

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07397

研究課題名(和文)腎尿細管の構造と機能を制御する非中心体微小管の研究

研究課題名(英文) Non-centrosomal microtubules that control the structure and function of kidney tubules

研究代表者

戸谷 美夏 (TOYA, Mika)

早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付)

研究者番号：80455360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞で、微小管細胞骨格は、細胞の頂端-基底軸に沿って配向する特徴的な編成を示す。この編成は、微小管マイナス端に結合するCAMSAP3タンパク質によって維持されるが、上皮機能への関与は、未だよく分かっていない。本研究におけるCamsap3変異マウスの解析から、上皮微小管編成の不全が、多発性嚢胞腎に似た腎臓の構造異常を引き起こすことが明らかになった。変異マウスでは、近位尿細管の拡張による、嚢胞が観察された。拡張した尿細管の上皮細胞は、引き延ばされるように扁平化し、それにともない、機械刺激に応答する制御因子が活性化されることによって、細胞増殖が亢進するという嚢胞の形成機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの臓器を構成する上皮細胞で、微小管は、その特徴的な編成から上皮機能に重要な役割をもつと考えられてきた。しかしながら、その生理的な役割は未だ不明な点が多い。本研究において、上皮微小管編成が、腎臓の構造と機能に重要であることを明らかにし、また、嚢胞腎形成の新たな機構を示唆することができた。基礎生物学、基礎医学に貢献する成果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells organize a characteristic, an ordered, array of non-centrosomal microtubules. CAMSAP3, a microtubule minus-end binding protein, orients the microtubules, however, their role in epithelial functions are not fully understood. We analyzed Camsap3 mutant mice and found that they show a polycystic kidney disease-like phenotype. The blood K⁺ or Mg⁺⁺ level was significantly lower in the mutant mice. Further analysis revealed that the proximal convoluted tubules (PCTs) were specifically dilated. The epithelial cells at the dilated PCTs became stretched, and they contained disorganized microtubules. Cell proliferation was promoted in the PCTs cells along with activation of mechanosensitive regulators. These observations suggest that the epithelial array of microtubules is important for the integrity of PCTs, and lack of this assembly causes cell stretching, leading activation of mechanosensitive regulators and cell proliferation, resulting in cystic tubular dilation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 微小管編成 腎臓 嚢胞腎 微小管マイナス端 非中心体微小管 CAMSAP3 ノックアウトマウス

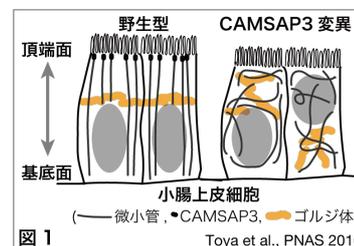
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微小管は、細胞内でその役割にしたがってダイナミックに再編成され、細胞極性や細胞内の輸送、細胞運動、染色体分配到重要な役割を果たしている。微小管の編成には、微小管自身がもつ極性から生じるプラス端（動的な新頂端）と、マイナス端（より静的な微小管形成起点）の制御が深く関与する。微小管プラス端制御の分子機構は、培養細胞や酵母を用いてよく解析が進められている。しかしながら、微小管マイナス端の制御機構について、特に、体内組織を構成する細胞における微小管の制御機構とその役割は、多くのことが明らかになっていなかった。

我々は、微小管マイナス端結合タンパク質 CAMSAP3 の変異マウスを作製し、多くの臓器を構成する上皮細胞に着目した解析を進めた。その結果、小腸の上皮細胞において、CAMSAP3 タンパク質が、上皮細胞に特徴的な微小管編成（細胞の頂端—基底軸に沿って、非中心体微小管が配向する）を制御することを見いだした（図1）。Camsap3 変異マウス的小腸上皮細胞では、微小管の配向が乱れるとともに、細胞小器官の配置が乱されたが、組織・臓器レベルの異常は認められず、生体内での微小管編成がもつ役割については不明であった。



解析の過程で、高齢の Camsap3 変異マウスにおいて、左右両側の腎臓が肥大し白色化して泡のような構造を多数もつ、多発性嚢胞腎の特徴を示す顕著な構造異常を見出した。日齢を遡ると、腎臓表面に肉眼で分かる構造異常を認めなくなるが、組織切片を作製して観察すると、生後 21 日の Camsap3 変異マウスにおいても、腎臓の皮質部分に嚢胞が観察され、この構造異常が CAMSAP3 の機能欠損に起因することが強く示唆された。さらに、嚢胞は、尿細管の一部が拡張した結果観察されるという予備的な結果を得ていた。

2. 研究の目的

Camsap3 変異マウスで新たに見つかった腎臓の構造異常（嚢胞腎）について、生理的、および、組織・細胞生物学的な解析を行うことにより、CAMSAP3 が制御する上皮細胞に特徴的な微小管編成の生理的役割と、腎臓上皮細胞における微小管制御機構、および、微小管マイナス端結合タンパク質 CAMSAP3 の機能欠損によって生じる嚢胞腎の形成メカニズムを明らかにすることを目指した。具体的には、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- (1) CAMSAP3 が関わる微小管制御のマウス腎機能への影響
- (2) 腎臓上皮細胞の微小管編成に関わる CAMSAP3 の役割とその分子機構
- (3) CAMSAP3 が関わる微小管制御が嚢胞腎を形成するしくみ

3. 研究の方法

- (1) 生化学検査: Camsap3 変異が引き起こす腎臓の構造異常が生体に及ぼす影響を調べるために、腎機能障害の指標となる、尿中のクレアチニン、アルブミン、糖、ナトリウム、カリウム、クロライド、および、血清中のクレアチニン、アルブミン量について、生化学的検査を行った。
- (2) 組織レベルでの形態変化の解析: 生後 21 日の Camsap3 変異マウスで観察された、尿細管の拡張が始まる時期と、拡張の進行について、胎胚期から高齢マウスの組織標本を作製し、組織形態や細胞形態、分裂期にある細胞を解析し、嚢胞腎形成のしくみを探った。
- (3) 細胞内の微小管編成と細胞レベルでの形態変化の解析: Camsap3 変異マウスにおいて拡張した尿細管の上皮細胞では、小腸上皮細胞と同様に、微小管の編成が乱れるという予備的な結果を得ていた。いっぽう腎組織では、小腸とは異なり、領域ごとに表現型のばらつきがあった。微小管の編成、動態の指標となる翻訳後修飾、細胞小器官について、高解像の顕微鏡画像を得て解析し、腎組織を構成する上皮細胞における微小管制御と、尿細管拡張のしくみを探った。
- (4) Camsap3 null マウスの作出: (2)(3)の解析の過程で、腎臓上皮細胞では、小腸上皮細胞とは異なり、細胞頂端領域の細胞間接着部位に Camsap3 変異タンパク質のシグナルが検出されることがわかった。Camsap3 変異タンパク質が表現型に与える影響を排除するため、理化学研究所 BDR 生体モデル開発チームとの共同研究で、Camsap3 遺伝子全領域 22kb を欠失した Camsap3 ノックアウトマウス(Camsap3 KO マウス)を作出し、表現型の確認を行った。

4. 研究成果

本研究から以下のことが明らかになった。

- (1) Camsap3 変異マウスにおける嚢胞形成

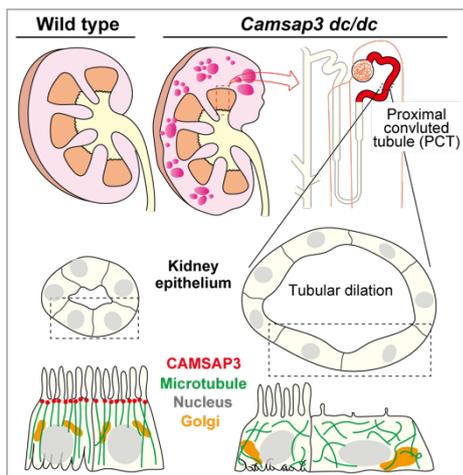
腎臓は、皮質と髄質の 2 つの層に、最小機能単位であるネフロンが多数詰まった構造をもつ。生後 21 日の Camsap3 変異マウス腎臓で観察された嚢胞は、ネフロンを構成する尿細管の一部で

ある、近位尿細管が拡張した結果観察されることがわかった。尿細管の拡張は、17.5 日胚においてもわずかに観察され、日齢を経るにしたがって拡張の度合いが増した。生後 487 日の老齢マウスでは、皮質全体に数多くの嚢胞が形成され、ポーマン嚢の拡張も観察された。体重に対する腎臓の重量は、生涯を通じて野生型に比べて変異マウスで、より高い値が計測された。

(2) 尿細管上皮細胞の形態と細胞内構造

Camsap3 変異マウスにおいて拡張した尿細管上皮細胞は、扁平に伸展し、野生型では頂端面を覆う微絨毛が、部分的に欠損する様子が観察された。このような細胞では、頂端面の膜構造を支えるタンパク質である *Ezrin* が脱局在し、野生型で近位尿細管の頂端面に局在するエンドサイトーシス受容体である *Megalyn* が、細胞質側に広がる様子も観察された。さらに、細胞の変形にともなって、核の形態が扁平化し、野生型で頂端—基底軸に沿うように配置するミトコンドリアや、核近傍に局在するゴルジ体の細胞内の配置も、*Camsap3* 変異により乱された。*Camsap3* 変異により、細胞膜の極性に異常は認められなかったが、野生型で頂端—基底軸に沿うように観察される基底側膜 (basolateral membrane) の貫入構造が、変異マウスでは基底部近くのみ観察され、方向性が乱れる様子が観察された。

微小管は、野生型マウスの尿細管上皮細胞で、頂端—基底軸に沿った配向性をもつ上皮細胞に特徴的な編成で観察されたが、近位尿細管とそれ以外 (遠位尿細管、集合管) では、微小管のシグナル強度が異なり、近位尿細管では、それ以外の尿細管より少ない量の微小管の存在が示唆された。*Camsap3* 変異マウスにおいても同様の傾向が観察され、さらに、拡張した尿細管の上皮細胞では、小腸上皮細胞の場合と同様に、微小管の配向が乱れる様子が観察された。拡張していない尿細管では、小腸の場合とは異なり、頂端—基底軸に沿った微小管配向が保たれる様子も観察され、上皮微小管編成の制御について、臓器ごとに異なるしくみの存在が示唆された。



(3) 生理的機能に与える影響

Camsap3 変異マウスにおいて、組織化学的解析で嚢胞の表現型が明らかになる、生後 56 週齢～60 週齢のマウスを用いて、尿・血液を採取し、生化学検査を行った。その結果、変異マウスにおいて、腎疾患でネフロン機能障害 (濾過機能障害) の指標となる、血中尿素窒素に異常は認められなかった。しかしながら、尿中のカリウム、マグネシウムが野生型に比べて *Camsap3* 変異マウスで高い傾向が認められ、血中のカリウム、マグネシウムは、野生型に比べて変異マウスで有意に低かった。これらの結果から、*Camsap3* の機能欠損により、腎機能にある程度の障害を来し、カリウム、マグネシウムの再吸収が損なわれることが分かった。

(4) *Camsap3* 変異マウスにおいて尿細管の拡張 (嚢胞腎形成) が起こるしくみ

多発性嚢胞腎形成の原因として、一次線毛の形成異常が知られるが、*Camsap3* 変異マウスの腎臓では、一次線毛は野生型と同様に観察された。いっぽう、変異マウスの尿細管上皮細胞では、野生型に比べて細胞増殖が亢進することが分かった。核内に局在することで細胞増殖因子の転写を活性化し、細胞増殖を誘導することが知られる転写共役因子である *YAP* に着目し、局在を調べた。その結果、拡張した尿細管を取り囲む細胞では、*YAP* の核内局在が観察された。*YAP* の活性化に関わる経路はいくつか知られるが、細胞の扁平化/伸展が、糸球体から濾し出された原尿のフロー、すなわち、機械刺激 (メカノストレス) による可能性を推察した。機械刺激にตอบสนองして細胞質から核内に局在を変化させるイオンチャネルタンパク質である *PIEZO1* の局在を調べた結果、*YAP* が核内に局在する細胞では、*PIEZO1* の核内局在が観察され、*YAP* の活性化が機械刺激により引き起こされる可能性が示唆された。

以上の結果から、*CAMSAP3* が制御する上皮微小管編成は、腎臓で、近位尿細管を構成する上皮細胞の構造維持に、重要な役割を果たすことがわかった。*CAMSAP3* による微小管編成維持のしくみが欠損すると、細胞が伸展し、その機械刺激にตอบสนองした受容体が活性化されて、細胞増殖が促されることにより、尿細管の拡張が起こることが推測された。上皮細胞に特徴的な微小管編成の生理的役割を明らかにし、嚢胞腎形成の新たな機構を示唆する結果であり、国内外で読まれる論文を発表できると考える。論文投稿準備中。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mika Toya and Masatoshi Takeichi
2. 発表標題 CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in polarized epithelial cells
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masamitsu Sato and Mika Toya
2. 発表標題 微小管が形成される場所・時間を連動して制御する分子メカニズム
3. 学会等名 第92回日本化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考