

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591175

研究課題名(和文) Sec63 コンディショナルノックアウトマウスによる嚢胞形成機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of cyst development in Sec63 conditional knockout mice.

研究代表者

西尾 妙織 (Nishio, Saori)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90463736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円、(間接経費) 1,140,000 円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は最も頻度が高い遺伝性腎疾患である。多発性肝嚢胞はADPKDで多くみられるが、肝嚢胞のみの病態を常染色体優性多発性肝嚢胞として区別している。これまで嚢胞形成の機序について明らかになっていない。そこで本研究では多発性肝嚢胞のモデルマウスであるSec63コンディショナルノックアウトマウスを解析し嚢胞形成の機序を明らかにする事とした。

嚢胞増悪にはpkd1が濃度依存性に関与する事を明らかにした。また、Pkd1欠損モデルでは増殖が嚢胞増悪の主因子であるが、Sec63欠損モデルでは初期には増殖が有意だが、後期にはアポトーシスが主体となることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited kidney disease that is a leading cause of end-stage renal disease. Isolated autosomal dominant polycystic liver disease (ADPLD) is genetically distinct from PLD associated with ADPKD. ADPLD is caused by mutations in SEC63 gene. The mechanism of cyst development is not still clear. The aim of this project is to elucidate mechanisms of cyst development. We revealed that there is a dose-response relationship between cystic dilation and levels of functional polycystin-1 in Sec63 conditional knockout mice. In addition, cell proliferation is one of the main factor of cyst progression in Pkd1 deficient model. However, we found that cell proliferation accelerates cyst growth in the early stage Sec63 deficient model, but the rate of apoptosis is increased at a late stage. These results suggest that the mechanism of cyst progression is different between Sec63 deficient mice and Pkd1 deficient mice.

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

キーワード：多発性肝嚢胞 Sec63 多発性嚢胞腎 細胞増殖 アポトーシス pkd1

## 1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease:ADPKD) は遺伝性腎疾患の中で最も頻度が高く (約 1000 人に 1 人) 加齢とともに嚢胞が両腎に増加し、進行性に腎機能が低下し、70 歳までに約半数が腎不全に陥る疾患であり、また高血圧、脳動脈瘤などの様々な腎外症状をきたす全身疾患である。ADPKD の原因遺伝子として *PKD1*、*PKD2* が同定されている。多発性肝嚢胞はしばしば ADPKD の患者にある症状であるが、腎嚢胞を伴わない肝嚢胞のみの病態を常染色体優性多発性肝嚢胞 (Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease:ADPLD) として区別している。ADPLD の原因遺伝子として、*PLD1* (*PRKCSH*)、*PLD2* (*Sec63*) とが同定されている。*Sec63* は小胞体 (ER) に存在する 3 回膜貫通蛋白である。*Sec63* はシャペロンの蛋白である Bip と結合し転送させる蛋白を小胞体内腔に引き込む役割をしている。これまで嚢胞形成の機序について様々な研究がされているが未だ明らかになっていない。また、ADPKD、ADPLD に対しての根本的な治療はまだなく臨床症状に応じて保存的治療が施されているのが現状である。

## 2. 研究の目的

多発性嚢胞腎・多発性肝嚢胞のモデルマウスである *Sec63* コンディショナルノックアウトマウスの解析を行い嚢胞形成の機序を明らかにし、治療法の解明を目指す。また、嚢胞以外の表現型の解析を行い *Sec63* の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

*Sec63<sup>lox/lox</sup>:ksp-cre* マウスを解析し腎嚢胞の解析を行った。また、*Sec63<sup>lox/lox</sup>:ksp-cre* マウスと *Pkd1<sup>lox/lox</sup>* マウスを交配し、腎嚢胞を解析することで、*Pkd1* の濃度と嚢胞形成の関係を観察した。

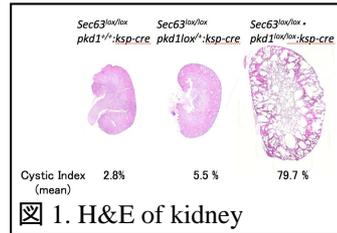
得られた腎臓において TUNEL 染色でアポトーシスを、BrdU 染色にて細胞増殖の解析を行った。アポトーシスの経路観察にはウエスタンブロッティングを行った。

