

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24592450  
 研究課題名(和文)多発性嚢胞腎の細胞マトリックス接着応答とエピジェネティクス修飾による治療法の研究  
  
 研究課題名(英文)Basic studies of therapeutic modality for polycystic kidney disease explored by epigenetic modification of cellular matrix-adhesion proteins  
  
 研究代表者  
 石橋 道男(Ishibashi, Michio)  
  
 奈良県立医科大学・医学部・研究員  
  
 研究者番号：40107032  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎の嚢胞化進展機序の検討として、PCKラット5週令雄にベンゾイソフラノン誘導体化合物を5週間投与し病理学的検討と凍結腎組織の細胞マトリックスに関わるHIF-1、Galectin-3、DNMT1とMlana、RTL1、Gypsy integrase-1(Gin1)の遺伝子についてmRNA発現とDNAメチル化レベルの解析をおこなった。投与群では嚢胞サイズの縮小傾向、乳頭部集合管と毛細血管の温存と同時に、HIF-1 mRNAの減少とDNAメチル化レベルの上昇、血管新生に関わるMlana mRNAの増加、Gin1 mRNAの減少と嚢胞化進展にエピジェネティクス修飾の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of progression of polycystic kidney disease explored by the pathological pictures of PCK rat kidneys of 5-week old male, treated with Benzoisofuranone derivatives for five weeks, and the epigenetic modification of cellular matrix-adhesion protein genes such as HIF-1, Galectin-3, DNMT1, Mlana, RTL1, Gypsy integrase-1 (Gin1) in frozen PCK kidney tissues. The pathology of beneficial findings of PCK rat kidney treated, showed stabilization of ductal tubules and that of peri-ductal capillary without sludging of blood, and minimization of cystic mass growing. The response of HIF-1 mRNA expression of frozen kidney was decreased with concomitant increase of DNA methylation level, which is beneficial response of anti-fibrosis of PCK kidney. An increase of mRNA expression of Mlana, having function of angiogenesis, and a decrease of that of Gin1 were observed. Those findings suggested that an epigenetic modification played a role in the progression of PCK kidneys.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：多発性嚢胞腎 PCKラット 細胞マトリックス ベンゾイソフラノン誘導体

## 1. 研究開始当初の背景

分担研究者の長尾は、遺伝性疾患であるヒト多発性嚢胞腎モデルとして PCK ラットを継代維持し、PCK ラットを用いた嚢胞進展機序について研究している。PCK ラットは2000年に勝山により Sprague-Dawley ラットのなかから発見されたものである。疾患表現型は常染色体性優性多発性嚢胞腎と常染色体性劣性多発性嚢胞腎の混合型であるが遺伝形式は Pkhd1 でヒト常染色体性劣性多発性嚢胞腎と相同遺伝子である。生後5週より顕在化し初期には集合管由来嚢胞を示し、後にネフロン全域に達する。

腎嚢胞化進展過程にみられる E カドヘリン発現抑制について、中西、長尾らは、PCK ラットの嚢胞化進展過程における Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT と略す、上皮間葉転換)の関与を検討した。嚢胞化をきたした嚢胞性尿細管細胞に正常の E カドヘリン発現は、外側に偏移して発現が弱まり間葉系の特徴であるビメンチンとフィブロネクチンが強く発現していることを示した (H Togawa, K Nakanishi, H Mukaiyama et al. Am J Physiol Renal Physiol 300:F511-F520, 2011)。

一方、遺伝性疾患の多発性嚢胞腎において、E カドヘリンがエピジェネテイクス修飾をうけているかはまだ明らかにされていない。また、E カドヘリンは成体の組織の再生にかかわる Wnt シグナル系の制御活性を有することから、発癌の抑制だけでなく、臓器組織の修復再生の面からも重要な蛋白分子として研究が進展する可能性を有する。

本研究の特色と独創性は、第一に、E カドヘリンの機能維持と同時に嚢胞化進展を抑制することによって、cilia の機能障害を部分的に是正する効果が多発性嚢胞腎の治療上の意義が見いだせるかにある。第二には、嚢胞化進展において、細胞マトリックス接着の応答に関わる蛋白分子について、おもに研

究されている蛋白分子である Wnt 経路以外に JAK-STAT、E カドヘリン、collagen-1、MMP-9、1 インテグリン、ガレクチン-3、4F2hc/CD98、Asc-1/4F2hc についてのエピジェネテイクス修飾を検討し、cilia の機能障害との関連を検討する点にある。E カドヘリンはエピジェネテイクス修飾をうけ発癌や転移と関わることを示されている。

本研究代表者は新規ベンゾイソフラノン誘導体化合物を見出し、その効果を検討したところ *in vitro* におけるラット尿細管培養細胞株 NRK 52E にヒト TGF- $\beta$ 1 を添加して生じる EMT 現象を阻害し尿管上皮機能を強力に維持することを見出している (Book of Abstract in 2010 Nexus Symposium on Fibrosis and the Kidney of International Society of Nephrology, 2010: P0-046 Michio Ishibashi)。

今回、NK0070 化合物投与により何らかの腎嚢胞化進展が抑制され細胞マトリックス接着の応答に関わる蛋白分子にエピジェネテイクス修飾応答への作用が認められれば、あたらしい観点からの多発性嚢胞腎への治療法への研究の第一歩となる可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に、PCK ラットに NK0070 を生後5週令から15週令まで投与し、機能的、形態的に髄質集合管から皮質側までに形成される嚢胞の程度を比較し本化合物の有効性を検討する。第二に、未治療で対照群の PCK ラットにおける E カドヘリンの機能低下がエピジェネテイクス修飾をうけ機能発現が減弱しているかを明らかにする。そして、1 インテグリンと E カドヘリンは協同して作用することが知られており (Weber, J Cell Science 2011)。

1 インテグリンは 4F2hc/CD98 と関連して作用すること (Ito 2002)、また、ガレクチン

ー 3 は糖鎖結合蛋白で多彩な機能として発生、血管新生誘導、抗アポトーシス作用などを示す (Rabinovich1999) が、4F2hc/CD98 をそのレセプターとする。Asc-1 は 4F2hc/CD98 の light chain であり、神経組織、腎糸球体に局在するが P C K ラットの嚢胞腎の cilia に局在するかはまだ検討されておらず免疫染色にて調べる。また、細胞外マトリックスを形成するコラーゲン 1、蛋白分解作用と細胞接着融合を有す MMP-9 および Wnt, JAK-STAT についてエピジェネテイクス修飾を受けたかを P C K ラット嚢胞腎の摘出腎凍結組織を用いて検討することとした。

以上により、本研究は、尿細管上皮細胞における E カドヘリンへの機能維持を有す新規ガンマラクトン誘導体、NK 0 0 7 0 の投与実験を行い、嚢胞化進展を抑制する効果と同時に嚢胞化進展過程における細胞マトリックス接着応答に関わる蛋白分子がエピジェネテイクス修飾の調節を受けたかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

PCK ラット、雄 5 週令から 1 0 週令までの間に新規ベンゾイソフラノン誘導体 NK 0 0 7 0 の投与実験による有効性

NK0070 化合物 (30mg/kg/day, sc) による治療群 (n = 3)

対照群(vehicle として 5%gum arabic, sc) (n = 3)

評価：5 週間連日投与による実験終了時に左右腎を摘出する。嚢胞形成の形態的評価、腎重量、血漿中クレアチニン値、alpha-tubulin 抗体による cilia の免疫染色を実施した。

ラット尿細管細胞株 NRK52E をヒトリコンピナント TGF-beta1 で刺激したのちの培養細胞から DNA を抽出し、パイサルファイト変換処理の後、E カドヘリン、1 インテグリン、ガレクチン-3、コラーゲン 1、HIF-1、4F2hc/CD98、Asc-1、MMP-9 について蛋白分子

のプライマーをもちいてパイロシークエンサーにてメチル化状態を解析した。その結果から、E カドヘリンに関してはエピジェネテイクス修飾について変化がなかったことから解析から除外した。

また、新規ベンゾイソフラノン誘導体 NK 0 0 7 0 の標的タンパクを推定するために in silico 解析をおこなったところ、ヒト HIV-1 integrase、DNMT1 が候補蛋白のひとつの可能性が指摘された。

以上より、細胞マトリックス蛋白のエピジェネテイクス修飾解析の対象として蛋白遺伝子として、HIF-1、DNMT1、galectin-3 を canonical genes として、ラット内在性レトロウイルスからの gag gene から解析可能な Mlana と RTL1 その他の Gypsy integrase 遺伝子を non-canonical genes のもととして選定した。以上の 6 つの遺伝子について細胞マトリックス蛋白の mRNA 発現と DNA メチル化レベルを検討した。

新規ベンゾイソフラノン誘導体の NK 0 0 7 0 の合成は、分担研究者の小島が京都薬科大学においてラットへの投与実験に必要な化合物の合成をおこなった。

なお、DNA のエピジェネテイクス解析は分担研究者の千原が実施した。DNA メチル化の測定は、組織試料から DNA を抽出し、パイサルファイト変換処理の後、各蛋白分子のプライマーをもちいてパイロシークエンサーにてメチル化レベルを従来の方法で解析した (EM Wolff, Y Chihara et al. Cancer Res, 2010;70:8169-8178)。

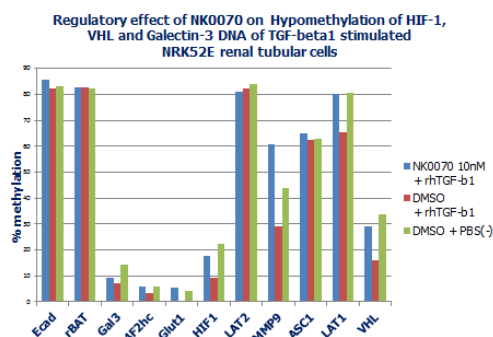
当初の研究計画では、Wnt、P C P、JAK-STAT など cilia と関連ある蛋白分子について P C K ラット組織をもちいてエピジェネテイクス解析を実施する予定であったが予備実験の段階にまでいならず、今回研究成果に加えることはできなかった。

### 4. 研究成果

4.1. 平成24年度の初年度の研究成果について：

多発性嚢胞腎の動物モデルPCKラットの嚢胞化進展過程においてEpithelial-Mesenchymal Transition (EMT)が関与している可能性が示唆された。本研究の目的として、その解析アプローチとして、EMTを強く阻害する新規ベンゾイソフラノン誘導体低分子化合物のうちNK0070を投与し嚢胞化進展を抑制する効果と、in vitroにおける細胞マトリックス接着応答に関わる蛋白分子についてエピジェネティクス修飾を検討した。平成24年度の研究成果として以下の結果を得た。第一点は、NK0070は明らかにPCKラットの多発性嚢胞腎の嚢胞化の進展を病理形態的に抑制した。すなわち、髄質に発生する嚢胞サイズの縮小傾向、乳頭起始部と皮質間を走る髄質嚢胞間の索組織は太く結果として皮質部の小嚢胞の形成が抑えられた。

第二点は、細胞マトリックス接着の応答蛋白分子のDNAメチル化によるエピジェネティクス修飾を検討した。ラット腎尿管細胞株NRK52Eを、in vitroにおいてhuman recombinant TGF-1(hrTGF 1)で刺激培養すると5日前後で形態的に線維芽細胞様に変化していく。細胞を採取しDNAを抽出しバイサルファイト処理しpyrosequencerにてDNAメチル化を測定した。



NK0070を添加しvehicleと比較した。HIF-1、VHL、Galectin-3、MMP9、LAT1はhrTGF 1刺

激により低メチル化を生じたがNK0070は10nM、100nMの濃度で低メチル化への抑制を阻害し、分子の発現を相対的に抑制した。ただし、E-cadherinのメチル化に変化がなかった。以上、NK0070低分子化合物の効果から、PCKラットの嚢胞化進展過程に細胞マトリックス接着に関わる分子の関与が示唆された。

4.2. 平成24年度から平成26年度までの3年間の「多発性嚢胞腎の細胞マトリックス接着応答とエピジェネティクス修飾による治療法の研究」成果：

#### 1) PCKラットの多発性嚢胞腎の嚢胞化進展に関する病理形態的評価

PCKラット、雄5週令から10週令までの間に新規ベンゾイソフラノン誘導体NK0070の投与実験による有効性について、NK0070化合物(30mg/kg/day, sc)による治療群(n=3)、対照群(vehicleとして5% gum arabic, sc)(n=3)の6例の結果を下記に示した(表1)。

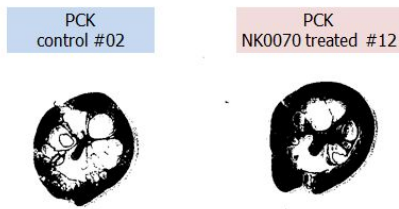
Exp 3			
from 09oct2012 to 14nov2012		control #01	NK0070-treated #11
5w	10w		
Body weight (gram)		411	419
kidney weight (gram)	Right	2.95	2.83
	Left	3.02	2.83
plasma Cr (mg/dl)/BUN		0.28/20.7	0.28/17.6
from 01nov2012 to 12dec2012		control #02	NK0070-treated #12
5w	10w		
Body weight (gram)		405	401
kidney weight (gram)	Right	2.39	2.59
	Left	2.39	2.44
plasma Cr (mg/dl)/BUN		0.23/17.4	0.25/19.7
from 07jan2013 to 14feb2013		control #03	NK0070-treated #13
5w	10w		
Body weight (gram)		342	337
kidney weight (gram)	Right	2.25	4.03
	Left	2.40	3.39
plasma Cr (mg/dl)/BUN		0.23/18.1	0.23/20.2

対照群と投与群は同一に出生したなかで実験に適したペアとした。すなわち、Control#01とNK0070-treated #11、Control#02とNK0070-treated #12、Control#03とNK0070-treated #13をペアとして有効性を比較した。

PCK control #02(左)とPCK NK0070 treated #12(右)のプレパートを実物大でコピーした。

## 子のエピジェネテイクス解析

図-1

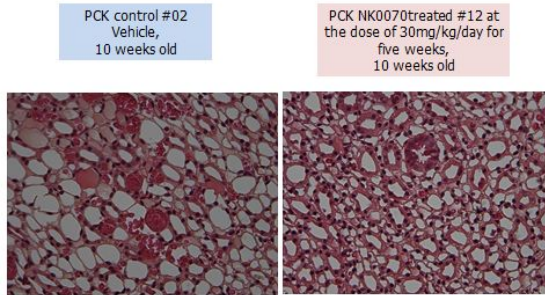


治療例の体重は 401 g で対照の 409 g より小さく、腎重量は左右腎ともに重かった。

NK0070 投与例では PCK ラットの多発性嚢胞腎の嚢胞化の進展を病理形態的に抑制傾向を示した。すなわち、髄質に発生する嚢胞サイズの縮小傾向、乳頭起始部と皮質間を走る髄質嚢胞間の索組織は太く、乳頭サイズに萎縮がみられず、結果として皮質部の小嚢胞の形成が抑えられた。

病理組織学的にみられた特徴として、下記の図 2 に示すが、乳頭部起始部の集合管に並走する毛細血管内腔に赤血球凝集塊の付着した現象、血液泥化 (sludging of blood) の現象が治療群で軽減していた。

図-2

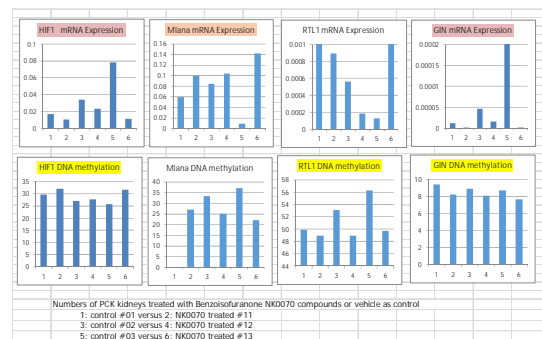


くわえて、乳頭部の集合管の萎縮と拡張が対照群に観察され、傍集合管毛細血管の形態的、機能的な維持が NK0070 投与群に特徴的な所見として観察された。血管内皮の障害や、血管新生などの形態的、機能的な改善がえられた可能性が推測された。

2) PCK ラットの多発性嚢胞腎の嚢胞化進展に関する細胞マトリクス蛋白分

細胞マトリクス蛋白のエピジェネテイクス修飾解析の対象として、検討対象の蛋白遺伝子として、HIF-1、DNMT1、galectin-3 を canonical genes として、ラット内在性レトロウイルス (Endogenous retrovirus, ERV) からの gag 関連遺伝子から解析可能な *Mlana* と *RTL1* のふたつの遺伝子、その他の Gypsy integrase 遺伝子を non-canonical genes のもととして 6 つの遺伝子を選定し、PCK の表 1 にしめした 6 例の PCK ラットの腎臓から RNA と DNA を得て、細胞マトリクス蛋白の mRNA 発現と DNA メチル化レベルを検討した。

その結果を図 3 を下記にしめした。



実験群の PCK ラット凍結保存腎組織の mRNA 発現と DNA メチル化レベルを測定した(千原、東原、石橋)。結果は、対照群と比較して治療群において、mRNA レベルの発現が増加したのは *Mlana* で、減少したのは *RTL1*、*Gypsy integrase-1 (Gin1)*、*HIF-1*、*Galectin-3* であった。*Mlana* の DNA メチル化レベルは低下していた。一方、mRNA レベルが減少した *RTL1*、*Gypsy integrase-1 (Gin1)*、*HIF-1*、*Galectin-3* の DNA メチル化レベルに増加したものはなく DNA 脱メチル化などの関与が推察された。

結果を表 2 として以下にまとめた。

Involvement of Cellular matrix proteins in kidneys of PCK rats treated with NK0070 at 30mg/kg/day versus vehicle for 5 weeks			
Genes		Comparison of mRNA or Epigenetic response between NK0070 treatment and vehicle	
canonical	non-canonical	Expression of mRNA	Level of DNA methylated
<i>HIF1</i>			
<i>Galectin-3</i>		not significant	not significant
	<i>Mlana*</i>		not significant
	<i>RTL1*</i>	not significant	
	<i>Gypsy Integrase*</i>		
<i>DNMT1</i>		not significant	not significant

\* indicated as Endogenous retrovirus associated genes

#### 4.3. 要旨と結語

ヒト多発性嚢胞腎モデルのPCKラットにベンゾイソフラノン誘導体化合物の投与により皮質髄質に発生する嚢胞サイズの縮小傾向、乳頭部集合管と毛細血管の温存、乳頭部起始部の集合管に並走する毛細血管内腔に赤血球凝集塊の付着した現象、血液泥化 (sludging of blood) が軽減し病理学的に嚢胞進展の抑制の可能性が示唆され、細胞マトリックスに関わる蛋白質として *HIF-1*、*Galectin-3*、*DNMT1* と、血管新生に関わる内在性レトロウイルスの *Mlana*、*RTL1*、*Gypsy integrase-1* の計6種類の遺伝子についての mRNA 発現と DNA メチル化レベルの解析の結果から細胞マトリックスに関わる *HIF-1*、*Mlana*、*Gypsy integrase-1* 遺伝子の関与が示唆された。

以上より、細胞マトリックスとしての毛細血管の構造と機能が温存されネフロンが維持され腎皮質部の小嚢胞化形成が抑制され、その機序として血管新生に関わる遺伝子のエピジェネティクス機構の関与が示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：  
 取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：  
 〔その他〕  
 ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石橋 道男 (ISHIBASHI, Michio)  
 奈良県立医科大学・医学部・博士研究員  
 研究者番号：40107032

##### (2) 研究分担者

東原 英二 (HIGASHIHARA, Eiji)  
 杏林大学・医学部・教授  
 研究者番号：00092312

長尾 静子 (NAGAO, Shizuko)  
 藤田保健衛生大学・医学部・疾患モデル教育  
 研究センター・准教授  
 研究者番号：20183527

千原 良友 (CHIHARA, Yoshitomo)  
 奈良県立医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：40405395

小島 直人 (KOJIMA, Naoto)  
 京都薬科大学・薬学部・講師  
 研究者番号：904204413

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：