

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790936

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎発症機序の解明；モデルマウスを用いたTRPP2の局在異常からの解析

研究課題名(英文)Clarification of the pathogenesis of cyst formation in autosomal dominant polycystic kidney disease using a TRPP2 697fsX transgenic mouse model

研究代表者

山田 和徳 (Yamada, Kazunori)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90397224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、両側腎に多数の嚢胞形成を認める遺伝性疾患である。我々は、ADPKD患者より見出したpolycystin-2の局在異常を認める遺伝子変異であるTRPP2 697fsXを組み込んだトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。このマウスは、4週齢より蛋白尿、腎機能障害を認め、少なくとも6月齢で嚢胞形成を認めた。これらの結果より、TRPP2 697fsX TgマウスはADPKDのマウスモデルであると考えられた。今後、このモデルマウスを用いて、嚢胞形成の機序についてさらに解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a hereditary disorder characterized by multiple cysts in both kidneys and other organs. We obtained TRPP2 697fsX, which causes the aberrant localization of polycystin-2, from a patient with ADPKD and established TRPP2 697fsX transgenic mice. These mice exhibited proteinuria, renal insufficiency at 4 weeks, and cyst formation at a minimum age of 6 months. These data indicate that TRPP2 697fsX transgenic mice can be used as mice models of ADPKD. Hence, using these models, we will further analyze the mechanism underlying cyst formation in ADPKD.

研究分野：腎臓内科

キーワード：常染色体優性多発性嚢胞腎 モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は両側腎に嚢胞形成を認め、末期腎不全に至る遺伝性疾患である。嚢胞形成は多臓器に渡り、また腎外病変として脳動脈瘤、大腸憩室なども認める。原因遺伝子として、PKD1 と PKD2 が同定されている。PKD2 遺伝子産物 polycystin-2 は、電位依存性カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) チャネルとの相同性を認め、Transient receptor potential (TRP)チャネルのサブファミリーTRPP2 として分類されている(以後 polycystin-2 を TRPP2 と記載)。これまでの研究から、TRPP2 は細胞内の ER に存在し、TRPP1 (polycystin-1)と結合することで細胞膜上に移動し、 $\text{Ca}^{2+}$ 透過型非選択的陽イオンチャネルとしてや、機械感受性チャネルとして機能していることが明らかにされた。また TRPP2 は単独では ER での  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネルとして機能していることが明らかにされた。

我々は、脳動脈瘤破裂の既往のある ADPKD 患者より、PKD2 遺伝子変異 697fsX を発見した。申請者らは、697fsX を HEK293 へ遺伝子導入して解析し、697fsX は 局在が ER から PM に変化することで、TRPC3 または TRPC7 と新たなチャネル複合体を形成し、細胞膜上で TRPC3 とヘテロ多重体を形成し、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を担っていることを明らかにした。しかしながら、TRPP2 の変異による嚢胞形成メカニズムは今だ不明な点が多く、新たなモデル動物の樹立が重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

TRPP2 697fsX を組み込んだ動物モデルを樹立し、in vivo の系で局在異常型 TRPP2 による嚢胞形成や腎外病変形成の機序について解明し、新規治療薬開発の基礎を築くことを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### トランスジェニックマウスの作成

TRPP2 697fsX または野生型の TRPP2 を有す

るトランスジェニックマウスの作成を行った。まず、発現用のプラスミドである pCAGGS-myc-hPKD2 (697fsX) と pCAGGS-myc-hPKD2 を作成した。次に受託先の Transgenic .inc において発現ユニット部分含む直鎖状 DNA 断片 1-2 pL を C57BL/6J マウスの前核期受精卵にマイクロインジェクションした後に受容雌マウスに移植し、F0 マウスを作製した。得られたマウスの血液および腎組織から DNA を抽出し、PCR 法を行い、トランスジーンの有無を確認した。

### 腎病変の免疫組織学的検討

6-12 月齢の TRPP2 697fsX トランスジェニックマウスの腎臓を 20%ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作製し、HE 染色で組織学的評価を行った。尿細管マーカー (ウロモジュリン)、血管内皮マーカー (CD31) を用いて免疫染色を行った。cilia に対する抗体である alfa-tubulin antibody を用いて、トランスジェニックマウスの腎臓における cilia の発現を確認した。

### 腎機能の評価

4 週齢、12 週齢の TRPP2 697fsX トランスジェニックマウスの蛋白尿について試験紙を用いて評価した。4, 12, 40 週齢の血清クレアチニン濃度について ELISA 法を用いて評価した。

## 4. 研究成果

我々は、脳動脈瘤破裂の既往のある ADPKD 患者から見出した PKD2 遺伝子変異 697fsX を導入したトランスジェニックマウスを作製した。

6-12 月齢のマウスの腎臓を評価したところ腎嚢胞を認めた (図 1)。尿細管マーカーのウロモジュリンで免疫染色をした結果、嚢胞壁に沿って染色された。一方、血管内皮マーカーである CD31 染色は陰性であることが

ら、尿細管の拡張であることを確認した。

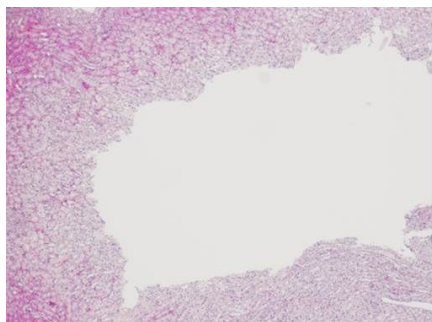


図1 TRPP2 697fsXトランスジェニックマウスの腎臓(HE染色、x100)

次に TRPP2 697fsx トランスジェニックマウスの腎機能の評価を行った。4 週齢の時点で蛋白尿を認めた。4 週齢の時点で、血清 Cr  $3.67 \pm 0.30$  mg/dL と腎機能障害を認めた(図2)。

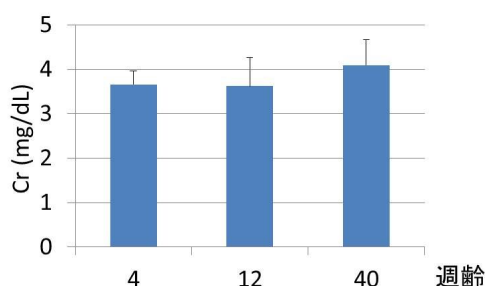


図2 TRPP2 697fsXトランスジェニックマウスの腎機能

PKD1 および PKD2 は尿細管の cilia に発現し、機械感受性チャネルとして作用していることが知られている。そこで、我々は TRPP2 697fsx トランスジェニックマウスにおいても尿細管に cilia が存在しているか確認するために、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて免疫染色した。その結果、ヒトの ADPKD 患者と同様に TRPP2 697fsx トランスジェニックマウスにおいても尿細管上皮に cilia の発現を認めた。

以上の結果より、TRPP2 697fsx トランスジェニックマウスは少なくとも6月齢において腎臓に嚢胞形成を認め、腎機能障害を認めることが明らかとなった。しかしながら、4 週

齢という早期の段階ですでに血清 Cr の上昇を認めた機序については不明であり、今後さらなる検討が必要である。

我々は、本研究において脳動脈瘤破裂の既往のある ADPKD 患者より見出した遺伝子変異を組み込んだ TRPP2 697fsX トランスジェニックマウスを作製し、腎病変を解析した。その結果、TRPP2 697fsX トランスジェニックマウスで嚢胞腎の形成を認めた。すなわち、局在異常を認める PKD2 変異である TRPP2 697fsX が嚢胞形成を起こすことを確認した。今後、このマウスにおける嚢胞形成について詳細な検討を行っていく予定である。さらに、将来的には血管病変形成についてもこのマウスを用いて解析していきたいと考えている。

## 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2件)

1. Mizushima I, Inoue D, Yamamoto M, Yamada K, Saeki T, Ubara Y, Matsui S, Masaki Y, Wada T, Kasashima S, Harada K, Takahashi H, Notohara K, Nakanuma Y, Umehara H, Yamagishi M, Kawano M. Clinical course after corticosteroid therapy in IgG4-related aortitis/periaortitis and periarteritis: a retrospective multicenter study. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jul 23;16(4):R156 (査読あり)
2. Onoe T, Konoshita T, Tsuneyama K, Hamano R, Mizushima I, Kakuchi Y, Yamada K, Hayashi K, Kuroda M, Kagitani S, Nomura H, Yamagishi M, Kawano M. Situs inversus and cystic kidney disease: Two adult patients with this Heterogeneous syndrome. *Am J Case Rep.* 2013;14:20-5 (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1. Kazunori Yamada, Takahiro Kawakami, Ichiro Mizushima, Ryoko Hamano, Hiroshi Fujii, Masakazu Yamagishi, and Mitsuhiro Kawano. Abundant APRIL-Producing Macrophages in

IgG4-Related Kidney Disease. Second Interstitial Symposium on IgG4 and Related Disease. Sheraton Waikiki, Honolulu U.S.A., 2014-2-16-19.

2. 小野江為人、此下忠志、山田和徳、濱野良子、水島伊知郎、黒田昌宏、鍵谷聡志、川野充弘. 全内蔵逆位を合併した嚢胞性腎疾患2例における遺伝学的検討. 第56回日本腎臓学会学術集会. 東京国際フォーラム(東京), 2013年5月10-12日
3. 水島伊知郎、山田和徳、松永貴弘、鈴木康倫、川村里佳、濱野良子、藤井博、松村正巳、川野充弘. IgG4関連腎臓病におけるマクロファージ、APRILの関与. 第56回日本腎臓学会学術集会. 東京国際フォーラム(東京), 2013年5月10-12日
4. 山田和徳、川上貴裕、水島伊知郎、鈴木康倫、藤井博、松村正巳、川野充弘. IgG4関連腎臓病におけるAPRIL発現の検討. 第21回日本シェーグレン症候群学術集会. ウェスティン都ホテル京都(京都), 2012年9月7-8日
5. 山田和徳. マウス IgG1 型抗赤血球抗体の解析. 森シンポジウム「次世代のイオンチャンネル研究を考える会」. 2011年9月23日, 京都ホテルエミナース(京都)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 和徳 (YAMADA, Kazunori)  
金沢大学大学院・医薬保健学総合研究科・  
特任准教授  
研究者番号：90397224