

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893045

研究課題名(和文)低酸素転写調節因子HIFの新規ターゲット遺伝子SPAG4の腎臓での機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of SPAG4, a novel target of hypoxia-inducible factor (HIF) in the kidney

研究代表者

正路 久美 (Shoji, Kumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00439423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素誘導因子の新規ターゲット遺伝子であるsperm-associated antigen 4 (SPAG4)の腎臓での発現および機能について解析を行った。まずin vivoおよびin vitro共に腎尿細管細胞において低酸素刺激でSPAG4の発現が亢進することを明らかにした。次にCre/loxPシステムを用いて初めてSPAG4遺伝子コンベンショナルノックアウトマウスを作成した。ノックアウトマウスを用いて急性虚血再灌流モデルを作成したが、コントロール群と比較して腎機能、腎組織像などに有意な差は認めず、SPAG4の腎臓での機能については今後の課題となった。

研究成果の概要(英文)：I assessed the expression pattern and the function of sperm-associated antigen 4 (SPAG4) which is a novel target of hypoxia-inducible factor, in the kidney. First, I revealed that hypoxia upregulates the expression of SPAG4 in the renal tubular cells both in vivo and in vitro. Next I generated SPAG4 conventional knockout mice using Cre/Lox P system for the first time. After ischemia-reperfusion injury, there were no significant differences in renal function and in renal histology between SPAG4 knockout mice and littermate control mice. The function of SPAG4 in the kidney remains to be solved.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：低酸素 低酸素誘導因子 尿細管

1. 研究開始当初の背景

(1) 国民病ともいえる慢性腎臓病

慢性腎臓病は進行すれば透析や移植を必要とする末期腎不全となるが、我が国で慢性腎臓病の患者数は1330万人と推計されている。2011年には約3万8千人もの患者が透析導入され、現在維持透析患者数は約30万人となっている。また、慢性腎臓病は心血管疾患の危険因子であることも明らかになっている。即ち早期の腎障害は慢性腎不全に至る前段階であると同時に心臓・大血管病の危険因子であり、国民の健康上、また医療経済上対策すべき大きな問題である。

(2) 低酸素は末期腎不全への進行機転に関与これまで多くの腎疾患モデルにおいて、末期腎不全への最終的な共通経路である尿細管間質障害の進行機転に局所の低酸素が強く関与していること、また、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) が急性・慢性腎障害において臓器保護的に作用していることが報告されてきた。実際にHIFの分解を阻害することでHIFを活性化させる治療法が検討され、一部のモデルではHIF活性化の有効性が報告されている (Tanaka T et al. *Kidney Int* 2005、Tanaka T et al. *Lab Invest* 2005、Ohtomo S et al. *Nephrol Dial Transplant* 2008)。しかし、別のモデルではHIFの活性化が有害であったことが報告されており (Higgins DF et al. *J Clin Invest* 2007)、病態によりHIFの影響が異なる可能性が示唆されている。このことは、HIFの下流に存在する多数の遺伝子が、状況により異なった発現パターンを示すためであると考えられ、腎保護的に働くHIFのターゲット遺伝子をより選択的に活性化する治療法の開発が望まれている。

(3) 新規HIFターゲット遺伝子 SPAG4

研究代表者は次世代高速シーケンサーを用いた chromatin immunoprecipitation with

deep sequencing とマイクロアレイ解析を組み合わせ、新規 HIF ターゲット遺伝子 sperm-associated antigen 4 (SPAG4) を同定した (Shoji K et al. *AJP* 2013)。SPAG4 は1999年に精巣に発現する蛋白としてクローニングされたが (Shao X et al. *Dev Biol* 1999)、その機能は不明であった。研究代表者は、まず腫瘍細胞を使って SPAG4 の機能を解析し、SPAG4 が細胞質分裂に関与し、さらに低酸素下で増加する多倍体細胞形成に対して抑制的に働くことで低酸素環境下にある腫瘍の生存・増殖を助けている可能性を明らかにした。実際にヒト腎細胞癌を用いた解析で、SPAG4 発現が独立した予後不良因子であることを初めて明らかにした。しかし、SPAG4 について、正常腎組織での発現の有無、発現部位、虚血での変化、機能などはまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

研究代表者は新規 HIF ターゲット遺伝子 SPAG4 は腫瘍だけでなく虚血腎でも発現が上昇し、低酸素下での細胞増殖に関与することで、再生を促し、障害からの回復に寄与しているのではないかと仮説をたてた。本研究では急性・慢性腎障害での SPAG4 の発現・働きを明らかにすることを目的とする。

1. 研究の方法

(1) 正常腎組織および虚血腎での SPAG4 発現の評価

C57BL/6 マウスや Wistar ラットの正常腎組織を用いてリアルタイム定量 PCR・ウェスタンブロット法・免疫組織染色などを施行し、正常腎臓での SPAG4 発現量、発現部位を検討した。マウスやラットを用いて慢性腎障害モデル (腎動脈狭窄モデル) や急性腎障害モデル (虚血再還流モデル、低酸素下飼育モデル) などを作成し、リアルタイム定量 PCR・ウェスタンブロット法・免疫組織染色・*in situ* hybridization など急性・慢性腎障害での

SPAG4 発現量、発現部位の変化を検討した。

(2) 培養腎尿細管細胞での SPAG4 の *in vitro* での機能解析

腎尿細管間質の慢性低酸素状態が間質の線維化・尿細管周囲毛細血管の脱落を引き起こし、悪循環を形成して最終的な病態として末期腎不全へ至ること、また障害腎モデルでの SPAG4 の発現部位より、培養細胞としては培養腎尿細管細胞 human kidney-2 (HK-2) 細胞を用いた。まず低酸素刺激に対する SPAG4 の発現変化をリアルタイム定量 PCR・ウェスタンブロット法などで確認した。次に SPAG4 発現誘導を抑制した培養尿細管細胞の低酸素刺激に対する応答を観察した。SPAG4 発現誘導の抑制には SPAG4 に特異的な siRNA を用いた。細胞の形態変化観察、細胞数・増殖の評価(細胞数カウント、MTS アッセイなど細胞増殖試験)、細胞死の評価を行った。

(3) SPAG4 ノックアウトマウスの開発による SPAG4 の *in vivo* での機能解析

Cre/loxP システムを利用し、SPAG4 遺伝子コンベンショナルノックアウトマウスを作成した。Mouse SPAG4(Gene ID: 245865)の第1~第5 エキソンを選択的に除去した flox マウスを作成し、Cre マウスとしては宮崎純一(大阪大学医学系研究科 教授)より譲渡された CAG-Cre マウスを使用した(Sakai K, Miyazaki Ji. Biochem Biophys Res Commun 1997)。まず作成した SPAG4 ノックアウトマウスの形態的、機能的評価を行い、次に急性虚血再還流モデルなど虚血腎モデルを作成し、SPAG4 が欠失した状態での虚血性腎障害からの回復の経過を同腹のコントロール群と比較し、腎臓での SPAG4 の機能を解析した。具体的にはマッソントリクローム染色や PAS 染色など組織染色を行って細胞質分裂異常の結果増加する多核細胞と組織の障害を評価し、同時に Ki-67 や PCNA の免疫組織染色

で細胞増殖を評価した。更に血清尿素窒素や血清クレアチニンで腎機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 正常腎組織および虚血腎での SPAG4 発現マウスやラットを用いた解析で、SPAG4 は既知の発現部位である精巣と比較して正常腎組織ではほとんど発現していなかった。しかし、マウスを 8%低酸素下で 6 時間飼育すると HIF 依存性に腎臓での発現が亢進した。また急性腎障害モデルである虚血再灌流モデルラット、慢性腎障害モデルである腎動脈狭窄ラットを作成し、免疫組織染色や *in situ* hybridization などの手法で解析したところ、障害モデルの近位尿細管において SPAG4 の発現亢進を認めた。

(2) 培養腎尿細管細胞での SPAG4 の *in vitro* での機能解析

HK-2 細胞において、1%低酸素刺激に対して SPAG4 は時間依存性に発現が亢進した。一方で、低酸素下で SPAG4 に特異的な siRNA を用いて SPAG4 の発現誘導を抑制したが、形態状の変化、多倍体細胞の増加、細胞死の増加、細胞増殖の変化などを認めなかった。

(3) SPAG4 ノックアウトマウスを用いた解析
研究代表者らは Cre/loxP システムを用いて初めて SPAG4 遺伝子コンベンショナルノックアウトマウスを作成した。得られたホモノックアウトマウスは胎生致死ではなく、現在のところ成長も C57B6/J と変わりはない。肺、肝臓、心臓などの主要臓器、および腎臓は同腹のコントロール群と比較して形態異常を認めなかった。ただし同腹のコントロール群の毛色が黒色であるのに対し、ホモおよびヘテロノックアウトマウスはアグーチであり、これは SPAG4 遺伝子と同一染色体上に non-agouti 遺伝子が隣接しているため、連鎖してノックアウトされたと考えられた。

SPAG4 の局在臓器である精巣において免疫組織染色を行ったところ、同腹のコントロールおよびヘテロノックアウトマウスではSPAG4 が陽性であったのに対し、ホモノックアウトマウスでは陰性であり、またホモノックアウトマウスのオスは精子形成に異常があり、精巣内に成熟した精子を認めなかった。実際にホモノックアウトマウスのオスは、性行動は正常であったが不妊であった。テストステロンの濃度で虚血性腎障害の感受性が変わるという報告が複数なされており(J Biol Chem. 2004, Am J Physiol Regul Integr Com Physiol. 2013)、本マウスは精子形成に異常があるため、ELISA 法でテストステロン濃度を測定したが、同腹のコントロール群、ヘテロノックアウトマウス群、ホモノックアウトマウス群で有意差はなかった。更に平常時での腎機能を測定したところ、3 群間で有意差はなかった。急性虚血再灌流モデルを作成したところ、コントロール群と比較してノックアウトマウス群において再灌流後の腎組織で Ki-67 陽性細胞数が少ない傾向があったが、腎機能および線維化などは3 群間で有意差はなかった。

以上より、*in vivo* および *in vitro* において腎尿細管細胞では低酸素刺激で SPAG4 の発現が亢進することが明らかとなった。しかし SPAG4 遺伝子コンベンショナルノックアウトマウスを作成して腎臓での SPAG4 の機能を検討したが、急性虚血再灌流モデルにおいて腎機能、腎組織像などに有意な差は認めず、今後の課題となった。

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 4 件)

1. Nordquist L, Friederich-Persson M, Fasching A, Liss P, Shoji K, Nangaku M, Hansell P, Palm F. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. (査読あり) 26: 328-338, 2015

doi: 10.1681/ASN.2013090990.

2. Wada T, Nangaku M, Maruyama S, Imai E, Shoji K, et al. A multicenter cross-sectional study of circulating soluble urokinase receptor in Japanese patients with glomerular disease. Kidney Int. (査読あり)85:641-8, 2014 doi: 10.1038/ki.2013.544.
3. Kawakami T, Mimura I, Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and fibrosis in chronic kidney disease: crossing at pericytes. Kidney Int Suppl (2011).(査読あり) Nov;4(1):107-112, 2014 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4220514/>
4. Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. Curr Opin Nephrol Hypertens. (査読あり) 23: 161-168, 2014 doi:10.1097/01.mnh.0000441049.98664.6c

[学会発表](計 3 件)

1. Tanaka T, Shoji K, Yamaguchi J, Nangaku M. An Antifibrotic Role of Hypoxia-Inducible Factor 3 in Renal Tubular Cells. The Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Atlanta, U.S.A., 2013.11.8
2. Wada T, Nangaku M, Maruyama S, Imai E, Shoji K, Kato S, Endo T, Muso E, Kamata K, Yokoyama H, Fujimoto K, Obata Y, Nishino T, Kato H, Uchida S, Sasatomi Y, Saito T, Matsuo S. Circulating suPAR in Japanese Patients with Glomerular Diseases: A Multicenter Cross-Sectional Study. The Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Atlanta, U.S.A., 2013. 11.7
3. 田中哲洋、正路久美、山口純奈、南学正臣. 低酸素転写因子による腎線維化抑制機構の解析. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京国際フォーラム(東京). 2013.5.12

[その他]

ホームページ

<http://www.todai-ckd.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

正路 久美 (Kumi Shoji)

東京大学医学部附属病院 特任助教

研究者番号: 00439423