

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20689017

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を使用した腎嚢胞、肝嚢胞の解析

研究課題名 (英文) Analysis of Sec63 conditional knockout mice

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

研究成果の概要 (和文)：

Sec63 コンディショナルノックアウトマウスを解析する事により、常染色体優性多発性肝嚢胞でどの様にして嚢胞形成がされるのかを明らかにした。また、Sec63 遺伝子をノックアウトすることで、アポトーシスがさかんとなり、嚢胞形成の原因となるだけではなく、網膜変性など多臓器に影響を及ぼす事が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

I elucidated the mechanism of cyst formation in autosomal dominant polycystic liver disease by analysis of Sec63 conditional knockout mice. I also elucidated one of the function of Sec63. Sec63 is strongly associated with apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	18,400,000	5,520,000	23,920,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：常染色体優性多発性嚢胞腎、常染色体優性遺伝性肝嚢胞、Sec63、アポトーシス、細胞増殖、cilia、水腎症

## 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

- ・ *Sec63* コンディショナルノックアウトマウスを使用し嚢胞形成の機序を解明する。
- ・ 腎嚢胞、肝嚢胞以外の臓器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

- (1) *Sec63<sup>lox/lox</sup>·ksp-cre*, *Sec63<sup>lox/lox</sup>·pCX-Cre* マウスの嚢胞の組織学的に解析する。
- (2) 嚢胞形成と細胞増殖、アポトーシスについての解析
- (3) *Sec63<sup>lox/lox</sup>·Chx10-cre* などのマウスを解析し、腎臓、肝臓以外の臓器での表現型を解析する。

## 4. 研究成果

(1) *Sec63<sup>lox/lox</sup>·ksp-cre* を生後 0 日、2 週、4 週、2 カ月、3 カ月と経時的に観察した。ほとんどが生後 1 カ月程度で腎不全のため死亡した。生後 0 日では特に腎臓に変化が認められないが、生後 2 週目より水腎症、腎嚢胞を認めた (図 1 C)。その後、腎嚢胞は増悪していくが (図 1 E)、常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) では腎臓そのもののサイズが増大するにもかかわらず、*Sec63<sup>lox/lox</sup>·ksp-cre* マウスの腎臓はサイズの減少していった (図 1 A)。図 1 A は  $\beta$ -gal staining であり Cre 陽性細胞が青くそまる染色であるが、右のノックアウトの腎臓は左のコントロールと比較し萎縮し、また、著明な水腎症を呈している事を示している。免疫染色にて腎臓嚢胞上皮における cilia の発現について解析をおこなったが、cilia の形状には異常を認めなかった。

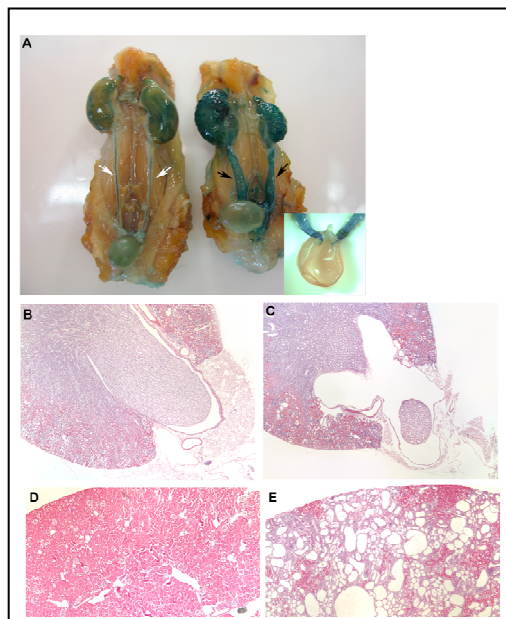


図 1. *Sec63<sup>lox/lox</sup>·Ksp-Cre* mice の解析

## A 生後 3 ヶ月の *Sec63<sup>fllox/+</sup>·Ksp-Cre·R26R*

mice (左)、*Sec63<sup>fllox/fllox</sup>·Ksp-Cre·R26R* mice (右) の  $\beta$ -gal staining. 生後 14 日目 (B, C) と生後一ヶ月 (D, E) のマウスの組織像。B, D; コントロール. C, E; ノックアウト。

*Sec63<sup>lox/lox</sup>·pCX-Cre* マウスはタモキシフェンを投与することで Cre を発現させることができるモデルである。P0、2 週 (発達過程)、4 週 (成熟) と様々な時期で *Sec63* をノックアウトすることで、嚢胞形成を確認した。いずれの時期で、タモキシフェンを投与しても肝嚢胞、腎嚢胞形成を確認したが、早期 (発達過程) でタモキシフェン投与した方がより嚢胞は増悪していた。肝嚢胞上皮細胞においても cilia の形成には異常を認めなかった。

(2) ADPKD では、嚢胞形成には細胞増殖が非常に重要であると報告がされていることから細胞増殖について BrdU 染色を行い解析した。*Sec63<sup>lox/lox</sup>·ksp-cre* マウスの嚢胞形成初期は、ADPKD と同様に細胞増殖が盛んであった。しかし、生後 2 カ月では明らかに細胞増殖は低下していた。

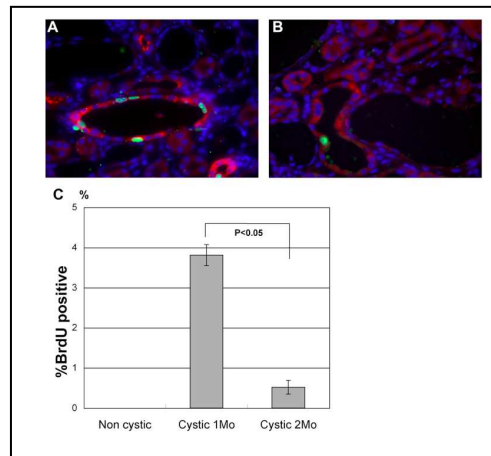


図 2. 細胞増殖

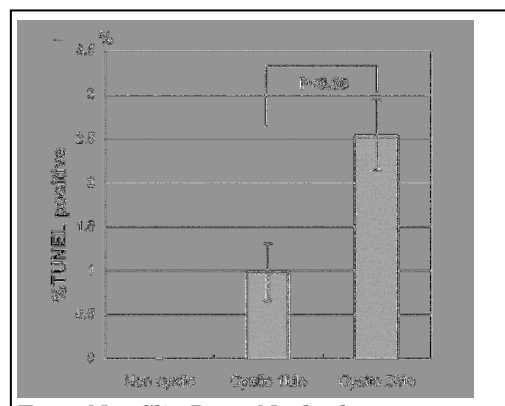


図 3. アポトーシス

一方、TUNEL 染色を用いてアポトーシスに関して解析を行ったところ、図3に示すように経時的にアポトーシスが増加していることがわかった。

これらの結果から、ADPKD では細胞増殖が嚢胞形成に関わり、腎臓のサイズも増殖し続けるが、ADPLD では嚢胞形成初期には細胞増殖が盛んであるが、その後アポトーシスが盛んとなることで、腎臓のサイズは減少していくことが明らかとなった。

(3)嚢胞形成機序を解析するためにウエスタンブロッティングを用いて解析を行った。AQ2(アクアポリン2)や Na-K ATPase などの膜蛋白がノックアウトマウスで発現が低くしていた。これは Sec63 が膜蛋白の成熟に欠かせない蛋白であるために発現が低下しているものと考えられた。AQ2 は免疫染色でも嚢胞上皮において著明に発現が低下していた。AQ2 ノックアウトマウスでは水腎症を呈する事がすでに報告されており、*Sec63<sup>flox/flox</sup>:Ksp-Cre* マウスの水腎症の原因は AQ2 の発現低下が関係すると考えられた。また、ADPKD の原因である *PKD2* の遺伝子産物であるポリシスチン2 (PC2) の発現が、ノックアウトマウスで低下していた。このことから、ADPLD マウスにおける腎嚢胞形成は PC2 などの嚢胞形成に関わる膜蛋白の発現低下が関係すると考えられた。

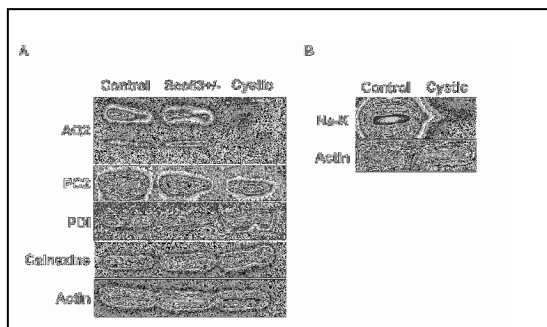


図4. ウエスタンブロッティング

(4)Sec63 コンディショナルノックアウトマウスでは腎臓や肝臓以外の種々の臓器で表現型が観察された。なかでも、網膜色素変性について解析を行った。

図5の様に生後2週目より視細胞層が明らかに薄くなっているのが観察された。また、cilia の形態が保てておらず、免疫染色にてオプシンが視細胞ないにとどまっていることが確認された。

ADPLD において嚢胞形成機序にアポトーシスが重要であったことから、視細胞でのアポトーシスを TUNEL 染色で解析した。

左がノックアウトマウスの網膜であるが、明らかにアポトーシス細胞が増加していた。これらの結果から Sec63 はアポトーシスに重

要な関連があることが明らかとなった。

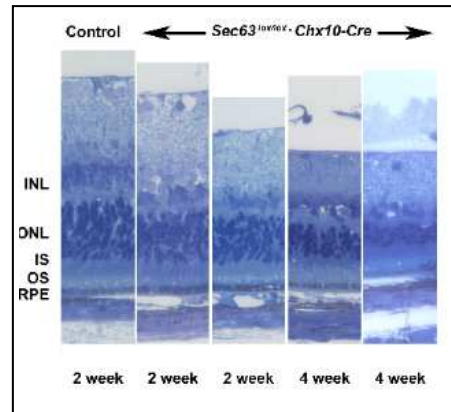


図5. *Sec63<sup>lox/lox</sup>·Chx10-cre* マウスの網膜トールイジンブルー染色

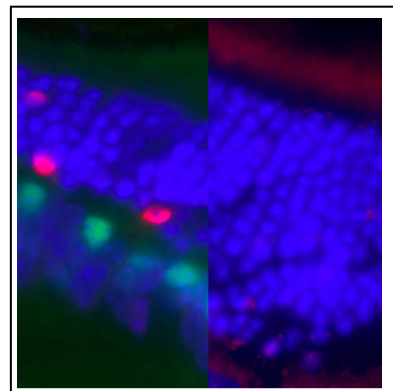


図6. *Sec63<sup>lox/lox</sup>·Chx10-cre* マウスの網膜 TUNEL 染色

## 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 7件)

- ①. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, 他. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 22(2): 317-26. 2011、査読有
- ②. Takiar V, Nishio S, 他. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(6): 2462-7. 2011、査読有
- ③. Ishikawa Y, Nishio S, 他. Transplantation-associated thrombotic microangiopathy after

steroid pulse for polyserositis related to graft-versus-host disease. Clin Exp Nephrol. 15(1): 179-83. 2011、査読有

- ④. Nishio S, 他. Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation. J Am Soc Nephrol. 21(2): 295-302. 2010、査読有
- ⑤. Ohta Y, Fujimura L, Nishio S, 他. A kelch family protein Ndl-L functions as a metastasis suppressor in cancer cells via Rho family proteins mediated mechanism. Int. J. Oncology. 36(2):427-34. 2010、査読有
- ⑥. Watanabe N, Hiramatsu K, Miyamoto R, Yasuda K, Suzuki N, Oshima N, Kiyonari H, Shiba D, Nishio S, 他. A murine model of neonatal diabetes mellitus in Glis3-deficient mice FEBS Lett. 583(12):2108-13. 2009、査読有
- ⑦. Shibasaki S, Yu Z, Nishio S, 他. Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. Hum Mol Genet. 17(11):1505-16. 2008、査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ①. 西尾妙織 他: 「多発性嚢胞腎の嚢胞形成機序における細胞内細胞極性の関与の検討」、第 53 回日本腎臓学会学術総会、神戸市、2010 年 6 月 18 日
- ②. 石川康暢, 西尾妙織 他: 「欠失変異体を用いた常染色体優性多発性嚢胞腎モデルメダカの解析」、第 53 回日本腎臓学会学術総会、神戸市、2010 年 6 月 17 日
- ③. 西尾妙織 他: 「網膜症を認めず腎生検にて糖尿病性腎症と診断された 2

例の検討」、第 43 回日本糖尿病学会、旭川市、2009 年 11 月 8 日

- ④. Ito M, Nishio S 他: Interferon-gamma as a key cytokine in the progression of diabetic nephropathy 42th American Society of Nephrology annual meeting, San Diego, CA, USA (2009) October 27 - November 1
- ⑤. Nakazawa D, Nishio S 他: Predictive Marker and Treatment for Bone Loss after Renal Graft Transplantation. 42th American Society of Nephrology annual meeting, San Diego, CA, USA (2009) October 27 - November 1
- ⑥. Nishio S 他; Raf blockade ameliorates cyst progression and maintains kidney function in an orthologous mouse model of autosomal dominant polycystic kidney. 42st American Society of Nephrology annual meeting, San Diego, CA, USA (2009) October 27-November 1
- ⑦. Nishio S 他; Dissociation of oriented cell division and cyst formation in polycystic kidney disease. 42st American Society of Nephrology annual meeting, San Diego, CA, USA (2009) October 27-November 1
- ⑧. 西尾妙織 他: 「無事に出産するに至った著明なネフローゼ症候群を呈した 2 型糖尿病合併妊娠の一例」、第 252 回日本内科学会地方会、旭川市、2009 年 9 月 12 日
- ⑨. 江端真一、西尾妙織 他: 「薬剤誘導型 Pkd1 コンディショナルノックアウトマウスに対する mTOR 阻害薬の効果」、第 52 回日本腎臓学会学術総会、横浜市、2009 年 6 月 3-5 日

- ⑩. 西尾妙織 他：「Sec63コンディショナルノックアウトマウスの解析」、第52回日本腎臓学会学術総会、横浜市、2009年6月3-5日
- ⑪. Ito M, Nishio S他：The Association of serum IgE concentration with prognosis of nephropathy in type II diabetes. World Congress of nephrology 2009, Milan Italy (2009) May 22-26
- ⑫. Ebata S, Nishio S 他, Generation of Pkd1 conditional knockout mice and treatment with everolimus. 41th American Society of Nephrology annual meeting, Philadelphia, USA (2008) November 4-November 9
- ⑬. 江端真一、西尾妙織 他：「薬剤誘導性Pkd1 コンディショナルノックアウトマウスの作成と解析」、第51回日本腎臓学会総会、福岡市、2008年5月31日  
〔図書〕(計 1件)
- ①. 西尾 妙織他；嚢胞腎の腎腫大、「腎と透析」東京医学 632-635, 2008

## 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