小脳の解析には *Sec63<sup>lox/lox</sup>:GFAP-cre* マウスの解析を行った。得られた小脳を H&E 染色や各種抗体にて免疫染色を行い組織学的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) *pkd1* 濃度依存性による嚢胞形成の評価  
*Sec63<sup>lox/lox</sup>:Ksp-Cre* マウスと *Pkd1<sup>lox/lox</sup>*

マウスを交配し、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>lox/lox</sup>:Ksp-Cre*、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>lox/+</sup>:Ksp-Cre*、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>+/+</sup>:Ksp-Cre* マウスを作成した。7 日目で解剖し、腎組織を H&E 染色で確認したところ、*Pkd1* の濃度が下がるに従って、嚢胞は悪化していた (図 1)。



定量的に cystic index を用いて評価を行ったところ *Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>+/+</sup>:Ksp-Cre* マウスで 2.8%、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>lox/+</sup>:Ksp-Cre* マウスで 5.5%、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>lox/lox</sup>:Ksp-Cre* マウスで 79.7%と *Pkd1* がノックアウトされているマウスで明らかに嚢胞が悪化していた。

### (2) Cilia の形態の解析

嚢胞形成には Cilia が重要な役割を果たしている事が知られている。そこで、得られたマウスについて acetylated-tubulin で染色を行い、cilia の有無や形態異常について解析を行った。*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>lox/lox</sup>:ksp-cre* マウス、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>lox/+</sup>:ksp-cre* マウス、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·Pkd1<sup>+/+</sup>:ksp-cre* マウス、いずれにおいても cilia に異常を認めなかった。

### (3) アポトーシスと細胞増殖の解析

*Sec63<sup>lox/lox</sup>:Ksp-Cre* マウスを経時的に生後 1 ヶ月、2 ヶ月と解析したところアポトーシスは経時的に増加していた (図 2)。

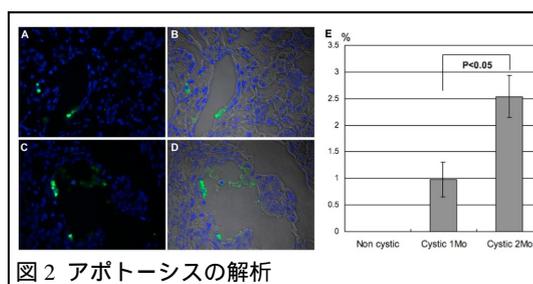


図 2 アポトーシスの解析

*Sec63<sup>lox/lox</sup>:Ksp-Cre* マウスを経時的に生後 1 ヶ月、2 ヶ月と解析したところ細胞増殖は生後 1 ヶ月目に高値であったが、その後減少していた。これらの結果から *Sec63* コンディショナルノックアウトマウスにおいては、*Pkd1* ノックアウトマウスとは異なり、最初は細胞増殖が盛んであるが、その後はアポトーシスが優位となり、腎臓が萎縮していくことが明らかになった。

*Sec63<sup>lox/lox</sup>:ksp-cre* マウスにおいて *Pkd1* の濃度が減少すると、濃度依存性にアポト

シス、細胞増殖ともに増加していた。これが、  
 嚢胞増悪の要因となっている可能性が示唆  
 された。

アポトーシスの経路についてウエスタン  
 ブロットイングにて *Sec63<sup>lox/lox</sup>·Ksp-Cre* マウ  
 スの解析を行ったところ、Caspase9、3 の関  
 与が認められた(図 3)。

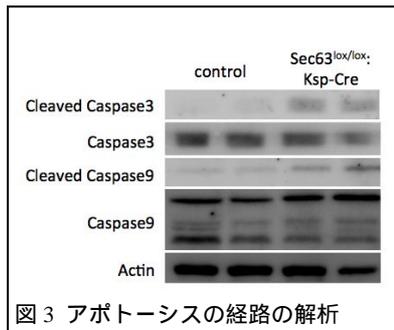


図 3 アポトーシスの経路の解析

#### (4) Planar cell Polarity (PCP) の解析

*Sec63<sup>lox/lox</sup>·ksp-cre* マウスにの腎臓を生後  
 7~P10 の時期で取り出し解析を行った。パイ  
 プロトームで 100 μm の厚さに切り、集合管  
 のマーカーである Aquaporin2(AQ2)と抗ヒス  
 トン抗体である H3pS10 抗体で二重染色し、  
 蛍光顕微鏡で撮影、3D 画像を構築した上で尿  
 細管の長軸と、尿細管細胞の分裂する方向の  
 角度を計測し、コントロールと比較検討を行  
 うことで PCP を行った。Pkd1、Pkd2 では嚢胞  
 形成には PCP は関与しないが、嚢胞増大には  
 関与していることが研究者にて報告されて  
 いるが、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·ksp-cre* マウスでは明ら  
 かな PCP の異常は認めなかった。

