

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19013

研究課題名(和文) 中腎形成から考える、後腎尿管芽形成の新規メカニズム

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of the ureteric bud formation

研究代表者

村嶋 亜紀 (Murashima, Aki)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50637105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：中腎上皮特異的beta-catenin ノックアウト(cb-cat KO)マウス胚は異所性尿管芽を呈し、GDNF/Retの発現低下とc-Junの活性化を示した。cb-cat KOマウスのバックグラウンドに、Fgfr2遺伝子欠損を加えた中腎上皮特異的複合遺伝子KOマウスを作製し解析した結果、cb-cat KOマウスと同様の異所性尿管芽誘導が観察された。他の尿管芽誘導シグナルであるBMPシグナル関連因子の異所性尿管芽における発現変化は見られなかった。尿管芽におけるGDNF/Ret非依存的MAPKシグナル活性化経路として、FGF、BMPシグナルとは異なる新規経路の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hoxb7-Cre mediated removal of beta-catenin from the mouse Wolffian duct (WD) epithelium results in the ectopic ureteric bud (UB) formation. The expression of GDNF/Ret and its intracellular signaling pathways, PI3K/Akt and MEK/Erk, which are important for the normal UB formation, were not augmented in such ectopic ureteric buds. While prominent c-Jun phosphorylation was observed indicating GDNF/Ret signaling independent activation of MAPK signaling pathway during UB formation. Genetic ablation of Fgfr2 in the background of WD epithelia-specific beta-catenin KO did not rescue the phenotype. These results indicate that the presence of novel signaling pathway, other than GDNF/Ret, FGF and BMP, for the UB formation giving better understanding for human congenital anomalies, e.g. CAKUT.

研究分野：発生生物学

キーワード：中腎 尿管芽 beta-catenin Fgf 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の腎臓は、前腎・中腎・後腎の3段階を経て形成される。前腎・中腎はほぼ退行し、後腎が永久腎として発達・機能する。後腎は中腎管上皮より出芽する尿管芽と周辺の後腎間葉を原基とする。尿管芽は胎生初期に中腎管の1カ所から出芽し、後腎間葉との上皮間葉間相互作用によって分岐伸長し、自らは集合管となり腎臓を形成する。尿管芽の出芽位置や数の異常は先天性腎尿路奇形(CAKUT: congenital anomalies of the kidney and urinary tract、500出生児に対し1人の頻度で発症する)の原因となることが示唆されている。尿管芽と後腎間葉は中腎と一続きの構造より発生するが、それらの位置や数の決定における中腎発生の寄与はほとんど解析されていない。

これまで、尿管芽の位置と数の決定は後腎間葉に発現するグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)と中腎管上皮に発現する受容体チロシンキナーゼ(RTK)であるRetによるシグナルの量と位置の正確な制御によることが示唆されてきた。GDNF/Retシグナルは、PI3K/Akt経路やMEK/Erk経路等の細胞内シグナル経路を介して上皮細胞の増殖や移動、再構成を制御することが報告されている。また、近年、GDNF/Retに依存しない尿管芽の誘導機構がある可能性が報告されはじめている。例えば*in vitro*培養系において、線維芽細胞増殖因子(Fgf)をはじめとするRTKを介したシグナルが下流のMAPKシグナルを誘導して異所的な尿管芽を誘導することが示唆されていた。しかし、これらの実験は中-後腎領域を区別しておらず、GDNF/Ret非依存的な尿管芽誘導が*in vivo*で起こりうるかという点や、病態への関与については更なる解析が必要な状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究は中腎と後腎を連続して発生する一連の胎児性組織として包括的に解析し、中腎発生の後腎決定に与える影響を理解することを目的とした。細胞増殖因子群の複合遺伝子改変マウスの解析、またそれらのマウスを用いた3次元イメージング解析を行うことで尿管芽形成のメカニズム解明、ひいては最も発症頻度の高い先天性異常の一つであるCAKUTの病態発症機序の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、尿管芽誘導機構の解明を目指し、遺伝子改変マウス群を用いた遺伝学的解析を行った。遺伝子改変マウス胚、条件付き遺伝子改変マウス胚を採取し、遺伝子発現解析、免疫染色によるマーカー分子発現解析、イメージング解析を行なった。特に以下の点に着目して解析を行った。

