

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790393

研究課題名(和文)RXRの異常修飾に伴う細胞増殖亢進を介した新規嚢胞形成機序の解析と抑制効果の検証

研究課題名(英文)Study on the new cyst formation mechanism through the cell proliferation with the abnormal modification of RXR and examination of its mechanism-mediated suppressed effect on polycystic kidney disease

研究代表者

釘田 雅則(KUGITA, Masanori)

藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター・助教

研究者番号：50440681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎症(PKD)の病態進行に伴いリガンド依存的核内受容体であるレチノイドX受容体(RXR)の発現量が増加していること、嚢胞上皮細胞の核にRXRが局在していること、複数のリン酸化RXRが核に存在することを示した。また、RXRリガンドとRXRのリン酸化阻害剤がPKDの病態を抑制すること、併用により病態抑制効果が大きくなることを示した。そのため、PKDの治療薬開発において、RXRが新たな標的分子になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is indicate that the expression level of retinoid X receptor (RXR) that is a ligand dependent nuclear receptor is increased by progression of polycystic kidney disease (PKD), RXR localize in nuclei of cystic epithelial cells, and there are a few kind of phosphorylated RXR in nucleus. RXR ligand and phosphatase inhibitor of RXR suppressed progression of PKD. Combination use of its reagents efficiently ameliorates pathological condition of PKD. These results suggest that RXR might be a new target molecule to create therapeutic agent for PKD.

研究分野：分子生物学

キーワード：多発性嚢胞腎症

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎症 (PKD) は、人口 500～1,000 人に 1 人と腎疾患の中で最も発症率の高い遺伝性疾患として知られている。病態の特徴として、多数の嚢胞形成、細胞増殖の異常亢進、組織の線維化などがあげられるが、嚢胞形成機序や病態進行機序は不明瞭な点が多い。PKD の責任遺伝子産物は細胞の繊毛に局在しており、細胞のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 調節に関与していると考えられている。PKD では、この遺伝子に変異が入ることにより、細胞内 Ca^{2+} の減少、cAMP の増加、Ras/MAPK 経路の活性化 (pERK の発現量増加) が起こることが報告されているが、pERK から細胞増殖亢進に繋がる経路は不明瞭であった。そこで、当研究室では嚢胞形成機序に関する新たな知見を得るために、PKD モデル動物である Cy ラットの初期嚢胞腎を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、嚢胞腎において有意に変化している 9 つの情報伝達経路のうち 3 つにリガンド依存的核内受容体である retinoid X receptor (RXR) が関与していた。また、嚢胞腎において RXR は嚢胞上皮細胞の核に局在しており、その発現量は正常対照と比べて増加していた。同様の結果が別の PKD モデル動物である PCK ラット、jck マウスからも得られた。これらの知見は、RXR が嚢胞形成に関与していることを示唆した。

RXR はビタミン A の代謝産物 9-cis retinoic acid (9cRA) をリガンドとし、他の核内受容体とヘテロダイマーを形成することにより、転写調節因子として働く。今までの研究により、RXR は、細胞増殖および組織の線維化に関与していることが報告されている。また、近年、肝臓の癌細胞において、pERK による RXR のリン酸化が細胞増殖の亢進を引き起こすという新しい機序が提案されている。しかしながら、細胞増殖の亢進を特徴の 1 つとする嚢胞形成と RXR の関連性は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、PKD の病態進行と RXR の関連性を調べ、RXR を介した嚢胞形成機序を解明し、PKD に対する新規治療法の開発することを目的とした。

肝臓の癌細胞では、病変部の核に RXR が蓄積している。これは RXR が pERK によりリン酸化されることにより一部機能不全になるとともに、 Ca^{2+} 依存的プロテアーゼ、カルパインにより分解されなくなるためと考えられている。また、この RXR の異常修飾に伴う細胞増殖の亢進は RXR アゴニストを添加することにより改善することが報告されている。

PKD における、「RXR の発現量増加および嚢胞上皮細胞の核への局在」、「pERK の発現量増加」、「細胞内 Ca^{2+} の減少 (カルパイン活性の低下)」という特徴は、肝臓の癌細胞と

類似しており、肝臓の癌細胞における細胞増殖亢進機序をベースとして嚢胞形成機序の解明および新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

