿細管上皮細胞の分裂方向が乱れていたことを見出した。細胞分裂方向は細胞極性因子、とくに平面極性因子により制御されている事が知られている。さらに、その平面極性因子は Wnt シグナルにより制御されている事も報告されている。*Inv* が Wnt シグナル因子で平面極性因子である Dvl を結合する事が知られているが、平面極性への関与は全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

Inv の PCP 経路への関与及び PCP 経路関連因子の Dvl と *Inv* との関係を明らかにし、尿細管上皮細胞の線毛が細胞分裂方向の決定機構への関与の解明を目的とする。

3. 研究の方法

嚢胞腎マウスである *inv* 変異マウスを用いて、その尿細管上皮細胞における平面極性経路因子の局在の変化を解析する。解析には平面極性関連因子である Dvl2 と Dvl3 については各々を蛍光ラベルしたトランスジェニックマウスを用いて、*in vivo* の状態での解析を行う。他の因子については免疫組織化学染色法により、解析を行う。さらに、細胞周期においても局在が変化する事を考慮して、器官培養系及び培養細胞株を用いて、*Inv* と平面極性経路因子の局在を追跡する。

4. 研究成果

Dvl2/3 トランスジェニックマウスを用い

た嚢胞腎における尿細管上皮細胞での平面極性因子 Dvl2/3 の局在は、正常腎尿細管上皮細胞の局在と差異は認められなかった。また、その他の平面極性決定因子の局在を組織免疫化学法により観察したが、いずれも差異は認められなかった。そこで、三次元培養系を用いて極性因子の局在を経時的に観察した。しかしながら、正常尿細管上皮細胞と嚢胞腎尿細管上皮細胞においてどの因子においても差異は認められなかった。以上のことから、*inv* 嚢胞腎における嚢胞化、つまり尿細管の拡張には平面極性因子の関与は否定的となった。このことは細胞分裂方向が乱れていることと相反する結果であるが、未知の極性因子が関与している可能性あるいは中心小体の位置決めに関わる因子の関与が新たに浮上した。今後、中心小体およびその周囲に局在する因子の変化を観察することにより、尿細管拡張の分子機序を明らかにできることと考えられる結果を得ることに成功した。

また、細胞内シグナル伝達系の解析として、最も可能性が高いと考えられた Wnt/PCP 経路の解析を行った。その結果、下流の Dvl2 や RhoA の活性化は変化が認められなかった。以上より、*inv* 嚢胞腎において Wnt/PCP 経路の活性化による尿細管の拡張の可能性は低いことが示唆された。しかしながら、*Inv* は Dvl と結合すること、アフリカツメガエルや線虫において *Inv* の変動により Wnt シグナルが変化することからも、Wnt signal が尿細管拡張のトリガーとして一過的に関与している可能性は否定できていない。今後、三次元培養系において尿細管の拡張を経時的に観察しながら Wnt シグナルの観察が必要である。

我々はさらに他の細胞内シグナル伝達系が嚢胞化に関与している可能性も考慮して、嚢胞腎で変動している細胞内シグナル伝達系の探索を行った。過去に報告した ERK/ MAPK シグナルだけでなく、p38 MAPK 経

路、Stat3 シグナル経路など多くの経路が変動していることを明らかにした。これらの経路の中で尿細管拡張以前から変動している経路は、ERK/ MAPK シグナルと p38 MAPK シグナルであった。ERK/ MAPK シグナルはすでに解析を終え、嚢胞化に必須であることを科学論文にて報告した。そこで、p38 MAPK 経路が嚢胞化に関与するかどうかを検討した。p38 MAPK 経路は尿細管の拡張以前から異常活性化しており、嚢胞化進展に伴ってその異常活性も増大している事が確認された。そこで、p38 MAPK 経路の阻害剤を投与した。その結果は残念な事に嚢胞化に伴う腎重量の増加、尿細管の拡張、尿細管上皮細胞の異常増殖およびアポトーシスなどの現象は全く抑制する事が出来なかった。しかし、間質の線維化のみをほぼ抑制しており、その結果 *inv* 嚢胞腎で認められる間質の線維化はp38 MAPKの異常活性によって引き起こされる事が強く示唆された。このことは嚢胞化として知られている多くの現象が、繊毛異常からなる1つのシグナル経路の異常によって行われているのではなく、多くの経路が平行して異常を示す事によって起こる事を始めて報告した。

さらに、繊毛が尿細管上皮細胞の増殖やアポトーシスへの関与を解析するために、嚢胞腎の観察では同調して現象が起きないために不適切である事から、虚血再還流モデルにおける急性腎障害を起こして、繊毛と尿細管の増殖と細胞死について検討を行った。最初に、虚血再還流時簡易応じて、急性腎障害後に尿細管が再生/脱落する事を確認して、再生腎モデルと萎縮腎モデルを作製した。そこで、再生腎と萎縮腎モデルの遺伝子発現の際を検討した。その結果、萎縮腎でのみ障害2週後に尿細管上皮細胞が過剰なアポトーシスを引き起こし、そのアポトーシスは尿細管自身が分泌する TNF super family 因子によって誘導される事を明らかにした。実際、TNF alpha、FasL および TRAIL の阻害抗体

の投与により、アポトーシスは抑えられ、腎萎縮も完全に抑制する事に成功した。特に TNF alpha の阻害抗体は障害2週間からの投与でも腎萎縮を抑制した。この事は急性腎障害では速い診断と処置が必須であると言われているが、急性期後の TNF alpha の阻害でも腎萎縮を抑制できる事を新たに示し、急性腎障害の新たな治療の可能性を示唆する事に成功した。また、一次繊毛は障害1週後に最も伸長していたが、再生腎と萎縮腎において差異は認められなかった。しかし、萎縮腎には繊毛が長い尿細管と短い尿細管があり、この繊毛の長さが尿細管の増殖や細胞死と関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、嚢胞腎における尿細管拡張への極性因子の継続的な関与は否定的となったが、細胞分裂期や拡張のトリガーとして機能している可能性を指摘する事に成功した。また、嚢胞化に関与する細胞内シグナル伝達系を明らかにし、p38 MAPK 経路が線維化のみに関与している事を報告した。

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5件)

- (1). Adachi T, Sugiyama N, Yagita H, Yokoyama T. “Renal atrophy after ischemia-reperfusion injury depends on massive tubular apoptosis induced by TNF α in the later phase” *Med Mol Morphol*. 2014 Jan 10. [Epub ahead of print] 共著 査読有
- (2). Adachi T, Sugiyama N, Gondai T, Yagita H, Yokoyama T. “Blockade of Death Ligand TRAIL Inhibits Renal Ischemia Reperfusion Injury.” *Acta Histochem Cytochem*. 2013 Dec 28;46(6):161-70. doi: 10.1267/ahc.13022. 共著 査読有
- (3). Sugiyama N, Kohno M, Yokoyama T. “Inhibition of p38 MAPK pathway was

ameliorated to renal fibrosis in NPHP2 model mouse.” *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Apr;27(4):1351-8. doi: 10.1093/ndt/gfr550. 共著 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1). 杉山紀之、足立孝臣、大槻勝紀、横山尚彦 「虚血性急性腎障害後の腎萎縮における TNF superfamily ligands の機能解析」第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 29 日栃木県・自治医科大学キャンパス
- (2). Adachi T., Sugiyama N, Yokoyama T. “Blockade of Death Ligand TRAIL Inhibits Renal Ischemia Reperfusion Injury” American society of nephrology kidney week 2013, 2013 年 11 月 9 日, 2013, USA, Atlanta.
- (3). 足立孝臣、杉山紀之、森泰清、横山尚彦 「虚血性急性腎障害における TRAIL の機能解析」第 56 回 日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日 東京都・東京国際フォーラム
- (4). Sugiyama N, Yokoyama T. “The intracellular signaling pathway in renal cyst development of *inv* mutant mice.” American society of nephrology kidney week 2012, 2012 年 11 月 3 日, USA, San Diego.
- (5). Adachi T, Sugiyama N, Yagita H, Mori Y, Matsubara H, Yokoyama T. “Blockade of TNF α prevents kidneys from atrophy after ischemia- reperfusion injury.” American society of nephrology kidney week 2012, 2012 年 11 月 2 日, USA, San Diego.
- (6). 足立孝臣、杉山紀之、森泰清、松原弘明、横山尚彦 「アポトーシスリガンドの阻害は虚血性急性腎障害後の腎予後を改善する」第 55 回 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 神奈川県・パシフィコ横浜
- (7). 杉山紀之、横山尚彦 「家族性若年性ネフロン癆 (NPHP) 2 型モデルマウスの腎繊維化は p38 MAPK の阻害により抑制できる」第 55 回 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 神奈川県・パシフィコ横浜
- (8). 足立孝臣、杉山紀之、森泰清、松原弘明、横山尚彦 「急性腎障害モデルマウスを用いた腎再生可否の分子マーカーの探索」第 54 回 日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 17 日 神奈川県・パシフィコ横浜
- (9). 杉山紀之、横山尚彦 「*inv* (NPHP2) 嚢胞腎における Wnt シグナル経路の関与」第 54 回 日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 15 日 神奈川県・パシフィコ横浜
- (10). Sugiyama N, Shiba D, Yokoyama T. “The ciliary signaling in *inv* cystic kidney” 第 44 回日本発生物学会年会 Workshop2 2011 年 5 月 20 日 宜野湾 (沖縄県) 沖縄コンベンションセンター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/an1/staff/n-sugiyama.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山 紀之 (SUGIYAMA Noriyuki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90381954