

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590965

研究課題名（和文）左右遺伝子 *inv* のコンディショナルマウスの作製と

繊毛依存性腎疾患における意義

研究課題名（英文）Making conditional knockout mouse of the gene coding *inversin* and the significance of inversion in the cilia-dependent renal disease

研究代表者

土谷 健 (TSUCHIYA KEN)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00246472

研究成果の概要（和文）：体軸の左右決定遺伝子 *inv* の異常は内臓逆位とともに、嚢胞形成腎を合併するが、他に脾臓嚢胞、胆管形成不全などの表現型を呈することから、体軸回転に加えて、上皮細胞の機能制御にも関わる可能性がある。本研究では、インターフェロン誘導型プロモーターを用いた *inv* コンディショナルノックアウトマウスの targeting vector を作製、また、*inv* 遺伝子改変動物および細胞を用いた *inv* の生理学的、病態生理的意義の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Vertebrate organisms have a common left-right asymmetry of their visceral organs. However, all unpaired organs of the chest and abdomen, such as heart, stomach, spleen and liver, develop from the midline in the fetus and localize to their normal positions in the adult. The phenotype of the *inv* mouse is a consistent mirror-image reversal of the left-right polarity (*situs inversus*) and cystic formation of the kidneys. In this study, the targeting vector of the inversion of embryonic turning (*inv*) for conditional knockout mounting interferon-induced promoter was constructed. Genomic southern hybridization indicated that these gene spans the whole deleted region, implying that the homozygous *inv* mice have intragenic deletion of this gene. We also analyzed the physiologic and pathophysiological findings of mice and renal tubular cells kidney associated with an inversion of embryonic turning. The results suggested that there might be a possibility that a cytoskeletal abnormality was involved in the mechanism and production of both structural abnormalities, inversion and cyst formation in the kidney.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 21,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 861,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：siRNA 左右軸 ノックアウトマウス 繊毛 嚢胞腎 *inv* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

本研究は、挿入変異 (insertional mutagenesis) により発生した内臓逆位、嚢胞形成腎を有するトランスジェニックマウスから体軸の左右決定遺伝子 *inv* のクローニングを行ったことを端緒とする (Nature 395:177, 1998)。本遺伝子の異常は内臓逆位とともに、嚢胞形成腎を合併するが、他に脾臓嚢胞、胆管形成不全などの表現型を呈することから、体軸回転に加えて、上皮細胞の機能制御にも関わる可能性がある。最近、ネフロンの上皮細胞には一次線毛が存在し、この形成や機能の異常が嚢胞性腎疾患の原因の一部をなすことが注目され、線毛依存性腎疾患というカテゴリーが成立しつつあり、さらにそれは体軸や他臓器の異常をきたす可能性も指摘されている。従来、体軸の左右、前後を決定する遺伝子の同定および機能解析に関する研究により *Nodal* や *lefty* などの遺伝子群が、さらにその最下流に位置づけられる *Pitx2* が同定されている。また、*iv* (*inversus viscerum*) マウスでは、内臓逆位が出現するが、原因としてダイニンの遺伝子変異が報告され、ノード繊毛の回転異常により左右の成立が 50% の確率になる機序が報告された (Hirokawa ら, Cell 95:829-837, 1998)。こうした中であって、*inv* 遺伝子は最上流の位置に存在するコントロール遺伝子と考えられる。

また多発性嚢胞腎起因蛋白の *polycystin* が尿細管上皮の線毛に存在することが報告され、線毛の形成、機能異常が細胞内 Ca を介した cAMP による過分泌と Ras-Raf 系による細胞増殖をきたし嚢胞形成の機序として注目されている。研究代表者はヒトの *inv* 遺伝子の塩基配列を最終的に決定し報告した (土谷:Hum Genet 110:157, 2002) が、*inv* 自体もヒトの *nephronophthisis* の原因遺伝子として特定され、一連の関連遺伝子として位置付けられるようになった (Otto EA, et al. Mutation in *INVS* encoding *inversin* cause *nephronophthisis* type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. Nat Genet 34:413, 2003)。さらに、本蛋白がカテニン、カドヘリンなどの骨格蛋白と結合する可能性が指摘されている。研究者らも培養細胞で RNAi による *inv* 遺伝子を抑制したところ細胞間接着、増殖の低下と、また骨格蛋白の発現遺伝子 *profile* の変化を観察している (代田ら業績)。細胞内のシグナル伝達については、最近 Wnt シグナルへの関わりを示す報告がなされた (Simon M, et al. *Inversin*, the gene product mutated in *nephronophthisis* type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling

pathways. Nat Genet 37:537, 2005)。*Inv* も当初の左右軸の決定因子としてのみではなく、線毛上皮の機能に重要な働きをし、上皮機能に關与することが次第に明らかとなり注目を集めている。それは嚢胞腎や胆道閉鎖症などヒトの重要な疾患にも関わりを持ち、臨床的にも有用な情報をもたらすものと考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究の全体構想は、

- (1) インターフェロン誘導型プロモーターを用いた *inv* コンディショナルノックアウトマウスの作製
- (2) *inv* の機能解明および線毛依存性腎疾患における病態生理的意義の検討
- (3) 多発性嚢胞腎起因遺伝子群との相互関係を中心課題とする。特にコンディショナルノックアウトマウスの作製は今回の研究では新しい試みであり、従来までのノックアウトマウス作製の過程の素材を応用できる。

具体的に今回の課題では、以下の検討を行う。

- (1) コンディショナルノックアウトマウスの作製

以前までの課題でノックアウトマウスの作製を行った。しかしながら従来の線毛依存性腎疾患をきたす遺伝子異常でのノックアウトマウスの最大の問題点は胎生致死であり、病態生理の解析や病態モデルとして利用し難いことにある。最近では生後にノックアウトを導入する技術が確立され、すでに多発性嚢胞腎モデルにおいても報告がみられている。今までに作製したベクターをもとにコンディショナルターゲティングベクターを構築し同モデルを作製する。

- (2) *inv* 遺伝子改変および機能的遺伝子発現修飾を行った *in vivo*, *in vitro* での *inv* の生理学的、病態生理的意義の検討

従来までの課題で作製した *inv* ノックアウトマウスの表現型、由来細胞、産物蛋白の機能解析を行う。マーカー遺伝子の挿入によるキメラマウスでの形態形成過程での発現の観察。また器官培養を行い、どのレベルで嚢胞形成が始まるかを検討する。

inv mRNA 発現レベルの調節による解析を行う。mRNA レベルの発現を full length を組み込んだ adenovirus vector を用いて強発現させ培養細胞に導入、逆にまた RNA interference technique で抑制する。これらは培養細胞およびマウス個体レベルでの発現も調節可能で形態変化、microarray 法による関連遺伝子を観察、解析する。

多発性嚢胞腎との関連

polycystinなどの嚢胞腎起因遺伝子との相互関係を明らかにするため、ノックアウトマウスでの線毛部などの発現の変化、培養細胞などのシグナルの変化などを観察する。

3. 研究の方法

(1) コンディショナルノックアウトマウスの作製

Cre-loxPシステムによるコンディショナルジーンターゲティングの方法を用いる。従来の研究期間に作製していたコンストラクトをもとに最も表現型発現が確実と考えられる exon2 を欠失させる inv 遺伝子のターゲティングベクターを構築する。コンストラクトの作製は型通りに、ターゲットの exon2 をはさむ位置に loxP site を挿入し、PKG-neo cassette を transcription の方向マーカーとする。相同組み換え体同定のためのサザン解析用のプローブおよび PCR プライマーをこれまでの助成期間で作製してある (floxed mouse)。このマウスとインターフェロンもしくはインターフェロンを誘導する合成核酸 pIpC を投与することにより Cre リコンビナーゼを発現する MxCre マウスとを交配して作製する。

(2) inv 遺伝子改変動物および細胞を用いた inv の生理学的、病態生理的意義の検討

ノックアウトマウスの解析: 従来の科研費期間中より作製したノックアウトマウスの表現型を解析する。腎の組織学的検討および形成メカニズムへの inv の関わりを検討する。胎児の発現型の検討では、マクロ的観察を実体顕微鏡下で行い、腎での嚢胞形成を確認する。また形態形成上の異常を経時的に観察する。ノックアウトホモ接合体からの胎児から腎を摘出し、organ culture を行う。腎の形態形成の過程で尿細管形成もしくは機能異常 (線毛の形成異常などを含む) が障害されている可能性を推測している。実際には胎生 15.5 日後腎を採取し、transmembrane filter 上において培養し観察する。膵、胆道系の解析を中心に担当する。胎児の発現型の検討では、まず、マクロ的観察を実体顕微鏡下で行い、胆道閉鎖の発現を確認する。確認されたものでは、組織学的検討を光顕、電顕レベルでさらに検討する。

機能的遺伝子改変: RNAi の発現 vector および adenovirus vector を Hydrodynamic 法 (参考: Harmor P, et al. Proc Natl Acad Sci USA 101:14883, 2004) によりマウス個体、また従来の遺伝子導入により培養細胞で発現させ、mRNA 発現レベルを調節する。

マウス個体での RNAi、および adenovirus による過剰発現: inv に特異的な RNAi を発現 vector に組み込み、マウスの尾静脈より 1ml volume (50-200 μ g plasmid) を急速静脈注入を行う。Adenovirus による過剰発現も同様の方法にて急速投与することにより、従来の報告よりはるかに効率のよい腎臓発現が研究者らによりはじめて確認された。両者とも 24 時間後には RNAi で 70% の抑制、adenovirus で数倍以上の過剰発現が確認されており、こうした手法により、マウス *in vivo* での RNA 発現の調節が可能になった。