4、8、16 週齢の Cy ラットの腎臓からタンパク質を回収後ウエスタンブロット解析により RXR を検出した。16 週齢の Cy ラットの腎臓から核分画および細胞質分画のタンパク質を回収後、通常の SDS-PAGE およびリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離する phos-tag SDS-PAGE を用いてウエスタンブロット解析を行い、RXR およびリン酸化 RXR を検出した。16 週齢の Cy ラットの腎臓のタンパク質からクロスリンク免疫沈降法を用いて RXR を回収後、リン酸化セリン、リン酸化スレオニン、リン酸化チロシン抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。また、4、8、16 週齢の Cy ラットの腎臓を HE 染色および RXR 抗体による免疫染色、16 週齢の Cy ラットの腎臓を RXR および細胞増殖の指標である PCNA 抗体による蛍光二重染色を行った。

Cy ラットとは責任遺伝子の異なる PKD モデル動物 jck マウス (12 週齢)、市販されているヒト PKD 患者の腎臓の嚢胞上皮由来の不死化細胞 WT9-12 についても同様の解析を行った。

飢餓状態にした WT9-12 細胞に RXR リガンドとして $1\mu\text{M}$ 9cRA、MEK 阻害剤として $10\mu\text{M}$ U0126 を単独および併用添加して、試薬添加 48 時間後の細胞増殖活性および試薬添加 24 時間後の RXR と pERK の発現量を調べた。

雌の jck マウス 4 週齢から 8 週齢まで 9cRA と Gi タンパク質活性剤を投与し、病態抑制効果を検証した。

4. 研究成果

Cy ラットでは、4 週齢から腎臓に嚢胞形成が始まり、週齢を重ねるごとに嚢胞が大きくなる。正常対照群と比較した際、Cy ラットの腎臓における RXR の発現量は、4 週齢では変化なし、8 週齢で増加傾向、16 週齢で有意に増加と病態悪化に伴い、発現量も増加した。8 週齢の Cy ラットにおいて RXR の発現量増加に有意差がつかなかった原因は、嚢胞領域より正常な腎実質の割合が多いためだと考えられる。実際、免疫染色では、嚢胞上皮細胞に多数の RXR を検出した。16 週齢 Cy ラットの腎臓においても RXR は嚢胞上皮細胞に局在しており、PCNA と共局在していた。これらの知見は、RXR を介して細胞増殖が亢進されることにより、PKD の病態が進行している可能性を示す。

16 週齢 Cy ラットの腎臓における RXR は、核に局在しており、複数の箇所がリン酸化されていることが示唆された。また、RXR のリン酸化アミノ酸はセリン、スレオニン、チロシンであった。12 週齢 jck マウスの腎臓においても RXR は Cy ラットと同様の結果を示し

た。ただし、リン酸化アミノ酸の検出感度には違いがみられた。WT9-12 細胞では、RXR の核への局在、複数箇所のリン酸化までは同じであったが、リン酸化されているアミノ酸は、セリンとスレオニンのみであった。

肝臓の癌細胞では、RXR のセリン、スレオニンがリン酸化されており、そのリン酸化にはセリン・スレオニンキナーゼである pERK が関与していると考えられている。Cy ラット、jck マウス、WT9-12 細胞においても pERK の発現量は増加しており、PKD においても pERK が RXR のセリン、スレオニンのリン酸化に関与していると考えられる。Cy ラット、jck マウスでは、RXR のチロシンがリン酸化されており、チロシンキナーゼを有する情報伝達経路が PKD に関与していることが示唆された。WT9-12 細胞と Cy ラット、jck マウスの違いは、生物種による違いなのか、PKD 発症の責任遺伝子の違いなのかは、現時点ではわからない。ただし、核に複数のリン酸化 RXR が蓄積することが、PKD における嚢胞形成の共通要因になっていると考えられる。

上記の結果より、PKD の病態を改善するためには、RXR のリン酸化を阻害することが重要であると考えられる。また、肝臓の癌細胞では、RXR リガンドが細胞増殖を抑制することが報告されている。そこで、WT9-12 細胞を用いて、リン酸化阻害剤 (MEK 阻害剤) と RXR リガンドによる pERK、RXR の発現量および細胞増殖の抑制効果を検証した。

RXR と pERK の発現量は、MEK 阻害剤である U0126 単独添加において 10% と 11%、RXR のリガンドである 9cRA 単独添加において 34% と 30%、U0126 と 9cRA の併用添加において 44% と 18%、それぞれ減少した。MEK 阻害剤である U0126 より 9cRA の方が pERK の発現量を抑制した。これは細胞からタンパク質を回収する試薬添加 24 時間後では U0126 の効果が切れており、pERK の発現機序が回復したためだと考えられる。実際、試薬添加 30 分後では pERK の発現量は 90% 以上減少していた。9cRA は RXR のリガンドであるが、肝臓の癌細胞では Ras の発現を抑制することにより pERK の発現量を減少させることが報告されている。PKD においても同様の効果が現れたと考えられる。U0126 単独添加では RXR の発現量はほとんど減少しておらず、PKD における RXR の減少には RXR リガンドである 9cRA が重要であると考えられる。細胞増殖抑制効果は、U0126 単独添加で 14%、9cRA 単独添加で 9%、U0126 と 9cRA の併用添加で 24% を示した。特に U0126 と 9cRA の併用添加は、それぞれの単独添加より有意に細胞増殖を抑制した。これらの結果は RXR リガンドである 9cRA が PKD の治療薬になり得ること、MEK 阻害剤との併用により病態の相乗抑制効果が期待できることを示唆している。

上記の結果を基に、jck マウスを用いて 9cRA と Gi タンパク質活性剤による PKD 治療効果検証の予備的研究を行った。細胞に用い

た MEK 阻害剤は、生体では副作用が強く、PKD の治療薬として現実的ではない。そこで、アデニルシクラーゼを介し cAMP を減少させ、Ras/MAPK 経路を抑制する (pERK の発現量を減少する) Gi タンパク質活性剤を MEK 阻害剤の代わりに使用した。正常対照群と比べて、Gi タンパク質活性剤単独投与群で約 21%、Gi タンパク質活性剤と 9cRA との併用投与群で約 45% の腎体重比減少が見られた。RXR の発現量は、正常対照群と比べて、いずれもわずかな減少傾向しか見られなかった。Gi タンパク質活性剤が PKD の病態を抑制することは報告されているが、その効果が 9cRA と併用することにより大きくなることを示した。Gi タンパク質活性剤はセリン・スレオニンキナーゼである pERK の発現量を抑えるが、チロシンキナーゼについては不明である。そのため、チロシンキナーゼ阻害剤を用いて、RXR のリン酸化チロシンの影響および PKD の病態抑制効果の検証も必要だと考えられる。

本研究により、RXR のリン酸化が PKD の嚢胞形成に関与していることが示唆された。また、RXR リガンドにより RXR 機能の活性化、MEK 阻害剤などによる RXR のリン酸化阻害が PKD の治療に繋がること、両者には併用相乗抑制効果があることを示した。そのため、PKD の治療薬開発において、RXR が新たなターゲットになることが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

1. Yoshihara D., Kugita M., Sasaki M. and Nagao S. Expression and distribution of retinoid X receptor in rodent models of polycystic kidney disease. The 11th Asian Society for Pediatric Research 2015. April 15-18, 2015, Osaka, Japan.
2. Kugita M., Sasaki M., Yoshihara D. and Nagao S. Expression and distribution of retinoid X receptor in the kidney from four kinds of rodent models for polycystic kidney disease. 第 37 回日本分子生物学会年会 November 25-27, 2014, 横浜、パシフィコ横浜
3. 佐々木麻衣、釘田雅則、倉内靖代、和田裕司、吉原大輔、長尾静子 多発性嚢胞腎症における Retinoid X Receptor を介した病態進行機序解析と治療への応用 第 46 回藤田学園医学会 2014 年 10 月 3 日~4 日、豊明、藤田保健衛生大学
4. 釘田雅則、佐々木麻衣、吉原大輔、長尾静子 多発性嚢胞腎症モデル動物 Cy ラットの腎臓における RXR の解析 日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 第 61 回日本実験動物学会総会第 48 回日本実験動

物技術者協会総会 2014年5月15日～
17日、札幌、札幌コンベンションセンタ
ー

5. 佐々木麻衣、釘田雅則、吉原大輔、長尾
静子 多発性嚢胞腎症におけるRetinoid
X Receptorを介した新機嚢胞形成機序の
解明 第45回藤田学園医学会 2013年
10月3日～4日、豊明、藤田保健衛生大
学
6. 佐々木麻衣、釘田雅則、吉原大輔、長尾
静子 多発性嚢胞腎症における核内受容
体Retinoid X receptorの発現増加と細
胞内局在の変化 第8回日本臨床検査学
教育学会学術大会 2013年8月26日～
28日、大阪、大阪大学
7. 釘田雅則、吉原大輔、山口太美雄、長尾
静子 多発性嚢胞腎症モデル動物の腎臓
におけるretinoid X receptor (RXR)の
発現と局在 日本実験動物科学・技術
九州2012 2012年5月24日～26日、
別府、別府国際コンベンションセンター

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ：

<http://www.fujita-hu.ac.jp/CAMHD/LAS/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

釘田 雅則 (KUGITA, Masanori)

研究者番号：50440681

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし