

令和元年6月20日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09302

研究課題名(和文)小胞体異常によるPC1障害性近位尿細管嚢胞腎発症機構の解明と抑制薬の開発

研究課題名(英文)The mechanism for proximal tubular cyst formation by PC1 trafficking problem associated with ER dysfunction providing drug targets.

研究代表者

石橋 賢一 (Ishibashi, Kenichi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80223022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管特異的嚢胞腎であるAQP11欠損マウスでもcAMP活性が野生型より増加し、嚢胞腎でのアデノシン受容体(A1, A2A, A2B, A3)ではA3のみが上昇していた。また質量分析法によって、AQP11ノックアウトマウス嚢胞腎で発現量が野生型マウス腎と変化している蛋白を網羅的に検索し、嚢胞形成直前の生後2週齢マウス腎臓から2044個の蛋白を同定した。1.5倍以上増加した162個では結合組織関連蛋白やアンジオテンシノーゲンのほかに、Reg1(Lithostathine)という膵臓増殖因子が10倍に増加していた。0.8倍以下に低下した蛋白ではミトコンドリア関連の蛋白があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性嚢胞腎は透析導入原因疾患の2-3%を占める優性遺伝の腎疾患であり、その発症と進行の機序解明は、より有効な治療のターゲット分子を明らかにして、新たな薬剤の開発の端緒となりうる。唯一の治療薬トルバプタンは遠位尿細管にしか作用せず、近位尿細管に有効な薬剤の開発が求められている。今回研究対象にしたAQP11欠損マウスは近位尿細管にしか嚢胞ができない多発性嚢胞腎モデルであり、この目的に合致した数少ないモデルの一つである。今回の研究で、これまで全く検討されていなかったアデノシン3型受容体とReg1の関与が示唆された意義は大きい。今後ヒトの多発性嚢胞腎でも検討して、治療薬開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The activity of cAMP was increased in AQP11 null kidney developing proximal-tubular-selective cysts, which is similar to the results of collecting-duct-type polycystic kidneys. Among four types of adenosine receptors (A1, A2A, A2B and A3), only A3 was enhanced. Mass spectroscopic analysis of the kidney proteins from two-week old AQP11 null mice initiating the cyst formation had 1.5 times more enhanced expression of 162 proteins than wild mice, including connective tissue-related proteins, angiotensinogen and, above all, Reg1 (Lithostathine), a growth factor for the pancreas with ten times increase. The decreased proteins by less than 0.8 times included mitochondria-related proteins.

研究分野：水電解代謝疾患、腎臓内科

キーワード：多発性嚢胞腎 水チャネル アデノシン 増殖因子 近位尿細管 治療薬ターゲット REG1 AQP11

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎は透析導入原因疾患の 2~3% を占める稀ではない優性遺伝の腎疾患であり、その発症と進行の機序解明は、より有効な治療薬のターゲット分子を明らかにして、新たな薬剤の開発の端緒となることが期待される。現在ある唯一の薬剤トルバプタン(2型バソプレシン受容体拮抗薬)は遠位尿細管にしか作用せず、それほど顕著に嚢胞形成はもちろん、進行すらもほとんど抑制できず、さらに近位尿細管には無効である。しかも多尿をいう副作用のために夜間頻尿で睡眠が障害されたり、大量長期内服が必要なために、肝機能障害のリスクもある。したがって、より有効で副作用の少ない薬剤が求められている。特に近位尿細管にも有効な薬剤の開発が求められている。しかしながら近位尿細管に作用するソマトスタチンアナログは動物実験では有効性が示されていたが、残念ながら臨床試験では有用性は示せなかった(副作用もトルバプタンより多い)。今回研究対象にした AQP11 欠損マウスは近位尿細管にしか嚢胞ができない多発性嚢胞腎モデルであり、この目的に合致した数少ないモデルの一つである。

2. 研究の目的

水チャネル AQP11 欠損による嚢胞腎の原因は、小胞体異常によるヒト多発性嚢胞腎原因遺伝子 polycystin1 (PC1) (ヒト常染色体優性多発性嚢胞腎の原因遺伝子の1つ)の細胞膜への輸送障害によるので、近位尿細管特異的嚢胞腎のよいモデルになる。一方、ヒト多発性嚢胞腎での近位尿細管嚢胞が PC1 異常で形成される機構はよくわかっていない。また、小胞体異常が細胞内空胞形成によっておきると考えられるが、そこに小胞体に発現している AQP11 がどのように関与しているかも不明である。

これらを明らかにする目的で、以下の3つの目標をかかげた。近位尿細管特異的嚢胞形成機構とこれまで解析が進んでいる集合管嚢胞形成機構との違いの解明、近位尿細管特異的嚢胞の進行を抑制する物質の検索、AQP11の膜透過性を制御する因子の検索と、亢進させる操作による腎障害の軽減が可能かどうかの検討。

3. 研究の方法

集合管モデルの嚢胞腎で明らかになっている cAMP のシグナルが、近位尿細管モデルでも関与しているかを、嚢胞腎での cAMP 活性を測定した。一方、cAMP は細胞に出るとアデノシンに変化してアデノシン受容体に作用して細胞増殖を促進すると考えられるので、嚢胞腎でのアデノシン受容体 (A1, A2A, A2B, A3) の mRNA をリアルタイム PCR で定量した。

網羅的に発現している蛋白分子を検索することによって、嚢胞腎で増加している分子が嚢胞形成や維持のドライバー分子として新規に同定できる可能性がある。嚢胞形成直前の生後2週齢マウス腎臓から蛋白を抽出して、AQP11 欠損マウスと野生型マウスで発現の変化している蛋白を飛行時間形質量分析計(time of flight mass spectrometer: TOF-MS)をもちいた質量分析法で定量した。変化のあった蛋白は PCR やウェスタンブロッティングで検証した。

新規糖尿病治療薬のナトリウム依存性グルコース輸送体 2 (SGLT2) 阻害薬の嚢胞腎治療への応用(ドラッグリポジショニング)について検討した。より強力な抑制薬であるフロリジンを AQP11 欠損マウスに投与して、尿糖や嚢胞形成の変化について検体検査や解剖学的に検討した。

AQP11 が発現している肝臓のマイクロゾーム分画を AQP11 欠損マウスと野生型マウスから抽出して、その水透過性をストップフロー法で測定して比較することを試みることによって薬剤スクリーニング系の確立をめざした。

4 . 研究成果

cAMP 定量キットによって AQP11 欠損マウス嚢胞腎でも cAMP 活性が野生型より増加していた。さらに、集合管嚢胞形成の比較から cAMP とアデノシン受容体に注目し、cAMP は細胞に出るとアデノシンに変化してアデノシンの受容体に作用して細胞増殖を促進すると考えられ、嚢胞腎ではアデノシン受容体 A3 のみが増加していることが明らかになった。

糖尿病治療薬のナトリウム依存性グルコース輸送体 2 (SGLT2)阻害薬の応用の検討では、フロリジン を AQP11 欠損マウスに皮下注射してメタボリックケージで尿を採取して薬効(尿糖)を確認した。

しかし、キー分子を推定してこのモデルに応用するよりも、網羅的に発現している蛋白分子を検索することによって、嚢胞腎で増加している分子が嚢胞形成や維持のドライバー分子として新規に同定できる可能性があると考え、マイクロアレイはすでに発表していて、これはという増加した遺伝子が同定できなかったので、質量分析法によって、AQP11 ノックアウトマウス腎臓で発現量が変化している蛋白を網羅的に検索した。

嚢胞形成直前の生後 2 週齢マウス腎臓から 2044 個の蛋白を同定でき、1.5 倍以上増加した 162 個では結合組織関連蛋白やアンジオテンシノーゲンのほかに、Reg1(Lithostathine)という膀胱増殖因子が 10 倍に増加しているのが注目された。しかし Reg1 遺伝子の増加は見られなかったので嚢胞液に Reg1 蛋白が蓄積していることが示唆された。

また上皮間葉転換に関連する蛋白(細胞接着因子)も増加が見られており、嚢胞形成との関連に興味を持たれた。一方、0.8 倍以下に低下した蛋白ではミトコンドリア関連の蛋白が注目された。アンジオテンシノーゲン分子の増加もみられていることからレニン-アンジオテンシン系の近位尿細管嚢胞形成への関与も考えられた。

嚢胞腎で増加している Reg1(Lithostathine)蛋白は膀胱細胞の再生・増殖因子であることや、Reg1 受容体蛋白が細胞膜上に発現していることが報告されているので、腎臓での役割について検討する目的で、生後 1 週、2 週、3 週での腎での Reg1 の発現部位を RT-qPCR で髄質と皮質に分けて定量検討した。マウスでは生後 10 日までネフロン形成が進むが、生後 1 週では皮質より髄質での Reg1 の発現が多く、初期には近位尿細管以外の増殖に関わっていることが示唆された。生後 2 週や 3 週、さらには成獣では皮質に多く発現しており、最終的な近位尿細管の増殖・維持に関与していると考えられた。今後ヒトの多発性嚢胞腎でも Reg1 の関与があるかどうかの検討が望まれる。