### (1) 異所的な尿管芽誘導機構の解析

近年、中腎管上皮特異的*beta-catenin* KOマウスが異所的尿管芽形成を示し、重複腎や重複尿管等の腎尿路異常を示すことが報告された。このマウスにおいて、*beta-catenin*の欠失に起因する中腎管上皮の細胞分化異常が報告されているが、異所的尿管芽形成の病態メカニズムに関してはまだ明らかになっていない。本研究では*beta-catenin*遺伝子の欠失による異所的尿管芽形成の分子メカニズムの解明を目的とし、同遺伝子改変マウスを作出し、中腎-後腎領域における遺伝子発現解析を中心とした表現型解析を行った。

### (2) GDNF/Ret非依存的な上皮RTKシグナルによる尿管芽出芽決定機構の解析

GDNF/Ret非依存的な尿管芽誘導のマウスモデルとして中腎管上皮特異的

*beta-catenin* KO マウスや関連遺伝子の複合改変マウスを用いて尿管芽形成における細胞自律的シグナルカスケード制御機構の検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異所的な尿管芽誘導機構の解析

##### i. 中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスの作出と表現型解析

CAGGS-Cre と *beta-catenin<sup>flox/flox</sup>* を交配させ、得られた第一世代同士を交配させて *beta-catenin<sup>+/-</sup>* を得た。*beta-catenin<sup>+/-</sup>* の雌と *Hoxb7-Cre* の雄を交配させ、*Hoxb7-Cre; beta-catenin<sup>+/-</sup>* を作製した。この雄と *beta-catenin<sup>flox/flox</sup>* を交配し、得られた胎仔 *Hoxb7-Cre; beta-catenin<sup>flox/+</sup>* を中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスとして解析した。

*Pax2* の発現を指標に、コントロールと中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO 胚において中腎管の形態を比較した。その結果、胎生 10.5 日齢 (E10.5) ではコントロールと中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO の形態に差は観られなかったが、E12.5 において中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO 胚では中腎-後腎境界領域において中腎管の途絶と異所性の尿管芽様構造を示した。

中腎管上皮における *beta-catenin* 遺伝子の欠失パターンを確認したところ、中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO 胚では特に異所的な尿管芽において *beta-catenin* の発現が著しく減弱しており、*beta-catenin* 陽性の異所性尿管芽はほとんど観察されなかった。*beta-catenin* は canonical Wnt シグナルの細胞内シグナル伝達因子である。Wnt/*beta-catenin* シグナル活性のレポーター (TOPGAL) マウスを用いて、正常尿管芽形成過程における Wnt/*beta-catenin* シグナル活性を解析した結果、正常尿管芽の出芽において Wnt/*beta-catenin* シグナルの活性はほ

とんど観られなかった。これらの結果より、中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO 胚における異所的尿管芽は、Wnt/*beta-catenin* シグナルの活性の破綻に依存しないと推察された。

##### ii. 中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスの GDNF/Ret 非依存性の解析

本マウス中腎領域における *GDNF* と *Ret* の発現を *in situ* hybridization を用いて解析した結果、特に *Ret* の発現が中腎-後腎境界領域において低下しており、異所性尿管芽が GDNF/Ret 非依存的に誘導されていることが示唆された。

*in vitro* 培養系を用いた先行研究より、GDNF/Ret に依存しない尿管芽の誘導機構として、Fgf 受容体 (Fgfr) を介したシグナルが下流の MAPK シグナルを誘導して異所的な尿管芽を誘導することが示唆されていた。そこで、中腎管上皮における *Fgfr 1/2* の発現を解析したところ、*Fgfr2* が主に発現していることがわかった。*Fgfr2* 遺伝子 KO マウスは早期胎生致死であったため、*Hoxb7Cre* マウスと *Fgfr2<sup>flox</sup>* マウスを交配させ、中腎管上皮特異的 *Fgfr2* KO マウスを作成した。中腎管上皮における細胞増殖を EdU の取り込みによって解析した結果、中腎管上皮特異的 *Fgfr2* KO 胚ではコントロール胚に比べ、中腎領域における細胞増殖が低下しており、後腎領域、特に後腎間葉に接する正常尿管芽出芽領域では細胞増殖が維持されていた。これらの結果から、中腎管上皮の細胞増殖を制御する RTK シグナルとして、中腎領域では Fgf シグナル、後腎領域では GDNF/Ret シグナルが主要な役割を果たすことが示唆された。以上の結果から、中腎-後腎境界領域における異所性尿管芽誘導機構に Fgf シグナルが関与している可能性が考えられた。

##### (2) GDNF/Ret 非依存的上皮 RTK シグナルによる尿管芽出芽決定機構の解析

GDNF/Ret 非依存的尿管芽形成モデル

として中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスを用いて解析を行った。RTK シグナル経路の細胞内伝達因子として pErk、pJNK、pc-Jun、PI3K シグナル経路の細胞内伝達因子として pAkt を免疫組織化学の対象とした。3次元イメージングの手法を用いて異所性尿管芽で活性化している細胞内シグナルを解析した結果、異所性尿管芽上皮において MAPK 関連シグナルのうち、c-Jun を介した細胞内シグナルが特異的に活性化していることがわかった。

(1) の解析より、中腎管において GDNF/Ret シグナルと相補的に細胞増殖を制御する因子として Fgf シグナルが同定されたことより、異所性尿管芽形成においても GDNF/Ret シグナルと Fgf シグナルの MAPK 経路を介した相補関係の可能性が考えられた。そこで、中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスのバックグラウンドに *Fgfr2* 遺伝子の欠損を加えた中腎管上皮特異的複合遺伝子 KO (*Hoxb7-Cre; beta-catenin<sup>flox/-</sup>; Fgfr2<sup>flox/-</sup>*) マウスを作製し、遺伝学的表現型回復実験を試みた。*Pax2* 遺伝子の発現を指標に尿管芽の表現型を解析したところ、中腎管上皮特異的複合遺伝子 KO マウスにおいても、中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスと同様の異所的尿管芽誘導が観察され、c-Jun の活性が異所性尿管芽で亢進していた。これらの結果から GDNF/Ret 非依存的尿管芽誘導における MAPK シグナルの活性化は Fgf シグナルを介さないことが示唆された。

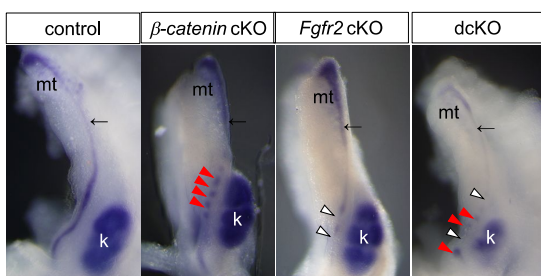


図1 *Pax2*プロンプによるE12.5マウス胚の中腎・後腎領域のwhole mount RNA *in situ* hybridization. 中腎管特異的*beta-catenin* KO マウス (*beta-catenin* cKO) は異所性尿管芽を呈する。中腎管特異的 *Fgfr2* KOマウス (*Fgfr2* cKO) は中腎管の途絶を呈する。 *beta-catenin* cKO マウスに見られる異所性尿管芽は *Fgfr2* のKO (dcKO) によってレスキューされなかった。

←中腎管, ▲異所性尿管芽, △中腎管の途絶, k: 後腎, mt: 中腎細管

次に GDNF/Ret 非依存的に MAPK 関連シグナルを活性化させる上流シグナルの候補として、BMP シグナルに着目し解析を行った。中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスの異所性尿管芽周辺間葉における BMP シグナルの細胞内伝達因子 (pSmad1/5/8) やアンタゴニスト (*Gremlin*) の発現を解析したが、対照群と比べて中腎管上皮特異的 *beta-catenin* KO マウスにおいて特異的に発現変化を示す遺伝子の同定には至らなかった。すなわち、異所性尿管芽における GDNF/Ret 非依存的 MAPK 関連シグナル活性化経路として、これまで示唆されていた、FGF、BMP シグナル経路とは異なる新規の経路の関与が示唆された。

研究期間全体を通して本研究で得られた知見は、尿管芽形成において従来から示唆されていた GDNF/Ret シグナル等とは独立した新規の MAPK シグナル経路の機能をはじめて示唆するものであり、CAKUT などの病態解明、もしくは腎臓の再生医療に大きく貢献するものと考えられる。

## 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 9 件)

Matsushita S, Suzuki K, Murashima A, Kajioka D, Acebedo A, Miyagawa S, Haraguchi R, Ogino Y, and Yamada G.

Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development. *Nature Reviews Urology*, 2018; 15(6):358-368.

(査読有)

doi: 10.1038/s41585-018-0008-y.

Haraguchi R, Kitazawa R, Murashima A, Yamada G, Kitazawa S.

Developmental Contribution of Wnt-signal-responsive Cells to Mouse Reproductive Tract Formation. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2017; 50(4):127-133

( 査読有 )

doi: 10.1267/ahc.17017.

Liu L, Suzuki K, Chun E, Murashima A, Sato Y, Nakagata N, Fujimori T, Yonemura S, He W, Yamada G. Androgen Regulates Dimorphic F-Actin Assemblies in the Genital Organogenesis.

*Sexual Development*, 2017; 11(4):190-202

( 査読有 )

doi: 10.1159/000477452.

Suzuki K, Matsumaru D, Matsushita S, Murashima A, Ludwig M, Reutter H, and Yamada G. Epispadias and the associated embryopathies: genetic and developmental basis.

*Clinical Genetics*, 2017; 91(2):247-253

( 査読無 )

doi: 10.1111/cge.12871

崎田佳嗣, 岡澤-坂井美佳, 村嶋亜紀, 山田源. ウォルフ管上皮特異的 beta-catenin 遺伝子ノックアウトマウスの示す異所的尿管芽の病態解析.

*和歌山医学*, 67(2), 56-61, 2016-06

( 査読有 )

\*Ipulan LA, \*Raga D, Suzuki K, Murashima A, Matsumaru D, Cunha G, Yamada G. Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone -disruptor treatments.

*Differentiation*, 2016; 91(4-5):78-89

( 査読無 )

doi: 10.1016/j.diff.2015.11.001.

\*These authors contributed equally

Matsumaru D, Murashima A, Fukushima J, Senda S, Matsushita S, Nakagata N, Miyajima M, Yamada G. Systematic stereoscopic analyses for cloacal development: The origin of anorectal malformations.

*Scientific Reports*, 2015; 5:13943

( 査読有 )

doi: 10.1038/srep13943.

Murashima A, Xu B, Hinton BT. Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct using transgenic mice.

*Asian Journal of Andrology*, 2015; 17(5):749-55

( 査読無 )

doi: 10.4103/1008-682X.155540.

\*Okazawa M, \*Murashima A, Harada M, Nakagata N, Noguchi M, Morimoto M, Kimura T, Ornitz DM, and Yamada G.

Region-specific regulation of cell proliferation by Fgf receptor signaling during the Wolffian duct development.

*Developmental Biology*, 2015;

400(1):139-47

( 査読有 )

doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.023.

\*These authors contributed equally

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Murashima A, Okazawa M, Yamada G. The functions of growth factor signaling in the developing Wolffian duct and male reproductive tract.

7<sup>th</sup> international Symposium on the biology of Vertebrate Sex

Differentiation, 2015 年 4 月

( Kona, Hawaii, USA )

[ 図書 ] ( 計 件 )

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村嶋 亜紀 (MURASHIMA, Aki)

岩手医科大学, 医学部, 助教

研究者番号：50637105

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )