

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号	24303
研究種目	若手研究（B）
研究期間	2011～2012
課題番号	23791777
研究課題名（和文）	マウス片側尿管閉塞モデルを用いた MRTF 分子を介する新しい腎間質線維化機構の解明
研究課題名（英文）	The elucidation of the MRTF mediated molecular mechanism of renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy
研究代表者	
	木村 泰典 (Kimura Yasunori)
	京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号	20398374

## 研究成果の概要（和文）：

in vitro では、ラットの腎筋線維芽細胞 NRK-49F の MRTF の活性を siRNA でノックダウンすると、NRK-49F は筋線維芽細胞としての形質を失い、細胞外基質の分泌能を低下させることが Western blot 法、phalloidin 染色法の結果から証明できた。また、生体内での MRTF 分子の腎間質線維化制御への関与については、片側尿管閉塞マウスモデルを用いて腎線維化を誘導する際、MRTF の siRNA で MRTF の活性を落とすことによって、腎間質線維化阻害効果が得られるかどうかを現在検証中である。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined the effect of MRTF inhibition by MRTF siRNAs on the activation of renal interstitial fibroblasts in a rat renal interstitial fibroblast line (NRK-49F) and on the development of fibrosis in a mouse model of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO). In vitro, we confirmed the functional significance of MRTF for the maintenance of fibroblast phenotype. However, in a mouse model of UUO, we have not confirmed that MRTF siRNAs can decrease renal interstitial fibrosis yet. Because the effectiveness of MRTF siRNAs is not sufficient, we can not obtain the exact results. Recently, we have been examining the right conditions of MRTF siRNAs transfections.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学・再生医学

キーワード：1 腎線維化 2 MRTF 3 片側尿管閉塞マウスモデル 4 上皮間葉転換

### 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換(EMT)の進行によって誘発される腎間質線維化を特徴とする閉塞性腎症は最終的には慢性腎不全への転帰をたどる。機械的伸展刺激や TGF- $\beta$  が線維化に関与する報告があるが、その詳しい分子メカニズムは今のところ分かっていない。

Myocardin Related Transcription Factor (MRTF)は体中の全ての細胞で発現している遺伝子で、その機能に関しては筋肉細胞における筋分化に関与する以外、現在ほとんどわかっていない。我々は myocardin ならびに MRTF の抗体を自ら作成し、免疫組織染色を成功させた実績と、マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験で、TGF- $\beta$  の下流にある線維化マーカー遺伝子群が MRTF で制御され、MRTF が EMT に関与することを研究していた実績から、*in vivo* における腎組織線維化の過程においても MRTF が重要な働きをしているのではないかと考え、この研究を立ち上げた。

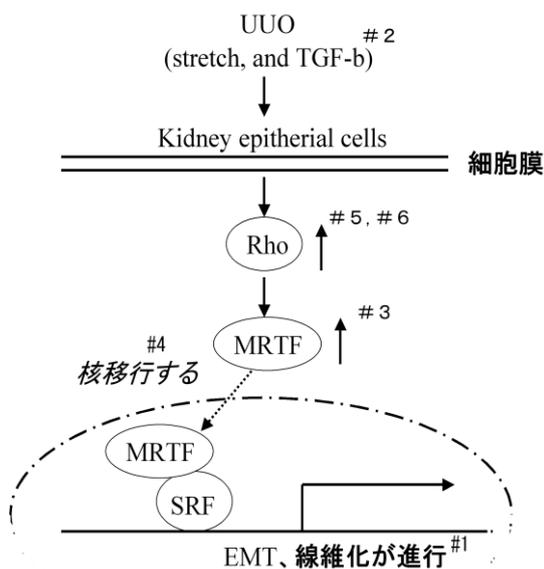
### 2. 研究の目的

MRTF 分子が腎間質線維化を制御する鍵となる重要な分子であり、そのシグナル経路を明らかにすること、その結果を将来の逆流性腎症や慢性腎不全の治療法開発に繋げていくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

以下の模式図が過去の文献や我々の preliminary data から推測される MRTF を介する腎間質線維化の分子メカニズムである。尿管閉塞による機械的伸展、TGF- $\beta$  の活

性の上昇が、GTP 結合タンパクである Rho の活性を上昇させ、そのシグナルにより、MRTF の発現上昇、核移行が誘導され、EMT や線維化を促す細胞外基質の産生が促進されるという概念である。



具体的な方法として以下の実験を行った。

1、*in vitro* の実験において、ラットの腎筋線維芽細胞 NRK-49F に対し、MRTF の siRNA を導入する。MRTF の活性を落とすと、線維芽細胞としての形質が失われ、細胞外基質の分泌が低下することを western blot 法で示す。これにより MRTF 分子が EMT、線維化進行の鍵となる分子であることを示す。

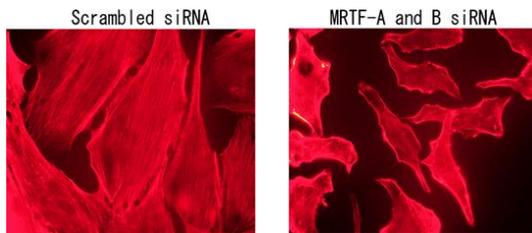
2、*in vivo* の実験に移る。片側尿管閉塞マウスモデルを用いて腎線維化を誘導する。その際、線維化の進行に伴い MRTF の発現量や分子の局在を western blot 法と免疫組織染色法を用いて評価を行う。MRTF 分子が EMT、線維化進行の鍵となる分子であると推

測されるため MRTF の siRNA を投与する群としない群とで、腎線維化の程度の差を比較する。

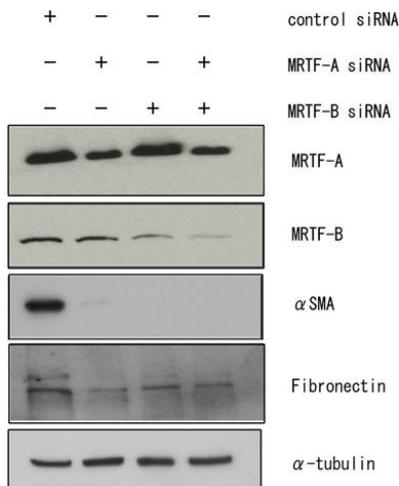
#### 4. 研究成果

1、in vitro の NRK-49F を用いた実験では、MRTF の siRNA を導入することで MRTF の活性を落とすと、NRK-49F は細胞質内の筋原繊維様収縮装置を失い、特徴的な中胚葉由来筋系分子マーカーの発現も低下、筋線維芽細胞としての形質を失い、細胞外基質の分泌能を低下させることが、western blot 法, phalloidin 染色法でわかった。つまり MRTF 分子は線維芽細胞としての形質を維持し、細胞外基質を分泌するために必要な分子であると言えた。

Phalloidin 染色



NRK-49 細胞に対する MRTF siRNA の効果



2、次に in vivo の実験に移った。この生体内での実験は現在も進行中で、データを蓄積している最中である。

まず最初にマウス片側尿管結紮モデルの条件検討を行なった。10 週齢 C57BL/6 マウスで左側尿管結紮術後、collagen1 を染める sirius red 染色を行なったところ、腎線維化は 7 日目で完成されることを確認した。また摘出腎組織において MRTF の免疫組織染色を行い、その染色条件も確立した。片側尿管結紮後、腎線維化が進行していくにつれ、MRTF の発現が上昇することが western blot 法で確認された。

3、現在は腎間質線維化において生体内で MRTF が中心的役割を果たしていることを証明するため、MRTF の siRNA をマウスに投与し、MRTF 活性を落とすことで、腎の間質線維化抑制効果が得られることを検証している。尿管結紮術後、MRTF の siRNA を投与した群と、対照となる control siRNA を投与した群とで線維化の程度を sirius red 染色を用いて比較している。しかしながら、MRTF の knock down が生体内ではうまく効かず、knock down 効率をあげるための条件検討を現在施行中である。

#### 5. 主な発表論文等

当研究の研究成果は現在データ蓄積中のため論文、学会発表はまだ行っていない。

[産業財産権]

産業財産権の出願はなかった。

[その他]

特記すべきことなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 泰典 (Kimura Yasunori)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20398374