AQP11 ノックアウトマウスでは著明な胸腺の萎縮が見られており、AQP11 が胸腺上皮細胞に発現していることから近位尿細管との類似について興味もたれるので、マイクロアレイ解析を胸腺で行った。PI3K-Akt シグナル経路に関与する遺伝子群の発現が AQP11 ノックアウトマウス胸腺で増加し、PPAR シグナル経路に関与する遺伝子群の発現は低下していた。増殖系の増強は腎での Reg1 誘導とも類似しており興味深い。

マウスの赤血球を用いたストップフローで水とグリセリンの透過性を測定し、水銀でブロックされるのを確認した。AQP11 の透過性を測定するためのスクロース濃度勾配による細胞内分画胞を野生型マウスの腎臓と肝臓で行い、AQP11 をウエスタンブロットで確認できる画分を得たが、水透過性は認められなかった。残念ながら測定系の確立はできなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Yasuko Tanaka, Yoshiyuki Morishita, Kenichi Ishibashi: Aquaporin10 is a pseudogene

in cattle and their relatives. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 1:16-21, 2015

Koike S, Tanaka Y, Matsuzaki T, Morishita Y, Ishibashi K: Aquaporin-11 (AQP11) expression in the mouse brain. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, e861 (2016)

Tanaka Y, Watari M, Saito T, Morishita Y, Ishibashi K: Enhanced autophagy in polycystic kidneys of AQP11 null mice. *J. Mol. Sci.*, 17, e1993 (2016)

Nameta M, Saijo Y, Ohmoto Y, Katsuragi K, Yamamoto K, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S: Disruption of membranes of extracellular vesicles is necessary for ELISA determination of urine AQP2: proof of disruption and epitopes of AQP2 antibodies. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, e1634 (2016)

Saito T, Tanaka Y, Morishita Y, Ishibashi K: Proteomic analysis of AQP11-null kidney: Proximal tubular type polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Rep*, 13, 17-21 (2017)

Miyoshi T, Yamaguchi T, Ogita K, Tanaka Y, Ishibashi K, Ito H, Kobayashi T, Nakagawa T, Ito J, Omori K, Yamamoto N: Quantitative Analysis of Aquaporin Expression Levels during the Development and Maturation of the Inner Ear. *J Assoc Res Otolaryngol*. 18, 247-261 (2017)

Miyazawa Y, Mikami S, Yamamoto K, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S: AQP2 in human urine is predominantly localized to exosomes with preserved water channel activities. *Clin Exp Nephrol*, 22, 782-788 (2018)

Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. : The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions, *Anat Sci Int*.91, 1-13 (2016) Review

Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y. : The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family, *Adv Exp Med Biol*. 969, 35-50 (2017) Review

[学会発表](計 22 件)

Proteomic analysis of a proximal tubular specific polycystic kidney disease model of AQP11 deficient mice: Saito T, Tanaka Y, Sasaki S, Ishibashi. *Renal Week 2016, American Society of Nephrology*, 2016/11, Chicago, USA

Urine AQP2 comes from exosome pathway and represents a long-term regulation of vasopressin: Sasaki S, Saijo Y, Ohmoto Y, Katsuragi K, Ishibashi, Yamamoto K, Yamamoto T: *Renal Week 2016, American Society of Nephrology*, 2016/11, Chicago, USA

シスプラチン腎症への AQP11 発現量の影響と D-システインの効果: 草野高志、秋永一流、宮沢優子、田中靖子、石橋賢一、日本薬学会第 136 年会、2016/3、横浜

培養細胞を用いた AQP2 代謝動態の検討: 高橋由衣、嶋田貴之、酒井 柁、田中靖子、石橋賢一、日本薬学会第 136 年会、2016/3、横浜

AQP11 ノックアウトマウス由来の脳における遺伝子網羅的解析: 田中靖子、深田翔一、安倍匠、一柳美聡、佐々木成、石橋賢一、日本薬学会第 136 年会、2016/3、横浜

尿中 AQP2 排泄機序: エクソソームとトラフィック: 酒井 柁、高橋由衣、田中 靖子、行田正晃、山本恵子、石橋賢一、山本格、佐々木成、第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016/6、横浜 (優秀演題賞)

アクアポリン 11 減少はシスプラチン腎障害を悪化させる: Dシステインによる軽減: 草

野高志、宮沢優子、秋永一流、田中靖子、石橋賢一、第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016/6、横浜

Functional and Proteinous Characterization of AQP2-rich Extracellular Vesicles in Human Urine: Mikami S, Miyazawa Y, Sakai M, Saito T, Tanaka Y, Yamamoto K, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S, ERA-EDTA 54th Congress, 2017/5, Madrid, Spain (oral)

A Proteomic Analysis of the Kidney from AQP11 Deficient Mice for the Identification of Key Molecules for Proximal Tubular Cyst Formation. Saito T, Tanaka Y, Sasaki S, Ishibashi K. ERA-EDTA 54th Congress, 2017/5, Madrid, Spain

Proteomics and Water Channel Function of AQP2-Rich Extracellular Vesicles in Human Urine: Miyazawa Y, Mikami S, Sakai M, Saito T, Ishibashi K, Sasaki S. Renal Week 2017, American Society of Nephrology, 2017/11, New Orleans, USA (oral)

尿中 AQP2 の基礎的臨床的検討：三上早紀、宮澤優子、斎藤達也、田中靖子、佐藤 恵子、野田裕美、山本恵子、山本格、石橋賢一、佐々木成、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017/6、仙台（優秀演題賞）(口演)

AQP11 欠損による近位尿細管特異的早期多発性嚢胞腎（管腔拡大）マウスモデルの腎臓プロテオーム解析：斎藤達也、田中靖子、佐々木成、石橋賢一、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017/6、仙台

近位尿細管嚢胞腎マウスモデル(AQP11 欠損マウス)の網羅的タンパク質解析：斎藤 達也、田中 靖子、佐々木 成、石橋 賢一、日本薬学会第 137 年会、2017/3、仙台

Stopped-flow 法による尿エクソゾームの水透過性測定：宮澤優子、三上早紀、木村春光、櫻井宏樹、佐々木成、石橋賢一、日本薬学会第 137 年会、2017/3、仙台

Proteomic analysis of the liver from AQP11-null mice: hepatocytes with intracellular large vacuoles. Saito T, Sasaki S, Ishibashi K. ERA-EDTA 55th Congress, 2018/5, Copenhagen, Denmark

Metformin modulates the effects of vasopressin and osmolality on AQP2 trafficking. Mizumura H, Matsumoto T, Sakai M, Sasaki S, Ishibashi K. ERA-EDTA 55th Congress, 2018/5, Copenhagen, Denmark

Phosphorylation of Ser261 and dephosphorylation of Ser269 is important for urinary excretion of AQP2: Mizumura H, Sakai S, Matsumoto T, Noda Ya, Yui Na, Ishibashi K, Sasaki S. (Department of Nephrology, Tokyo Medical and Dental University) Renal Week 2018, American Society of Nephrology, 2018/10, San Diego, USA (oral)

AQP11 Plays a Role in Water Homeostasis in Concert with AQP4 in the Brain: Ishibashi K, Tanaka Y, Sasaki S. Renal Week 2017, American Society of Nephrology, 2018/10, San Diego, USA

メトホルミンの集合管細胞でのアクアポリン 2 発現と膜移行に対する浸透圧とバソプレシンの影響：水村 大樹、松本 知樹、酒井 柁、佐々木 成、田中 靖子、石橋 賢一、日本薬学会第 138 年会、2018/3、金沢

アクアポリン 11 欠損マウスに生じる空胞化肝細胞のプロテオーム解析：斎藤達也、田中靖子、石橋賢一、日本薬学会第 138 年会、2018/3、金沢

21 アクアポリン 11 欠損マウス由来の胸腺における遺伝子網羅的解析：田中 靖子、辻優美、加藤菜摘、中江美乃梨、石橋 賢一、日本薬学会第 138 年会、2018/3、金沢

22 メトホルミンの集合管細胞でのアクアポリン 2 発現と膜移行に対する浸透圧とバソプレシ

ンの影響：水村 大樹、松本 知樹、酒井 柁、佐々木 成、田中 靖子、石橋 賢一、第 61 回
日本腎臓学会学術総会、2018/6、新潟

〔図書〕(計 3 件)

Kenichi Ishibashi, Yasuko Tanaka, Yoshiyuki Morishita. Perspectives on the evolution of aquaporin superfamily. In "AQUAPORIN REGULATION" ed. by Gerald Litwack, Academic press/Elsevier, in press.

石橋賢一：Navigate 消化器疾患 (Navigate シリーズ 5)、pp. 1-439、医学書院 (2017)

石橋賢一：Navigate 呼吸器疾患 (Navigate シリーズ)、pp. 1-350、医学書院 (2015)

〔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：ようこそ明治薬科大学・病態生理学研究室へ！

<https://u-lab.my-pharm.ac.jp/~kishiba/sub5.html>

「業績」のページに論文とリンクがはられている

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。