培養細胞における RNAi および adenovirus による過剰発現: 同様の plasmid を従来通りの lipofectamin を用いた transfection を cell line (M1, MDCK, mIMCD3 cell) に行う。Microarray 法による関連遺伝子 profile 検索では先に述べたノックアウトマウスからの組織、もしくは RNAi などにより遺伝子発現を修飾した培養細胞などから抽出した mRNA を用いる。実際の方法は Affymetrix 社の array chip を用いて、従来報告した方法に則り施行する。現在、線毛関連遺伝子の細胞内シグナルとしては、Wnt- β -catenin 系が注目されているが、さらに Ca 関連の遺伝子群にも着目する。また、先述したように inv の一つの特徴として骨格構造をもつことから、細胞外マトリックス、細胞内蛋白など関与も推定される。CD2AP も、polycystin 関連蛋白として、east-two hybrid 法により抽出された蛋白で、polycystin と同様に、inversin (inv 由来蛋白) でも相互的な発現の変化が観察される。

4. 研究成果

(1) コンディショナルノックアウトマウスの作製

Cre-loxPシステムによるコンディショナルジーンターゲティングの方法を用いた。従来の研究期間に作製していたコンストラクトをもとに最も表現型発現が確実と考えられる exon2 を欠失させた inv 遺伝子のターゲティングベクターを構築した。継続してコンストラクトの作製を行い、完成された後、ES細胞に導入、Southern blot によるコンストラクトの構築の確認を行い終了した。

(2) inv 機能的遺伝子改変動物および細胞を用いた inv の生理学的、病態生理的意義の検討

機能的遺伝子改変: RNAi の発現 vector および adenovirus vector を Hydrodynamic 法によりマウス個体、また従来の遺伝子導入により培養細胞で発現させ、mRNA 発現レベルを調節した。マウス個体での RNAi、および

adenovirus による過剰発現: inv に特異的な RNAi を発現 vector に組み込み、また、adenovirus による過剰発現も同様の方法にて急速投与することにより、マウスでの検討を行った。肝臓、腎臓での遺伝子発現 profile を microarray で検討し、カドヘリンなどの EMT 関連遺伝子の発現の差異が認められた。

培養細胞における RNAi および adenovirus による過剰発現: 同様の plasmid を従来通りの lipofectamin を用いた transfection を cell line (M1, MDCK, mIMCD3 cell) で行った。同様の遺伝子発現の変化と、細胞形態の変化、細胞の遊離が観察された。

(3) 多発性嚢胞腎との関連

両者ともに嚢胞を起因する蛋白ながら、相互の作用についての報告は少ない。2 つの蛋白とも尿管上皮の線毛に存在することはすでに明らかにされている。糸球体の podocyte のようにネフリンを中心とした一連の関連蛋白群のような関係があるかどうか注目される。まずは、inv ノックアウトマウス腎での polycystin の発現レベルを検討した。mRNA 自体の量および *in situ* 法による局在の変化を観察したが、発現量、局在には変化は認められなかった。pkd ノックアウトマウスと inv ノックアウトマウスの比較では、pkd では細胞増殖関連の遺伝子 profile に変化が見られたのに対して、inv では、細胞間隙など、細胞外マトリックス関連遺伝子の発現に変化が主として観察された。

今後は inv のコンディショナルノックアウトマウスの個体解析を行い、嚢胞形成における inv の役割を検討していく予定である。

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8件)

Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Yoshida S, Shiohira S, Nitta K, Tsuchiya K. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant* 25: 60-68, 2010. 査読有
Tsuchiya M, Maeda A, Suzuki A, Yasuda K, Yoshida T, Nitta K, Tsuchiya K*. Suppression of mafA mRNA with siRNA prevents adipose cell differentiation in 3T3-L1 cells. *Int J Mol Med* 23: 725-732, 2009. 査読有
Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Hayashi A, Tanaka J, Shigemoto M, Nitta K, Tsuchiya K*. *In vivo* suppression of mafA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression

profile in mouse pancreas by the microarray method. *Biochem Biophys Res Commun* 356:129-135, 2007. 査読有

Yoshida T, Sugiura H, Mitobe M, Nishimura S, Shirota S, Tsuchiya K, Nobori K, Nitta K, Akiba T. Activating transcription factor 3 ameliorates oxidative stress-induced cell death in human kidney cells and in experimental renal ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 19:217-214, 2008. 査読有

Higashihara E, Nutahara K, Horie S, Muto S, Hosoya T, Hanaoka K, Tsuchiya K, (12人中7番目). The effect of eicosapentaenoic acid on renal function and volume in patients with ADPKD. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2847-2852, 2008. 査読有

Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Kobayashi N, Tsuchiya K, (8人中5番目). Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS. *Am J Transplant* 8: 1550-1556, 2008. 査読有

Higashihara E, Nutahara K, Horie S, Muto S, Hosoya T, Hanaoka K, Tsuchiya K, (12人中7番目). The effect of eicosapentaenoic acid on renal function and volume in patients with ADPKD. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2847-2852, 2008. 査読有

Shiohira S, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K. Protective effect of carbon monoxide donor compounds in endotoxin-induced acute renal failure. *Am J Nephrol* 27:441-446, 2007. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 健 (TSUCHIYA KEN)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00246472

(2) 連携研究者

芳田 工 (YOSHIDA TAKUMI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80297449

土谷 まり子 (TSUCHIYA MARIKO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00266826