

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790385

研究課題名(和文)腎線維化の進展におけるWnt5a-Rorシグナルの解析

研究課題名(英文)Analysis of Wnt5a-Ror signaling in renal fibrosis

研究代表者

山形 薫(YAMAGATA, Kaoru)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80533786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全モデルマウスの腎の尿細管上皮細胞においてRor2(Wnt5a受容体)の発現誘導を見出した。さらに、Ror2陽性細胞において基底膜破壊酵素MMP-2の発現誘導を見出した。予想されたことに、Ror2陽性細胞に隣接した基底膜が破壊されていることを確認した。以上より腎不全病態におけるWnt5a-Ror2シグナルの重要な役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Expression of receptor tyrosine kinase Ror2 is induced in the affected kidneys of UUO model mice by western blotting. Further, MMP-2, involved in disruption of basement membrane, is induced in Ror2-positive renal epithelial cells by immunofluorescence. Expectedly, disrupted basement membrane is observed in the neighborhood of Ror2-positive cells, indicating crucial role of Wnt5a-Ror2 signaling in the progression of renal malfunction.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Wnt5a Ror2 UUO MMP-2 腎不全 腎線維化 基底膜破壊

## 1. 研究開始当初の背景

分泌型シグナルタンパク質である Wnt ファミリー分子 Wnt5a は、多細胞生物の発生における形態形成過程やがん細胞の浸潤・転移等の病的状況下において重要な機能を担っているが、不明な点が数多く残されている。Wnt5a は非古典的シグナルである Wnt5a-Ror2 シグナル伝達経路を作用させ、古典的経路における  $\beta$ -catenin に依存した LEF/TCF による転写機構を抑制するとともに、 $\beta$ -catenin 非依存的に細胞極性・移動、浸潤を制御する (Nomachi A et al., J Biol Chem 2008; 283: 27973-81; Nishita M et al., J Cell Biol 2006; 175: 555-62; Enomoto M et al., Oncogene 2009; 28: 3197-208)。最近、我々は Snail を発現する扁平上皮癌細胞において、液性因子 Wnt5a と受容体型チロシンキナーゼ Ror2 (Wnt5a の受容体) が誘導されることを見出した。さらに、Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化により、がん細胞の浸潤・転移を制御するマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP)-2 の発現誘導を見出し、上皮間葉転換 (EMT) と密接に関わることを見出した。一方、EMT は組織線維化の進展と関わることを報告されている。そこで、Wnt5a-Ror2 シグナルが腎線維化の進展と関わる可能性を予想した。

## 2. 研究の目的

Wnt ファミリー分子は、細胞膜受容体への結合を介し、多様な細胞機能の制御を担う。これまで、組織線維化を制御する古典的 Wnt シグナル伝達経路の一端が解明されているが、非古典的 Wnt シグナル伝達経路の分子基盤は殆ど不明である。まず、腎線維化病変を一例に、病態に直結する非古典的 Wnt シグナル伝達経路を見出した後、その標的遺伝子を同定する。次に、それらの機能を生体内で評価する。さらに、腎線維化病態と直結する代謝物を検索・同定するために腎線維化組織を用いて、メタボローム解析を行う。

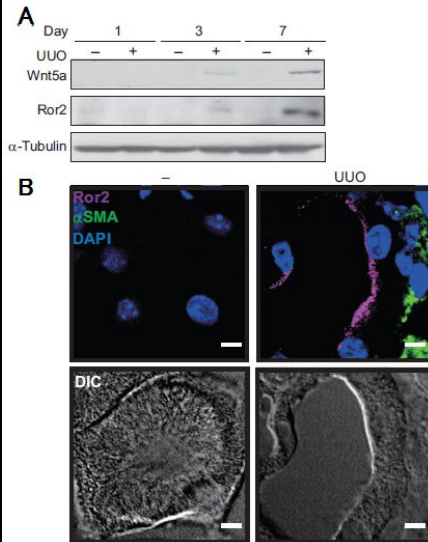
## 3. 研究の方法

Wnt シグナル伝達は多彩な細胞機能を制御するが、このシグナル伝達による組織線維化病態への関わりについては不明な点が多い。そこで、まず片側尿管閉塞 (UUO) により腎線維化モデルマウスを作成する。その後、腎組織から RNA とタンパク質を抽出し、それぞれ定量的 RT-PCR、ウェスタンブロッティングを行い、Wnt5a とそれに関連する因子の発現解析を行う。また、検索・同定された因子の部位を決定するために免疫組織化学解析を行う。加えて、各種遺伝子欠損マウスを用いて、各種 ECM マーカーを用いた免疫染色法による解析を行い、生体内における Wnt5a とそれに関連する遺伝子の発現・機能を明らかにする。さらに、腎線維化組織についてメタボローム

解析を行い、腎線維化に伴い産生変動する水溶性代謝物を検索・同定する。

## 4. 研究成果

### (1) マウス片側尿管閉塞操作 (UUO) 後、尿管上皮細胞にて発現誘導される因子として Ror2 を同定



腎線維化病変部において、Wnt5a が発現誘導されることが知られている。しかしながら、病態進展に関わる Wnt5a

図 1 A. マウス UUO 操作腎における Wnt5a と Ror2 の発現誘導。

B. UUO 操作側の尿管上皮細胞における Ror2 の発現誘導受容体の実態については不明である。そこで、腎からのタンパク質抽出液を使用し、ウェスタンブロッティング (WB) を行った。その結果、UUO 操作後 3 日で、Ror2 が発現誘導された (図 1 A)。つぎに、発現誘導される部位を解析するために、腎凍結切片を用いて、免疫蛍光染色 (IF) を行った。その結果、UUO 操作後 1 日で尿管上皮細胞にて Ror2 が発現誘導された。一方、線維化マーカーである  $\alpha$ SMA は上皮でなく間質で発現誘導された。以上より、Ror2 発現細胞と  $\alpha$ SMA 陽性細胞は共局在しなかった。また、Ror2 を発現する上皮と  $\alpha$ SMA を発現する間質の境界にはラミニンを中心とする細胞外基質からなる基底膜があり、腎病態における Ror2 発現細胞の役割は依然として不明である。

### (2) 尿管上皮における Ror2 発現細胞の性状解析

一般的に尿管上皮細胞は原尿から水、ブドウ糖等を再吸収する。しかし Ror2 発現尿管上皮細胞の役割は不明である。これまでに UUO 操作後の尿管上皮細胞は EMT を起こすことが報告されている。そこで、Ror2 陽性細胞と EMT の関連を解析することにした。二重 IF 染色法により、Ror2 陰性細胞では E-カドヘリンの発現が検出されるのに対し、Ror2 陽性細胞では E-カドヘリンが消失した (図 2A)。これらの結果により、Ror2 発現細胞では上皮系の形質が失われることが示唆され

た。さらに興味深いことに Ror2 陽性細胞にて、EMT を引き起こす転写因子 snail の発

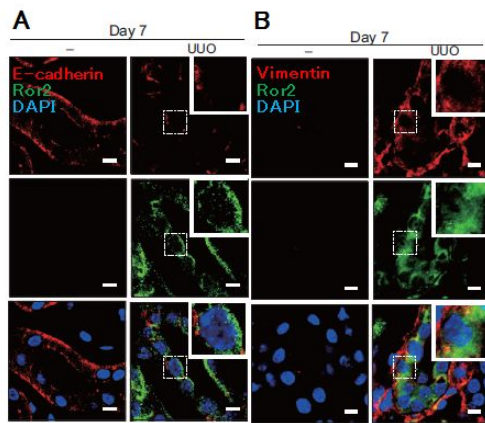


図 2. A. UUO 操作側の尿細管上皮細胞における E-カドヘリンの消失。B. UUO 操作側の尿細管上皮細胞における vimentin の出現。

現が見出された。また同じく EMT マーカーである vimentin の発現が見出された(図 2B)。これらの結果により Ror2 発現細胞は間葉系細胞の形質を獲得する可能性を示唆する。以上より、尿細管上皮細胞にて Ror2 が発現すると、上皮系の形質が失われ、間葉系の形質を獲得し EMT が誘導されることが示唆された。

### (3) Ror2 発現細胞における MMP-2 の実態解明

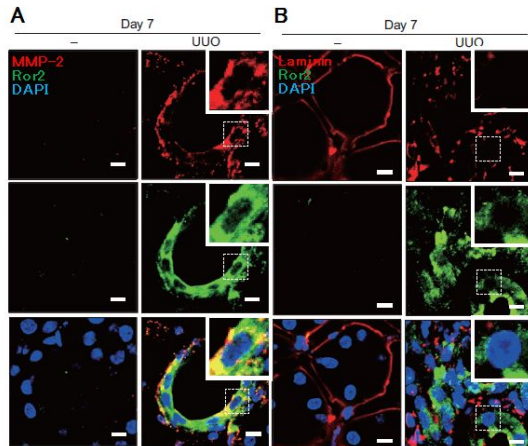


図 3. A. UUO 操作側の尿細管上皮細胞における MMP-2 の発現誘導。B. UUO 操作側の尿細管上皮細胞に隣接した基底膜構造の破壊。

EMT が誘導された Ror2 発現細胞による腎病態への関与については不明である。我々は扁平上皮癌細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化により、基底膜破壊酵素 MMP-2 の発現誘導を見出している。そこで、尿細管上皮細胞においても Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化により MMP-2 が発現誘導される可能性を考えた。その結果、二重 IF 法により、Ror2 陽性細胞において MMP-2 が発現誘導されることを見出した(図 3A)。この結果により、Ror2 発現細胞に隣接した基底膜は MMP-2 により分解される可能性が予想される。事実、二重 IF

法により、Ror2 発現に伴い、細胞外基質であるラミニンからなる基底膜構造が崩れていた(図 3B)。以上より、Ror2 を発現する尿細管上皮細胞は MMP-2 を発現誘導後、隣接する基底膜破壊がもたらされる可能性が示唆された。

### (4) 遺伝子欠損マウスを用いた生体内における MMP-2 の発現・機能解析

Ror2 シグナルが MMP-2 発現および尿細管基底膜に果たす遺伝学的役割は明らかではない。そこで、*Ror2*<sup>+/+</sup> と *Ror2*<sup>-/-</sup> マウスを UUO 操作後、腎タンパク質上清および腎凍結切片を用いて、それぞれ、WB および二重 IF 染色を行い、Ror2 の遺伝学的関与を解明することを考えた。WB 法により、*Ror2*<sup>+/+</sup> と比較して *Ror2*<sup>-/-</sup> マウスの腎病変において MMP-2 発現誘導が抑制された(図 4A)。また、IF 法により、*Ror2*<sup>+/+</sup> と比較して *Ror2*<sup>-/-</sup> マウスの尿細管上皮

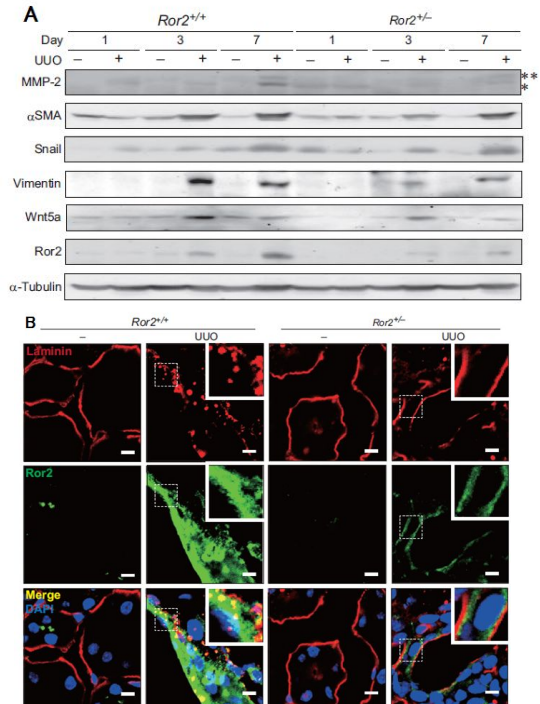


図 4. A. *Ror2*<sup>+/+</sup> と *Ror2*<sup>-/-</sup> マウスを UUO 操作後、腎における各種タンパク質の発現。B. *Ror2*<sup>+/+</sup> と *Ror2*<sup>-/-</sup> マウスを UUO 操作後、尿細管上皮基底膜の構造状態。

細胞において、MMP-2 染色が減弱していた。それに伴い、主にラミニンから構成される尿細管基底膜の構造が破壊されていた(図 4B)。以上の結果を踏まえ、尿細管上皮細胞において Ror2 シグナルの活性化により、MMP-2 が発現誘導され、隣接する基底膜の破壊をきたす可能性が示唆され、腎病態の形成に役割を果たすことが明らかになった。

