

## 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：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791190

研究課題名(和文)上皮間葉移行(EMT)に着目した多発性嚢胞腎の病態特異的治療の開発

研究課題名(英文)Disease specific therapy for polycystic kidney disease based on EMT

研究代表者

戸川 寛子(TOGAWA, Hi roko)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30445093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎(PKD)の病態には上皮間葉移行(EMT)が関与すると考えられる。本研究ではPKDにおけるEMTの情報伝達系を明らかにするとともに、その情報伝達系をターゲットとした病態特異的治療の可能性を検討した。

CPKマウスにおいて、TGF-β/Smad3系は量的異常より質的異常が存在し、JNK/CDK4を介した核内pSmad3L/C作用によるc-Mycの発現増強が示された。

さらに、Smad3ノックアウトとCPKのダブルミュータントを作製し、Smad3の修飾による疾患表現型の変化について検討した。これらの知見により、疾患特異的治療開発のための基礎データを収集した。

研究成果の概要(英文)：Epithelial mesenchymal transition (EMT) is thought to be involved in pathophysiology of polycystic kidney disease (PKD). We determined a signal transduction of EMT in PKD in this study and examined possibility of pathophysiology-specific therapy that targeted the signal transduction.

In CPK mouse, qualitative rather than quantitative abnormality was present in the TGF-beta/Smad3 system, and enhanced expression of c-Myc by intranuclear pSmad3L/C effects through JNK/CDK4 was shown. Furthermore, we made Smad3 knock-out and CPK double mutant and examined changes of the disease phenotype by modification of Smad3. With these findings, we obtained the basic data for disease-specific therapy developments.

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：遺伝性腎疾患 多発性嚢胞腎 上皮間葉移行 CPKマウス TGF-β Smad3 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。

EMTの強力な誘導因子としてTGF- $\beta$ が重要である。TGF- $\beta$ のシグナルは、Smad経路およびSmad非依存性のRas/Rho/MAPキナーゼ経路により伝達される。腎線維化・EMTにおいて、TGF- $\beta$ /Smad3経路の重要性が示唆されるが、PKDにおける検討は未だなされていない。そこで、本研究では、PKDのEMTにおけるTGF- $\beta$ /Smad系について検討し、その修飾による疾患特異的治療の可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

腎線維化・EMTにおいて、TGF- $\beta$ /Smad3経路が非常に重要な働きをすることが報告されている。TGF- $\beta$ のシグナルは、TGF- $\beta$ レセプターに伝わり、レセプターによって活性化されたSmad2/3は、核内に移行後、標的遺伝子の転写因子として作用する。腎線維化モデルで、TGF- $\beta$ およびSmad3の亢進が認められ、Smad3ノックアウトマウスではEMTが抑制されることが報告されている。

CPKマウスは、自然発症のARPKDモデルであり、現在世界中で最も解析されているモデルである。原因遺伝子はシスチンという繊維毛関連蛋白である。我々の先行研究を含め、CPKマウスにおいてTGF- $\beta$ およびSmad3

の亢進が確認されており、病態に関与することが示唆される。そこで本研究では、TGF- $\beta$ /Smad3系が関与する病態の詳細を明らかにし、それらを修飾することで、病態を変化させることができるかを検討した。これらにより疾患特異的治療開発のための基礎データを収集した。

## 3. 研究の方法

### < CPKマウスARPKDモデル >

CPKマウスは、ARPKDモデルで、世界で最も解析されているPKDモデルである。尿細管上皮細胞における極性異常を示す。起源は自然発症モデルであるが、近年原因遺伝子がクローニングされ、PCRにより遺伝子型の決定が可能である。

生後1日、7日、14日、21日、28日のCPKマウスおよび同日齢の同腹のマウス(対照)を用いた。

### < 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た。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

遺伝子発現：in situ hybridization、リアルタイムPCRなど

< cpkマウスにおける線維化・EMTの確認 >  
E-cardherin、Vimentin、 $\alpha$ -SMA、FSP-1、type I collagen、fibronectinなど

< TGF- $\beta$ /Smad系シグナルの関与について >  
TGF- $\beta$ 、Smad3、Smad4、Smad7など

< EMTにおけるTGF- $\beta$ /Smad系シグナルの関与の関与について >

Smad3ノックアウトマウスでは、TGF- $\beta$ の影響を受けず、EMTが抑制されることが予想される。そこで、Smad3ノックアウトマウスとCPKマウスのダブルノックアウトマウスを利用し、腎線維化・EMTおよび嚢胞形成の程度に変化が見られるかを上記手法を用いて評価した。

Smad3を発現しないCPK個体において、嚢胞が抑制される事実が確認されれば、Smadを抑制するという治療戦略の可能性が拓かれる。

#### 4. 研究成果

免疫染色の結果、 $\alpha$ -SMA が CPK の嚢胞上皮で発現し間葉系表現形が確認された。pSmad3L は CPK の尿細管上皮の核で有意に増強していたが、pSmad3C は CPK と対照で同程度であった。Western Blotting では、pSmad3L、pJNK、pCDK4、c-Myc が CPK の核で有意に上昇していたが、pSmad3C は CPK と対照で同程度であった。免疫沈降で CPK における pSmad3L/C の有意な上昇を確認した。

以上より CPK マウスにおいて、TGF- $\beta$ /Smad3 系は量的異常より質的異常が存在し、JNK/CDK4 を介した核内 pSmad3L/C 作用による c-Myc の発現増強が示された。

さらに、Smad3 ノックアウトと CPK のダブルミュータントを作製し、Smad3 の修飾による疾患表現型の変化について検討した。Smad3/CPK ダブルミュータントでは CPK と比較して TGF- $\beta$ /Smad3 系の異常が抑制されており、これらの知見により、疾患特異的治療開発のための基礎データを収集しえた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 戸川寛子, 中西浩一, 吉川徳茂: 髄質嚢胞腎. 腎臓症候群(第2版) - その他の腎臓疾患を含めて - 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ17:600-602, 2012. (査読無し)

〔学会発表〕(計11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. 46<sup>th</sup> 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. 15<sup>th</sup> 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. 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. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov.1-Nov.4, 2012 in San Diego, USA. JASN 2012;23:596A

8. 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
9. 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. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Nov.8-Nov.13, 2011 in Philadelphia, USA. JASN 22:576A
10. 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
11. 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

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

戸川 寛子 (TOGAWA, Hiroko)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 3 0 4 4 5 0 9 3