

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591580

研究課題名(和文) ユビキチン・プロテアソームに着目した多発性嚢胞腎病態生理に基づく疾患特異的治療

研究課題名(英文) Disease specific therapy of polycystic kidney disease based on its pathophysiology considering the ubiquitin-proteasome proteolysis mechanism

研究代表者

中西 浩一 (NAKANISHI, Koichi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50336880

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)：多発性嚢胞腎(polycystic kidney disease、PKD)は、わが国で最も頻度が高い遺伝性疾患であり、慢性腎不全の主要な原因の一つである。常染色体優性(ADPKD)と常染色体劣性(ARPKD)がある。本研究では、多発性嚢胞腎の複数の基本的病態生理におけるユビキチン・プロテアソーム蛋白分解機構(ubiquitin-proteasome system、UPS)の関与とその機序を解明し、それらを修飾することによる病態生理に基づいた疾患特異的治療開発のための基礎的知見の獲得、およびそのヒトへの応用のためのモデル動物を用いた治療研究による効果の確認をめざした。

研究成果の概要(英文)：Polycystic kidney disease is an inherited disease, which is the most frequent in our country, and is one of main causes of chronic renal failure. There are two types of polycystic kidney disease, autosomal dominant (ADPKD) and autosomal recessive (ARPKD). In this study, we elucidated ubiquitin-proteasome proteolysis mechanism in multiple pathophysiology of polycystic kidney disease, and aimed to confirm the effect with modification of ubiquitin-proteasome proteolysis using the model animal for disease specific therapy development based on the pathophysiology of polycystic kidney disease to adapt it to human. We focused on ubiquitin E3 ligase family, Smurf1 and Smurf2.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：多発性嚢胞腎 CPKマウス ユビキチン・プロテアソーム 上皮間葉移行(EMT) 疾患特異的治療

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease, PKD) は、わが国で最も頻度が高い遺伝性疾患であり、慢性腎不全の主要な原因の一つである。常染色体優性 (ADPKD) と常染色体劣性 (ARPKD) があり、臨床上的の差違にもかかわらず共通の基本的病態生理が存在する。

私どもは、PKDにおいて嚢胞を形成する尿細管上皮細胞では脱分化がみられ、上皮間葉移行 (EMT) により間葉系の形質を獲得し発症に関与することを報告した。その結果、尿細管上皮細胞は、増殖 (過形成) ・細胞周期異常、分泌 (正常では吸収が主である)、細胞外基質異常・線維化を起こし、そのため嚢胞形成・腎不全にいたる。現在、このEMTならびにそこから引き起こされるこれらの基本病態におけるユビキチン・プロテアソーム蛋白分解機構 (ubiquitin-proteasome system, UPS) の関与ならびにその機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多発性嚢胞腎の複数の基本的病態生理における UPS の関与とその機序を解明し、それらを修飾することによる病態生理に基づいた疾患特異的治療開発のための基礎的知見の獲得、およびそのヒトへの応用のためのモデル動物を用いた治療研究による効果の確認である。

UPS はユビキチンとプロテアソームから成り、ユビキチンは蛋白を分解に導く目印として作用し、プロテアソームはユビキチンで修飾された蛋白を選択的に破壊する細胞内装置である。細胞周期・シグナル伝達・転写制御・蛋白品質管理・ストレス応答・DNA 修復など生命科学のあらゆる領域で中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。

PKD の原因遺伝子産物は、一次繊毛を中心とした細胞のセンサー機能を担う部位に主に存在しており、その破綻により発症するが

その機序の詳細は不明である。センサー機能の破綻に陥った尿細管上皮細胞は間葉系の形質を獲得し (上皮間葉移行、EMT)、種々の病的表現形を呈する。

そこで、本研究の具体的な目的は、PKD の病的尿細管上皮における異常な表現型の中でも、特に 1) 細胞分化の異常・上皮間葉移行 (EMT)、2) 増殖・細胞周期異常、3) 線維化の基本病態における UPS の関与とその機序を明らかにすることである。その知見を元に疾患特異的治療にむけて、動物モデルによる治療研究を実施する。

3. 研究の方法

< 研究遂行の基本方法 >

標的分子の発現を蛋白と遺伝子レベルで検討し、疾患進行に伴い対照と比較して蛋白レベルのみの低下をきたした分子にUPS関与が考えられ、それらの分子についてUPS関連分子群の検討によりUPSの関与とその機序を明らかにする。基本実験手技は以下に示す。

< 蛋白発現 >

免疫組織化学染色
ウエスタンブロッティング

< 遺伝子発 >

in situ hybridization
リアルタイム PCR

< 蛋白分解の定量 >

in vitro degradation assay

< ユビキチン化の定量 >

in vitro ubiquitination assay

< 各基本病態におけるUPSの関与を示すために着目する分子 >

【1】細胞分化の異常・上皮間葉移行 (EMT) における検討

Wnt系：Wnt群、その受容体、情報伝達下

流分子群、およびそれらの修飾分子

Hedgehog系：Hedgehog群、その受容体、情報伝達下流分子群、およびそれらの修飾分子

【2】増殖・細胞周期異常における検討

ErbB系(EGFR系)：EGF, TGF- β , それらの受容体 EGFR/ErbB1、情報伝達下流分子群

サイクリン、およびその関連分子

【3】腎間質線維化における検討

TGF- β およびSmad分子群(Smad2、Smad3、Smad7)

4. 研究成果

研究にはヒト ARPKD モデル cpk マウスを用い、同腹健常マウスを対照とした。

標的分子の発現を蛋白と遺伝子レベルで検討し、疾患進行に伴い対照と比較して蛋白レベルのみの低下をきたした分子に UPS 関与が考えられ、それらの分子について UPS 関連分子群の検討により UPS の関与とその機序を検討した。

これまでのところ、嚢胞形成性尿管上皮における TGF- β および Smad 分子群(Smad2、Smad3)の病態解明が進んでおり、それらと ubiquitin E3 ligase family である Smurf1、Smurf2 などの関連を解析した。cpk において TGF- β /Smad3 系は量的異常より質的異常を示し、JNK/CDK4 を介した核内 pSmad3L/C 作用による c-Myc の発現増強が示唆され、pSmad3L/C が PKD の病態に重要な役割を担っている可能性があり、現在、その病態における Smurf1、Smurf2 の作用を確認している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Yoshihara D, Kugita M, Sasaki M, Horie S, Nakanishi K, Abe T, Aukema HA, Yamaguchi T, Nagao S. Telmisartan

ameliorates fibrocystic liver disease in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. PLoS One. 2013 Dec 6;8(12):e81480. doi: 10.1371/journal.pone.0081480. (査読有り)

2. 中西浩一, 吉川徳茂: 繊毛病 (Ciliopathy). 日本小児腎臓病学会雑誌 25(2):127-131, 2012. (査読有り)
3. 中西浩一, 吉川徳茂, 服部元史: 常染色体劣性多発性嚢胞腎-疫学と臨床. 特集: 多発性嚢胞腎 腎臓 34(3):194-200, 2012. (査読無し)
4. 中西浩一, 吉川徳茂: ARPKD の基礎と臨床-最新の知見 特集: 多発性嚢胞腎-最新の知見と今後の課題. 日本腎臓学会誌 54(4): 534-537, 2012. (査読無し)
5. 乳原善文, 香村衡一, 木村理, 嶋村剛, 田邊一成, 土谷健, 成田一衛, 中西浩一, 西尾妙織, 奴田原紀久雄, 野村信介, 花岡一成, 東原英二, 堀江重郎, 武藤智, 望月俊雄, 進行性腎障害に関する調査研究班多発性嚢胞腎分科会 厚生労働省進行性腎障害調査研究班 多発性嚢胞腎診療指針 2010 年 8 月(解説) 日本腎臓学会誌 53: 556-583, 2010. (査読有り)

〔学会発表〕(計17件)

1. 浜武継, 中西浩一, 佐藤匡, 向山弘展, 戸川寛子, 島友子, 辻本弘, 神波信次, 吉川徳茂 常染色体劣性多発性嚢胞腎の鑑別を要した3例 第35回日本小児腎不全学会学術集会 2013, 10, 24, 郡山
2. Hama T, Nakanishi K, Mukaiyama H, Togawa H, Sato M, Shima Y, Miyajima M, Nozu K, Nagao S, Takahashi H, Iijima K, Yoshikawa N. Smad3 Phosphorylated at Both Linker and COOH-Terminal Regions in Cyst-Lining Epithelia in

- cpk Mouse, a Model of ARPKD. 46th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov.7-Nov.10, 2013 in Atlanta, USA. JASN 24:303A
3. 浜武継, 中西浩一, 向山弘展, 戸川寛子, 佐藤匡, 島 友子, 宮嶋正康, 野津寛大, 高橋久英, 長尾枝澄香, 飯島一誠, 吉川徳茂 cpk マウス ARPKD モデルにおける病的 Smad3 リン酸化 第 21 回嚢胞性腎疾患研究会 2013. 9. 21. 東京
 4. 浜武継, 中西浩一, 向山弘展, 戸川寛子, 佐藤匡, 島 友子, 宮嶋正康, 野津寛大, 高橋久英, 長尾枝澄香, 飯島一誠, 吉川徳茂 cpk マウスにおける病的 Smad3 リン酸化 第 22 回発達腎研究会 2013.9. 14 高槻
 5. Hama T, Nakanishi K, Mukaiyama H, Sato M, Togawa H, Shima Y, Miyajima M, Takahashi H, Nagao S, Iijima K, Yoshikawa N □ Possible contribution of fibrocytes to renal fibrosis in cpk mouse, a model of ARPKD. □15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Shanghai, China, Aug. 30-Sep. 3, 2013
 6. 浜武継, 中西浩一, 向山弘展, 佐藤匡, 戸川寛子, 島友子, 宮嶋正康, 高橋久英, 長尾静子, 飯島一誠, 吉川徳茂 cpk マウス多発性嚢胞腎モデル腎線維化における fibrocyte の関与 第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2013. 6. 28-29. 徳島
 7. < 特別講演 > 中西浩一: 遺伝性腎疾患の ABC 第 14 回徳島県小児膠原病・腎疾患談話会 2013 年 4 月 10 日 徳島
 8. Hama T, Nakanishi K, Mukaiyama H, Togawa H, Shima Y, Miyajima M, Takahashi H, Nagao S, Iijima K, Yoshikawa N. Possible Contribution of Fibrocytes to Renal Fibrosis in Cpk Mouse, a Model of ARPKD. 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov.1-Nov.4, 2012 in San Diego, USA. JASN 2012;23:596A
 9. < 特別講演 > 中西浩一: アルポート症候群と多発性嚢胞腎 第 11 回弘前小児腎疾患フォーラム 2012 年 10 月 26 日 弘前
 10. < 特別講演 > 中西浩一: 遺伝性ネフローゼ症候群と多発性嚢胞腎 第 22 回北海道小児腎臓病研究会 2012 年 10 月 20 日 札幌
 11. < シンポジウム > 中西浩一: ARPKD の病態・遺伝子診断 小児嚢胞性腎疾患の病態・病態の解明と診断・治療の進歩 座長兼任 第 34 回日本小児腎不全学会学術集会 2012 年 9 月 13~14 日 洲本
 12. < 教育講演 > 中西浩一: 繊毛病 プロフェッショナル-5 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会 2012 年 6 月 29~30 日 東京
 13. 向山弘展, 中西浩一, 浜武継, 戸川寛子, 島友子, 宮嶋正康, 高橋久英, 長尾枝澄香, 飯島一誠, 吉川徳茂. cpk マウスにおける部位特定のリン酸化 Smad3 の発現 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会 2012 年 6 月 29~30 日 東京
 14. Mukaiyama H, Nakanishi K, Hama T, Togawa H, Shima Y, Miyajima M, Takahashi H, Nagao S, Iijima K, Yoshikawa N. Acceleration of Smad3 phosphorylation at linker regions via c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) in cyst-lining epithelial cells in cpk mouse, a model of ARPKD. 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov.8-Nov.13, 2011 in Philadelphia, USA. JASN 22:576A
 15. < 講演 > 中西浩一: 小児における多発性嚢胞腎 PKD の会 第 11 回関西座談会

2011年11月20日 大阪

16. 浜武継 中西浩一, 向山弘展, 戸川寛子, 島友子, 宮嶋正康, 高橋久英, 長尾枝澄香, 飯島一誠, 吉川徳茂 cpk マウスにおける部位特定のリン酸化 Smad3 の発現 第 19 回 嚢胞性腎疾患研究会 2011.9.11 東京
17. 向山弘展, 中西浩一, 戸川寛子, 濱武継, 島友子, 宮嶋正康, 吉原大輔, 長尾枝澄香, 高橋久英, 飯島一誠, 吉川徳茂 cpk マウス ARPKD モデルにおける上皮間葉移行 (EMT) 第 54 回 日本腎臓学会学術総会 2011.6.15-17 横浜

〔図書〕(計4件)

1. 中西浩一, 吉川徳茂: 遺伝性嚢胞性疾患. 臨床腎臓内科学 安田 隆, 平和伸仁, 小山雄太編, pp742-747, 南山堂, 東京, 2013.
2. 中西浩一, 吉川徳茂 多発性嚢胞腎 14 章 腎・尿細管機能異常 嚢胞性疾患 多発性嚢胞腎 総編集 遠藤文夫 専門編集 山口清次, 大浦敏博, 奥山虎之 「先天代謝異常ハンドブック」 中山書店 東京 pp336-337 2013.3.12
3. 中西浩一, 吉川徳茂 多発性嚢胞腎 (小児) 編集 「腎と透析」編集委員会 「腎疾患治療マニュアル 2012-2013」 東京医学社 pp445-449 2012.5.31
4. 中西浩一 第 II 部 ARPKD (常染色体劣性多発性嚢胞腎) 監修 松尾清一 編集 堀江重郎 多発性嚢胞腎診療ガイド Q&A 診断と治療社 pp119-139 2011.10.1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 浩一 (NAKANISHI, Koichi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50336880

(2) 研究分担者

吉川徳茂 (YOSHIKAWA, Norishige)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10158412