#### (5) 小脳の解析

*Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre* マウスの小脳の組織  
 学的検討

H&E 染色にて小脳の解析を行った。コント  
 ロールマウスでは小脳に分葉構造や層状構  
 造が保たれているが(図 4 A, C)、  
*Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre* マウスでは分葉構造、  
 層状構造に異常を認めた。

Calbindin 染色を行い、プルキンエ細胞の  
 観察を行った。コントロールではプルキンエ  
 細胞層は 1 層に整列しているが(図 4 C)、  
*Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre* マウスでは大きく配列  
 が崩れていた(図 4 F, G)。同様に GFAP 染色  
 を行ったところ、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre* マウ  
 スにおいて構造の異常を認めた(図 4 I, J)。

Tune1 染色にてアポトーシスの解析を行っ  
 たが、コントロールと *Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre*  
 マウスに差を認めなかった。

これらの結果から *Sec63* は小脳の形成過程  
 に重要な役割を担っていることが明らかに

なった。

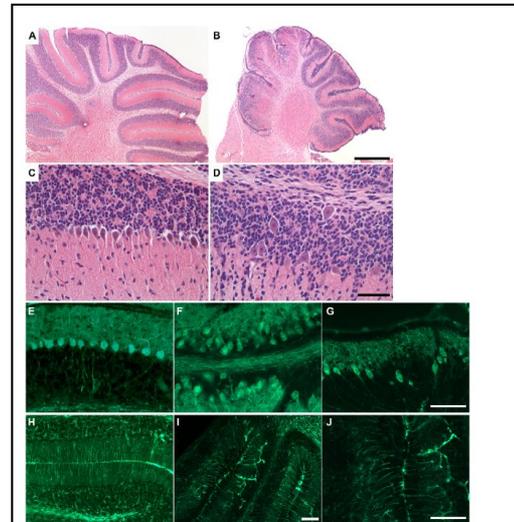


図 4

*Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre* マウスの小脳の解析

A~D: H&E 染色

E~G: calbindin、H~G: GFAP

A, C, E, H: コントロール

B, D, F, G, I, J: *Sec63<sup>lox/lox</sup>·GFAP-Cre* マウス

#### 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 3 件)

1. Fedeles SV, Tian X, Gallagher AR, Mitobe M, Nishio S, Lee SH, Cai Y, Geng L, Crews CM, Somlo S. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver disease defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet.* 43(7): 639-47 2011、査読有
2. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 22(2): 317-26. 2011、査読有
3. Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, King JD Jr, Li H, Zhang L, Karihaloo A, Haoows KR, Somlo S, Caplan MJ. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(6): 2462-7. 2011、査読有

[学会発表](計 1 件)

1. Tasuku Nakagaki, Saori Nishio, Yasunobu Ishikawa, Sekiya Shibasaki,

Akira Nishiyama, Stefan Somlo,  
Hiroyuki Kobori, Tatsuya Atsumi,  
Aliskiren Ameliorates Cyst  
Progression by Suppressing the  
Intrarenal Renin-Angiotensin System  
Activity in Autosomal Dominant  
Polycystic Kidney、American Society  
of Nephrology, Kidney Week 2013.  
2013.11.8. Georgia World Congress  
Center ( Atlanta, USA )

〔図書〕(計2件)

1. 西尾妙織、平面内細胞極性の異常による  
嚢胞形成、日腎会誌;54(4); 497 - 500、  
日本腎臓学会、2012、査読なし
2. 西尾妙織：多発性嚢胞腎の基礎研究から  
期待される新たな治療戦略。  
Nephrology Frontier 10(2); 36-39、メ  
ディカルレビュー社、2011、査読なし

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

西尾 妙織 (NISHIO SAORI )  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：90463736

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし