

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790587

研究課題名（和文） 嚢胞腎進展における MAPkinase カスケードの解析
～ 阻害剤による治療の検討～

研究課題名（英文） Analysis of MAPkinase cascade in renal cyst progression.

研究代表者

杉山 紀之（SUGIYAMA NORIYUKI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：90381954

研究成果の概要：2 型家族性若年性ネフロン癆のモデルマウスを用いて、その嚢胞腎の発症機構に關与する細胞内シグナル伝達カスケードを明らかにした。その中でも、Erk を介した MAP kinase カスケードの活性化が尿細管上皮細胞の異常増殖に關与していることを明らかにした。実際に Erk の上流因子である Mek の阻害剤を投与することによって、嚢胞腎進展の抑制および尿細管上皮細胞の異常増殖の低下が認められ、治療薬として Mek 阻害剤が有効であることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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：腎臓学、嚢胞腎

1. 研究開始当初の背景

家族性若年性腎癆(NPHP)は尿毒症に貧血、多尿、多飲多渴症、等張尿症が進行し死に至る、常染色体の劣性遺伝性の疾患であり、子供や若年成人の末期腎臓不全の最も一般的な遺伝的要因である。最近、乳児型 NPHP(NPHP2)の責任遺伝子として inv が報告された(Otto et al. 2003. Nat. Genet. 34, 413-420)。inv 遺伝子は内臓逆位と嚢胞腎を合併する変異マウス(inv マウス)の責任遺伝子として我々が最初に同定したものであり(Mochizuki et al. 1998. Nature. 395, 177-181)、Inv が正常に機能する事が正常な

腎臓形成及び機能に必要であると考えられた。しかし、inv マウスの嚢胞腎の分子学的解析は行われておらず、嚢胞腎形成での Inv の機能は全く分かっていなかった。

我々は嚢胞腎を発症するマウスとして、inv マウスと inv マウスに C 末端を欠く inv を遺伝子導入した partial rescue マウス(inv PR マウス)を有している(Watanabe et al. 2003. Development. 130, 1725-1734)。inv マウスは出生時に既に嚢胞腎であり、出生 7 日齢までに死亡する。inv PR マウスの heterozygous は 1 週齢から嚢胞化し始め、4 週齢で尿細管のほとんどが嚢胞化して死亡

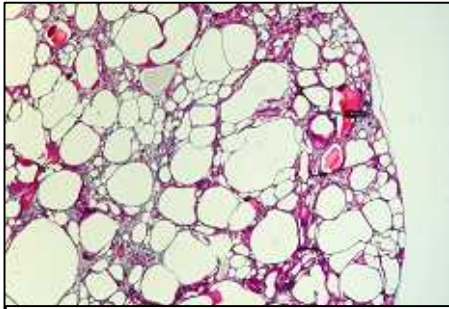


図1 . *inv PR* マウスの嚢胞腎

する(図1)。我々は現在までに平成17年~18年度科研費若手研究(B)腎臓内科学の採用研究により、*inv PR* マウスの heterozygous を用いて、尿細管上皮細胞での細胞増殖と apoptosis が亢進していること、さらに細胞周期制御因子が活性化していることを報告した(Genes to Cells. 11, 1213-1224)。既に *inv* マウスにおいても細胞増殖とアポトーシスが亢進している事を確認している。しかし、嚢胞腎の総細胞数は正常腎と変わらない事を確認している。したがって、*inv* 遺伝子の欠失により尿細管上皮細胞での細胞増殖が亢進するが、細胞死を起こして細胞数を正常に制御している事が示唆される。つまり、嚢胞化は尿細管上皮細胞の異常な増殖に起因している可能性が考えられ、その増殖シグナルの解析が求められていた。

2. 研究の目的

我々は NPHP2 モデルマウスの嚢胞腎において、細胞増殖に関わる Signal cascade の解析を行なうことを最初の目的とした。さらにその signal cascade を標的とした阻害薬などで治療実験を行うことにより、嚢胞腎の治療薬開発の基盤作りを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 嚢胞腎発症過程で活性化するシグナルカスケードの解析

inv マウスと *inv PR* マウスの嚢胞腎を用いて、MAP kinase カスケードと Wnt シグナルの解析を Western blot 法、免疫組織化学染色法を用いて、嚢胞化に伴い活性化するシグナルカスケードを同定する。

現在までに、MAP kinase カスケードの中の Erk と p38 が嚢胞腎初期から活性化していることを primitive data ではあるが明らかにしており、再度確認の実験を行う。

inv マウスおよび *inv PR* heterozygous & homozygous マウスにおける MAP kinase カスケード因子の Western

blot 法

MAP kinase カスケード因子の嚢胞腎での免疫組織化学染色による発現細胞の同定

さらに、Wnt シグナルに関しても同様に、確認の実験を行う。

リン酸化 - catenin の Western blot 法による嚢胞腎と正常腎との比較

嚢胞腎と正常腎の核分画による - catenin の Western blot 法による比較

- catenin の免疫組織化学染色による核移行細胞の検出

inv PR homozygous マウスを用いた阻害剤を用いた投薬実験

MAP kinase カスケードの Erk 上流の MEK の阻害剤である PD184352, p38 の阻害剤である FR167653 を用いて、嚢胞腎への影響を検討する。

効果的な投薬方法の検討・投薬実験は経口投与しやすく、長期投与可能な *inv PR* homozygous マウスを用いて行う。

評価項目は以下の通りである。

- 体重
- 腎重量
- 目的シグナルカスケードの上流、下流因子の Western blot 法により阻害の確認
- 嚢胞化の組織学的解析(尿細管径など)
- 細胞増殖(BrdUの取込率)
- 細胞死(Tunnel法によるApoptosisの検出)

4. 研究成果

我々は細胞増殖に関わる Signal cascade の解析を行ない、MAPK family のうちの Erk と p38 が嚢胞発症初期から活性化されていることを見出した(図2)。さらに、その活性が尿細管上皮細胞で起きていることを確認している。既に他の嚢胞腎モデルマウスで活性化することが知られている JNK シグナル

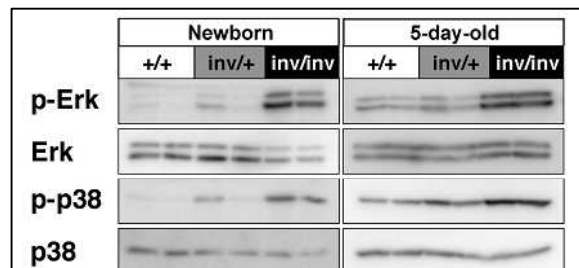


図2. *inv* マウスにおける MAPK の活性化

や Akt シグナルよりも、Erk の活性は嚢胞進展の早い時期であることから、このシグナルカスケードが嚢胞化に深く関与することが示唆された。

既に *Inv* の欠失により Wnt signal の Canonical 経路が活性化される可能性が報告されたが (Simons *et al.* 2005. *Nat. Genet.* 37, 537-543)、我々は *inv* マウスおよび *inv PR* マウスにおいて Wnt signal の Canonical 経路で起こる β -catenine のリン酸化と核移行が正常腎と差がない事を確認した。さらに Canonical 経路のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと *inv PR* マウスあるいは *inv* マウスを交配して、*in vivo* での Canonical 経路の活性化を調べた。しかしながら、どの発生段階においても Canonical 経路の活性化は認められなかった。

したがって、嚢胞化には Wnt の Canonical 経路の活性化ではなく、MAP kinase cascade の活性化によって細胞増殖が亢進すると考えられ、嚢胞腎の治療には MAP kinase cascade の活性化阻害が有効である可能性が示唆された。

我々は *inv PR* マウスを homozygous にすることにより、嚢胞化が遅延することを見出した。これにより胎生期から発症する *inv* マウス、幼少期から発症する *inv PR* heterozygous マウス、および若年期から発症する *inv PR* homozygous マウスと、3 種類の各発育段階に嚢胞腎を発症する NPHP モデルマウスを得た。そこで、MAP kinase cascade の阻害剤を用いて、嚢胞腎の治療を行った。Erk の上流である MEK の阻害剤である PD184352、p38 の阻害剤である FR167653 および種々の抗腫瘍剤を用いて

NPHP マウスの嚢胞腎での細胞増殖を抑制することにより、嚢胞腎発症の治療の検討を行った。MEK 阻害剤の PD184352 の投薬により、腎重量の減少が観察された (図 3)。さらに、血中クレアチニンおよび尿素窒素などの腎機能の回復が認められた。加

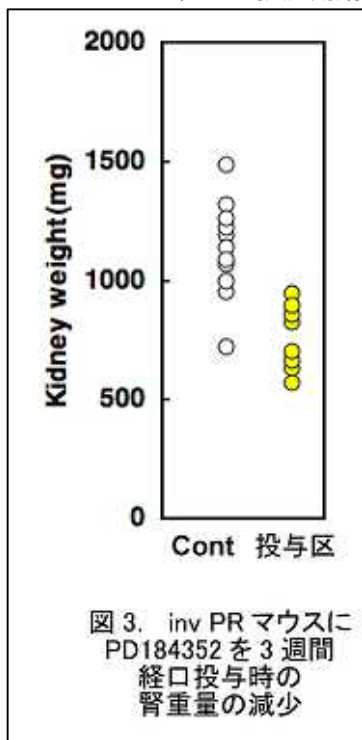


図 3. *inv PR* マウスに PD184352 を 3 週間経口投与時の腎重量の減少

えて、尿細管の拡張も押さえられた。また、嚢胞化の 1 つの現象である尿細管上皮細胞の異常増殖も低下し、さらに細胞周期関連因子の活性化も正常レベルまで抑えられた。

以上のことから NPHP2 のモデルマウスにおいて Erk カスケードの抑制することが嚢胞化の抑制に非常に効果があることが明らかとなった。すなわち、NPHP の嚢胞腎発症および進展には MAP kinase カスケードの活性化が深く関わる事が明らかとなった。さらに治療実験により、NPHP の嚢胞腎の治療薬開発の基盤となる結果が得られた。

p38 MAPKinase は Erk と同様に嚢胞化初期から活性化していた。そこで、その阻害剤投与を行ない、嚢胞の大きさ、細胞増殖および細胞死を比較した。しかしながら、p38 MAPKinase を阻害しても、腎重量、尿細管の拡張の程度、尿細管上皮細胞の異常増殖、細胞死には非投薬区と変化はなく、p38 MAPKinase は嚢胞化と無関係である可能性が高いことが示唆された。まだ解決はされていないが、p38 MAPKinase は嚢胞化に伴う細胞外基質の増加あるいは炎症反応に関わっている可能性があることが予想された。そこで、細胞外基質の代表的な因子であるコラーゲン、ラミニンの分泌量を RT-PCR で解析したところ、阻害薬投与区で有意に発現量の低下が認められた。したがって、p38 MAPKinase は嚢胞化に伴う細胞外基質の異常分泌に関与していることが示唆された。嚢胞腎の中でも NPHP はヒトの症状としてはネフロン癆として観察され、繊維化が亢進していることが知られている。

我々はさらに嚢胞腎で起こる尿細管上皮細胞の異常増殖に Erk カスケードが重要であることを示すために、Erk1 null マウスと Erk2 conditional knock-out マウスを導入した。腎臓特異的に Erk がノックアウトされるために、Ksp-cadherin のプロモーターで発現される Cre transgenic マウスも導入した。今後、*inv PR* マウスと交配することにより、嚢胞化と Erk の関係を詳細に解析できる事が可能となった。

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 1 件)

Okumura Y, Sugiyama N, Tanimura S, Nishida M, Hamaoka K, Kohno M, Yokoyama T. ERK Regulates Renal Cell Proliferation and Renal Cyst Expansion in *inv* Mutant Mice. *Acta Histochem Cytochem* (2009) 42 : 39-45 査読有り

[学会発表](計6件)

杉山紀之、横山尚彦 MAPK Signaling Pathway but not Canonical Wnt/ β -catenin Signaling Pathway is Activated in Renal Epithelial Cells of *inv* Mutant Mice 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会 2007年5月28日 福岡国際会議場

奥村保子、杉山紀之、西田眞佐志、横山尚彦 *Inv/inv* C::GFP マウス(2型若年性ネフロン癆モデルマウス)の腎嚢胞形成における ERK-MAPK cascade の役割 第42回日本小児腎臓学会 2007年6月30日 パシフィコ横浜・アネックスホール

奥村保子、杉山紀之、西田眞佐志、横山尚彦 *inv/inv, inv Δ C::GFP* (2型若年性ネフロン癆モデルマウス)の腎嚢胞形成における EPK kinase cascade の役割 第51回日本腎臓学会 2008年6月1日 福岡国際会議場

杉山紀之、奥村保子、横山尚彦 *inv* マウスの嚢胞腎における canonical Wnt/ β -catenin 経路の関与 第51回日本腎臓学会総会 2008年6月1日 福岡国際会議場

杉山紀之、横山尚彦 *inv* マウス(NPHP2モデルマウス)の嚢胞腎における canonical Wnt pathway の活性化 第16回嚢胞性腎疾患研究会 2008年9月6日 東京慈恵会医科大学

杉山紀之、横山尚彦 *inv* マウス嚢胞腎における異常はランダムな細胞分裂方向が最初である 第8回 PKD 研究会 2008年12月21日 東京・パレスホテル

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 紀之 (SUGIYAMA NORIYUKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 90381954