### (5) 腎組織を用いたメタボローム解析による水溶性代謝物の検索・同定

炎症を起こした腎組織において代謝産物の発現変動が予想されるが、未だ報告例はな

い。そこで UUO 未操作および UUO 操作後の腎臓から水溶性代謝物を抽出した。その後、ガスクロマトグラフィ-質量分析法(GC-MS)により、代謝物を同定および各群における産生量の比較を行った。その結果、UUO 操作腎においてグルコース、フマル酸、グルタミン、ヒドロキシプロリンの増加を確認した。腎線維化の進展において各代謝物がどのように統合されて機能するのか解明することが今後の課題となる。

#### (6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

腎線維化病変において Wnt5a の発現が増加することが報告されている。しかしながら、その病的意義およびそのシグナルの実態は不明であった。本研究において、UUO 操作後の病変側の尿細管上皮細胞において Wnt5a の受容体として機能する Ror2 の発現が増加することを見出した。腎線維化において Wnt5a-Ror2 シグナルが機能的に関わる可能性が見出された。本シグナルの解析は腎線維化病態の解析において重要な基盤を担う可能性がある。

近年、腎線維化病変にて非古典的経路である Wnt11 の発現が亢進することが報告され、腎線維化において機能的に作用することが明らかにされた。今後、この Wnt11 と Wnt5a-Ror2 シグナルがどのように相互作用し、統合され、腎線維化の進展を担うのか明らかにする必要がある。以上の各非古典的 Wnt 経路の実態と機能解明により腎線維化の解析にもたらす波及効果が高いと考えられる。

本研究により、腎線維化病態において活性化する Wnt5a-Ror2 シグナルの実態が明らかになり MMP-2 の発現誘導を担うことが解明された。興味深いことに他の細胞株において本シグナルは他の MMP ファミリー分子(MMP-1, -13 等)の発現誘導を担うことが報告されており、腎線維化病変においてもその解析は興味深く、関連分野にもたらすインパクトは大きいと考えられる。

#### (7) 今後の展望

Ror2 と同様に、Wnt5a が結合し細胞内シグナル伝達を作動させる受容体として Ror ファミリーメンバー Ror1、Frizzled ファミリーメンバー Fz2, Fz3, Fz4, Fz5, Fz7, Fz8、受容体様チロシンキナーゼ Ryk が知られている。しかしながら、腎線維化病変部位における各受容体の発現量および機能について明確に比較した報告例はない。そのため、腎線維化の進展における各受容体の実態、機能および役割を明らかにすることが重要であると考えられる。

本課題において UUO 操作後、Ror2<sup>+/+</sup>マウス

と比較し、Ror2<sup>-/-</sup>マウスにおいて MMP-2 の発現が低下し、基底膜破壊が抑えられることが明らかにされた。腎線維化病態における Ror2 の関与について厳密に証明するために、尿細管特異的に誘導される Ror2 遺伝子の発現をノックアウトするコンディショナルマウスを作成する。このように完全に Ror2 発現を消失させることにより、腎線維化病態と関連する予想外の表現型が検出される可能性がある。そのため Wnt5a-Ror2 シグナルの機能解明は重要な課題であると考えられる。

また、本課題で実施されたメタボローム解析の結果から、特定の水溶性代謝物の発現が変動することが見出された。そのためこれら代謝物の個々の役割、またどのように統合され、腎線維化の進展に関わるのか明確にすることは今後の重要な課題といえる。

#### 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)

S. Kubo, K. Yamaoka, M. Kondo, K. Yamagata, J. Zhao, S. Iwata, Y. Tanaka. The JAK inhibitor, tofacitinib, reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Ann. Rheum. Dis.* (in press) (査読有)

K. Yamagata<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, X. Li<sup>\*</sup>, M. Nishita, M. Endo, N. Arfian, Y. Rikitake, N. Emoto, K-I. Hirata, Y. Tanaka, Minami Y<sup>\*\*</sup> (\*Double first authors, \*\*Corresponding authors). Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells* 18; 608-19; 2013. (査読有)

[学会発表](計1件)

Yamagata K, Li X, Nur A, Endo M, Rikitake Y, Emoto N, Nishita M, Minami Y; Analysis of Wnt5a-Ror signaling in renal fibrosis using a mouse model; The 3rd GCOE International Symposium on Signal Transduction Medicine in the Coming Generation; 2012年12月10日 (神戸)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況（計0件）  
取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzoo/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山形 薫 (YAMAGATA, Kaoru)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80533786

### (2)研究分担者（ 0 ）

### (3)連携研究者（ 0 ）